UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

DANIELA MORAES BATISTELA

**Preparação e caracterização de nanopartículas
de prata para aplicação no desenvolvimento de
imunoensaio para imunoglobulina G humana**

Versão corrigida da Tese defendida conforme Resolução CoPGr5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
15/02/2016

DANIELA MORAES BATISTELA

**Preparação e caracterização de nanopartículas
de prata para aplicação no desenvolvimento de
imunoensaio para imunoglobulina G humana**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutora em Química*

*Orientador: Prof. Dr. Renato Sanches
Freire*

São Paulo

2016

Batistela, Daniela Moraes. **Preparação e caracterização de nanopartículas de prata para aplicação no desenvolvimento de imunoensaio para imunoglobulina G humana.** Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Química.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Dedico essa tese aos meus pais, Marli e Antonio Carlos;
Aos meus irmãos, Fabiana, Juliano e Janaina;
Às minhas sobrinhas Maria Fernanda, Mariana e
Heloísa.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Renato, pela orientação, confiança, incentivo e compreensão.

A todos os professores do laboratório de Química de Pesquisa em Química Ambiental. Em especial, ao professor Cassius, por todo apoio e sugestões.

A todos os colegas do grupo de Química de Pesquisa em Química Verde e Ambiental. Em especial agradeço à Raquel e à Andressa, que sempre me ajudaram durante a pós-graduação.

A professora Elisabeth Cheng e os membros do laboratório de bioprocessos do Instituto Butantan, que me auxiliaram em vários momentos durante o desenvolvimento do meu projeto.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Química que também colaboraram com o desenvolvimento do projeto. Em especial agradeço ao Alfredo, funcionário da Central Analítica do IQ-USP, por toda a ajuda prestada.

Ao CNPq e a Fapesp pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a minha família, em especial, meus pais, Antonio Carlos e Marli, por todo apoio e incentivo.

RESUMO

Batistela, D. M. **Preparação e caracterização de nanopartículas de prata para aplicação no desenvolvimento de imunoensaio para imunoglobulina G humana**. 2015. Tese (Doutorado)-Instituto de Química-USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neste trabalho, anticorpos anti-IgG_h foram conjugados às nanopartículas de prata (NPAg) para detectar imunoglobulina G humana (IgG_h). Um imunoensaio colorimétrico baseado na diminuição da agregação devido ao aumento da repulsão eletrostática após a interação ligante-alvo. A agregação é induzida pela variação da força iônica e uma mudança da coloração da suspensão coloidal de amarelo para vermelho pode ser observada. Na presença de IgG_h, a agregação é inibida e a coloração da suspensão coloidal não se altera.

As nanopartículas foram obtidas por meio de cinco procedimentos diferentes e caracterizadas por espectroscopia UV-Vis, espalhamento dinâmico de luz, difração de raios-X e microscopia eletrônica. Glicose e borohidreto de sódio foram utilizados como agentes redutores, enquanto CTAB e β -ciclodextrina foram utilizados como estabilizantes. Citrato de sódio foi utilizado como agente redutor e/ou estabilizante. Nanoesferas de carbono foram obtidas por tratamento hidrotérmico de uma solução aquosa de glicose e também foram utilizadas no preparo das nanopartículas.

As nanopartículas foram funcionalizadas com ácido mercaptossuccínico e a conjugação ocorreu devido à interação entre grupos aminas e grupos carboxílicos ionizados, presentes no anticorpo e agente de acoplamento, respectivamente. A estabilidade dos conjugados e o efeito da adição de IgG_h foram avaliados para todos os sistemas preparados. As nanopartículas de prata preparadas com borohidreto de sódio e citrato de sódio foram selecionadas para serem aplicadas no desenvolvimento do imunoensaio e as condições experimentais foram avaliadas. Em condições ótimas, observou-se uma correlação linear entre a diminuição da agregação do sistema (NPAg-anti-IgG_h) e a concentração de IgG_h (0 a 200 ng mL⁻¹). O limite de detecção foi estimado em 25 ng mL⁻¹. O método colorimétrico apresentou boa seletividade para a detecção de IgG_h. Além disso, foi obtido um resultado satisfatório ao aplicar o método para determinação do fator IX de coagulação.

Foi desenvolvido também um método para determinação de ATP baseado na agregação de nanopartículas de ouro. Aptâmeros foram utilizados como elemento de reconhecimento. Em princípio, o método pode ser aplicável à determinação de outros analitos, por meio da substituição do aptâmero utilizado neste trabalho pelo oligonucleotídeo específico para o alvo de interesse.

Palavras-chave: imunoensaio; imunoglobulina G humana; nanopartículas de prata.

ABSTRACT

Batistela, D. M. **Preparation and characterization of silver nanoparticles for use in the development of immunoassay for human immunoglobulin G**. 2015. Tese (Doutorado)-Instituto de Química-USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In this work, antibodies to human immunoglobulin G (anti-IgG_h) were used in combination with silver nanoparticle (NPAg) to detect IgG_h. A colorimetric immunoassay based on the decrease of aggregation due to increased electrostatic repulsion upon ligand-target interaction. Aggregation was induced by varying the ionic strength and the solution of NPAg-anti-IgG_h shows obvious visible color change from yellow to red. In the presence of IgG_h aggregation the nanoparticle is inhibited and coloration of the colloidal solution does not change.

The nanoparticles were obtained using five different procedures and they were characterized by UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering, X-ray diffraction and electron microscopy. Glucose and sodium borohydride were used as reducing agent, as CTAB and β -cyclodextrin reagents were used as stabilizers. Sodium citrate was used as reducing and stabilizing agent. Carbon nanospheres were prepared by hydrothermal treatment of glucose and used in the preparation of NPAg.

The nanoparticles were functionalized with dimercaptosuccinic acid and their conjugation occurred due to the interaction of positively charged amine groups and anionic groups ($-\text{COO}^-$) present on the antibody and coupling agent. The stability of conjugates and the variation of aggregation in the presence of IgG_h were evaluated for all systems. The NPAg prepared by sodium borohydride were selected for use in the immunoassay and the optimum conditions of the assay were investigated. Under the optimal conditions, the ration between the absorbance at 396 nm and 564 nm was linearly proportional to the IgG_h concentration on a range from 0 to 200 ng mL⁻¹, with a detection limit of 25 ng mL⁻¹. The colorimetric method showed good selectivity for IgG_h detection. It was possible to adapt the method to the determination of other proteins, such as factor IX.

In another approach, anti-aptamer ATP was used to develop a colorimetric method for the determination of ATP based on stabilization of gold nanoparticles provided by strands of DNA. The strategy was based on stabilization of nanoparticles due to interaction with single strands of DNA, and the change of the stability of the nanoparticles provided by the conformational change of the aptamer following recognition. This method could in principle be used to detect analytes by substituting the aptamer used in this study by the specific aptamer for the target of interest.

Keywords: immunoassay; human immunoglobulin G; silver nanoparticle.

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMS - ácido mercaptosuccínico

Anti-IgG_h - imunoglobulina específica para IgG_h

ATP - adenosina trifosfato

CgA - cromogranina A

CTAB - brometo *de* cetiltrimetilamônio

DLS - *dynamic light scattering*

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FIX- Fator IX de coagulação

Ig - imunoglobulinas

IgG_h - imunoglobulina G humana

IgM_h - imunoglobulina M humana

$\lambda_{\text{máx}}$ - comprimento de onda de máxima absorção

LMA - largura a meia altura

MEV- microscopia eletrônica de varredura

MET - microscopia eletrônica de transmissão

NPAg- nanopartículas de prata

NEC - nanoesferas de carbono

NEC-NPAg - nanopartículas de prata preparadas com nanoesferas de carbono

NPAg- β -ciclodextrina - nanopartículas de prata preparadas com glicose e β -ciclodextrina

NPAg-citrato - nanopartículas de prata preparadas com glicose e citrato de sódio

NPAg-CTAB - nanopartículas de prata preparadas com glicose e CTAB

NPAg-NaBH₄ - nanopartículas de prata preparadas com borohidreto de sódio e citrato de sódio

NPAu - nanopartículas de ouro

UV-Vis - ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. A resposta imune: produção de anticorpos	15
1.2. Imunoglobulinas: estrutura e funções	16
1.3. A Imunoglobulina G humana	20
1.4. Imunoensaios	21
1.4.1. A interação antígeno-anticorpo.....	21
1.4.2. Anticorpos policlonais e monoclonais	22
1.4.3. Determinação de imunoglobulina G humana por imunoensaios	24
1.5. Imunoensaios baseados na agregação de nanopartículas metálicas	27
1.6. Nanopartículas metálicas	29
1.6.1. Ressonância de plasmon de superfície localizado	29
1.6.2. Agregação de nanopartículas metálicas	33
1.6.3. Preparo de nanopartículas metálicas coloidais.....	35
1.6.4. Funcionalização e bioconjugação de nanomateriais metálicos.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. Reagentes e solventes.....	40
3.2. Preparação das nanopartículas de prata.....	40
3.2.1. NPAg preparadas com glicose/ β -ciclodextrina	40
3.2.2. NPAg preparadas com glicose/CTAB.....	41
3.2.2.1. NPAg preparadas sob efeito da sonicação.....	41
3.2.2.2. NPAg preparadas sob efeito da agitação	41
3.2.3. NPAg preparadas com glicose/citrato	41
3.2.4. NPAg preparadas com nanoesferas de carbono	42
3.2.5. NPAg preparadas com borohidreto de sódio/citrato	42
3.3. Caracterização das nanopartículas de prata	42
3.3.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis	42
3.3.2. Espalhamento dinâmico da luz e potencial zeta	43
3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	43
3.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....	43
3.3.5. Difração de raios X.....	44

3.4. Imunoensaio de anti-agregação	44
3.4.1. Obtenção dos conjugados: NPAg-anti-IgG _h	44
3.4.1.1. Funcionalização da superfície das nanopartículas de prata	44
3.4.1.2. Conjugação dos anticorpos	45
3.4.2. Imunoensaio de anti-agregação para determinação de imunoglobulina G humana.....	45
3.4. 2.1. Imunoensaio utilizando NPAg	45
3.4. 2.2. Procedimento para determinação de imunoglobulina G humana.....	46
3.4.2.3. Avaliação da seletividade	47
3.4.2.4. Determinação de cromogranina, fator IX de coagulação e IgM	47
3.5. Ensaio para determinação de ATP	47
3.5.1. Preparo das nanopartículas de ouro	47
3.5.2. Procedimento para determinação de ATP utilizando NPAu e aptâmeros	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Preparação e caracterização das nanopartículas de prata	49
4.1.1. NPAg preparadas com glicose e β -ciclodextrina	49
4.1.2. NPAg preparadas com glicose e CTAB.....	52
4.1.3. NPAg preparadas com glicose e citrato de sódio	58
4.1.4. NPAg preparadas com nanoesferas de carbono	62
4.1.5. NPAg preparadas com borohidreto de sódio	68
4.1.6. Tamanho e polidispersividade das NPAg preparadas.....	70
4.2. Imunoensaio de anti-agregação	72
4.2.1. Funcionalização e estabilidade dos conjugados.....	74
4.2.1.1. Efeito desestabilizante proporcionado pelo aumento da concentração de AMS.....	78
4.2.1.2. Aumento da estabilidade das NPAg proporcionado pelo aumento da concentração de AMS	80
4.3. Imunoensaio de anti-agregação para determinação de IgG _h	81
4.3.1. NPAg- β -ciclodextrina.....	81
4.3.2. NEC-NPAg	83
4.3.3. NPAg-citrato.....	84
4.3.4. NPAg-NaBH ₄	87
4.3.4.1. Avaliação dos parâmetros experimentais	89

4.3.4.2. Determinação de imunoglobulina G humana	98
4.3.4.3. Resposta de IgG _h ao utilizar os anticorpos anti-cromogranina A conjugados às NPAg	100
4.3.4.4. Seletividade do imunoensaio	100
4.3.5. Determinação de cromogranina A	102
4.3.6. Determinação de imunoglobulina M humana	103
4.3.7. Determinação do fator IX de coagulação	105
4.4. Quantificação de ATP com o uso de aptâmeros	106
4.4.1. Preparo e caracterização das nanopartículas de ouro	109
4.4.2. Ensaio de agregação de NPAu para determinação de ATP	111
5. CONCLUSÃO	114
6. BIBLIOGRAFIAS	116

1. INTRODUÇÃO

Os testes imunológicos dão suporte a quase todas as disciplinas da área médica com as funções de identificar o estado imune do paciente, estabelecer ou excluir um diagnóstico e auxiliar no prognóstico. Além disso, as imuno-análises são utilizadas também com a intenção de monitorar determinados tratamentos médicos e a evolução da doença, bem como avaliar o nível terapêutico de drogas (Seadi, 1998; Romano, 2007).

Os imunoensaios foram inicialmente utilizados para diagnósticos de infecções, mas houve uma crescente aplicação desses métodos na área clínica, em princípio devido ao fato de muitas moléculas não serem adequadas para testes bioquímicos baseados em reações enzimáticas (Xavier et al., 2010). Os imunoensaios, atualmente, são utilizados para diversas finalidades, como análises toxicológicas (Klaassen; Watkins, 2012), diagnósticos de alergias (Lins et al., 2010) e identificação de distúrbios do sistema endócrino por meio da determinação quantitativa dos níveis hormonais (Baynes; Dominicsak, 2015).

O termo imunoensaio refere-se normalmente a uma medida quantitativa que depende do reconhecimento de um analito, o antígeno, por um anticorpo específico (Bock, 2000). A detecção do antígeno pode ser realizada de diversas maneiras, mas normalmente são baseadas no uso de anticorpos (ou antígenos) marcados, com enzimas (ex.: Elisa; do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), ou radioisótopos (radioimunoensaios), ou, na visualização do imunocomplexo (antígeno-anticorpo) formado por meio de fenômenos de precipitação ou aglutinação.

De uma maneira geral, as imunoanálises apresentam elevada seletividade e sensibilidade. Entretanto, há algumas desvantagens relacionadas à praticidade e tempo de análise. Os métodos baseados na precipitação do complexo antígeno-anticorpo, por exemplo, levam muitas horas para finalização (24-96h). Existe certa preocupação com relação ao uso e descarte de moléculas conjugadas com radioisótopos. Ainda, há uma dificuldade de automatização de alguns desses imunoensaios. Novas metodologias vêm sendo exploradas com a finalidade de superar as principais desvantagens apresentadas imunoensaios (Murray; Rosenthal; Pfaller; 2014; Failaice; Fernandes, 2015, Gil; Kubota; Yamamoto, 1999).

Frente ao exposto, no presente trabalho, propõe-se utilizar diferentes rotas de preparo de suspensões coloidais de NPAg para empregá-las no desenvolvimento de um imunoensaio de anti-agregação. A imunoglobulina G humana foi o analito utilizado nos estudos das variáveis relacionadas ao método e na avaliação das NPAg preparadas. Assim, o anticorpo anti-imunoglobulina G foi utilizado como elemento de reconhecimento. A versatilidade do imunoensaio baseado na anti-agregação de NPAg foi avaliada na determinação de outras proteínas, a imunoglobulina M humana, o fator IX de coagulação, e o marcador tumoral cromogranina A.

A escolha desses analitos foi baseada na sua importância para o diagnóstico clínico. Os níveis séricos de imunoglobulinas, por exemplo, devem ser determinados sempre que houver a suspeita clínica de uma imunodeficiência humoral, alergia ou doença auto-imune (Vaz; Takei; Bueno, 2007). Rotineiramente são determinados os níveis séricos de imunoglobulina A, imunoglobulina E, imunoglobulina M e imunoglobulina G.

Já deficiência do fator IX de coagulação no plasma humano é o resultado de uma doença conhecida como hemofilia B. Os imunoensaios para fatores de coagulação podem proporcionar informações no estudo de deficiências funcionais, efeitos da terapia de infusão do fator deficiente (principal tratamento para a doença) e a presença de inibidores de fatores de coagulação (Amiral; Adalbert, 1984).

Os marcadores tumorais são proteínas, e derivados, presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos. O aparecimento dos marcadores tumorais e ou alterações das suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. A investigação laboratorial de tais substâncias tem algumas aplicações rotineiras na clínica médica, como triagem e diagnóstico, monitorar o sucesso terapêutico e detecção de recidivas (Almeida et al., 2006; Vaz; Takei; Bueno, 2007).

As nanopartículas metálicas são vistas como materiais alternativos para a aplicação no desenvolvimento de bioensaios. Os métodos de agregação são baseados no elevado coeficiente de extinção das nanopartículas metálicas, especialmente de ouro e prata, e no acoplamento eletromagnético que ocorre em nanopartículas que estão próximas. Esses métodos envolvem um deslocamento da frequência da ressonância de plasmon de superfície localizado das nanopartículas, devido à interação do analito com alvo (Perez, 2010). O uso de nanopartículas

metálicas possibilita a obtenção de métodos que não utilizam marcadores, como enzimas. Ainda, os métodos baseados na agregação de nanopartículas metálicas permitem que a detecção seja realizada por meio da espectroscopia UV-Vis, uma técnica comumente utilizada em vários laboratórios.

1.1. A resposta imune: produção de anticorpos

Conceitualmente existem dois mecanismos de defesas imunológicas: imunidade inata e imunidade específica (adaptativa).

A imunidade inata compreende uma série de eventos que ocorrem inicialmente com o objetivo de defender o organismo contra um agente invasor, sendo uma resposta rápida, que envolve desde uma barreira mecânica, como a pele, até células efectoras, como macrófagos, neutrófilos e células natural killer (Cruvinel et al., 2010).

A primeira fase da resposta imune específica se inicia com o reconhecimento específico de um determinado agente, o antígeno (ex.: patógenos), por receptores de superfície celular presentes nas células B e células T. Os receptores das células B e T são proteínas que formam a base da resposta imune específica. Após o reconhecimento do antígeno, ocorrem vários eventos celulares e moleculares a fim de combater o agente infeccioso (Vaz; Takei; Bueno, 2007; Parham, 2011).

Os antígenos que induzem uma resposta imunológica são chamados de imunógenos. Alguns fatores, como o tamanho e complexidade química, definem a imunogenicidade dos antígenos.

Já os receptores de superfície das células B (linfócitos B) são as imunoglobulinas (Ig). Até o momento, são conhecidas cinco classes de Ig produzidas por mamíferos durante uma resposta imunológica: a imunoglobulina A (IgA), a imunoglobulina G (IgG), a imunoglobulina D (IgD), a imunoglobulina E (IgE) e a imunoglobulina M (IgM) (Parham, 2011).

A primeira Ig expressa durante o processo de ativação dos linfócitos B é a IgM. Os pré-linfócito B são células precursoras que existem apenas em tecidos hematopoéticos (medula óssea e órgão linfócitos). A ativação se inicia com a ligação de antígenos a duas ou mais moléculas de receptores, ou seja, as Ig de membrana. Os linfócitos B deixam a medula óssea e passam a expressar a IgD na superfície celular. Neste momento, são capazes de reconhecer antígenos estranhos e podem

ser encontrados em órgãos periféricos externos (Lopes, 2006; Vaz; Takei; Bueno, 2007).

A ativação dos linfócitos B não depende apenas da ligação do antígeno, mas de vários sinais bioquímicos. Desta forma, a partir do momento em que os linfócitos B entraram em contato com um antígeno, ocorre uma série de eventos celulares, mediados pelas células T, e uma parte dos linfócitos B ativados podem se diferenciar em células efectoras, chamadas de células plasmáticas. Há uma diminuição da expressão de Ig na superfície celular das células plasmáticas, que passam a secretar formas solúveis das Ig e apresentam especificidade semelhante. As Ig secretadas por células plasmáticas são conhecidas como anticorpos, que são capazes de se ligar aos antígenos que induziram a resposta e participar de diferentes mecanismos efetores da resposta imune, como neutralização de proteínas e opsonização (Parham, 2011; Vaz; Takei; Bueno, 2007; Mesquita Júnior et al., 2010).

Com o decorrer da resposta imune ocorrem mutações somáticas dos genes das imunoglobulinas, que induzem a pequenas alterações na região responsável pelo reconhecimento e ligação com o antígeno. Assim, são produzidas Ig com maior capacidade de ligação.

1.2. Imunoglobulinas: estrutura e funções

As imunoglobulinas ou anticorpos possuem muitas funções e características estruturais hoje bem conhecidas. As características estruturais são semelhantes para as diferentes classes de Ig, mas algumas variações na composição de aminoácidos, que ocorrem em regiões específicas, conferem diferentes funcionalidades a essas biomoléculas.

A estrutura básica de uma molécula de Ig é composta de quatro cadeias (Figura 1), compreendendo duas cadeias pesadas (H, do inglês heavy) idênticas e duas cadeias leves (L, do inglês light) idênticas, ligadas entre si por ligações de dissulfeto. As cadeias são formadas por uma série de unidades homologas e repetidas, chamadas domínios. Cada domínio contém cerca de 110 aminoácidos e apresentam-se como estruturas globulares mantidas por ligações de dissulfeto intercadeia (Vaz; Takei; Bueno, 2007).

As cadeias pesadas definem as classes ou isótipos das imunoglobulinas e são designadas por letras gregas: cadeia α (IgA), cadeia γ (IgG), cadeia δ (IgD), cadeia ϵ (IgE) e cadeia μ (IgM).

As cadeias também são divididas de acordo com o domínio estrutural, que são classificados como constante (C) e variável (V). Os mesmos aminoácidos compõem a sequência estrutural da região constante de uma determinada classe Ig. Como o próprio nome sugere, as regiões variáveis são assim designadas por apresentarem variabilidade na sequência de aminoácidos, sendo que elas diferenciam os anticorpos produzidos por diferentes células B (Diamandis; Christopoulos, 1996). A cadeia pesada possui um domínio variável (VH) e 4 domínios constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4). Os isótipos IgM e IgE são os únicos que apresentam o domínio CH4 (Gitlin, 1966, Vaz; Takei; Bueno, 2007). Diferenças estruturais observadas nas regiões constantes de cadeia pesada, em especial em CH1 e CH3, proporcionam diferentes características funcionais e antigênicas as Ig. As IgG, por exemplo, são divididas em 4 subclasses diferentes, a IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. (Schroeder; Cavacini, 2010).

As cadeias variáveis leves (VL) e pesadas (VH) formam o fragmento variável (Fv), que é uma região hipervalente localizada na extremidade do anticorpo responsável pelo reconhecimento do antígeno. Já a região do antígeno que interage com o anticorpo é denominada epítipo. No entanto, como a cavidade pode ser maior que o epítipo, os anticorpos podem se ligar a outros epítipos, com estrutura muito similar, desde que não haja repulsão eletrostática devido a aminoácidos com cargas diferentes (Diamandis; Christopoulos, 1996; Masseyeff; Albert; Staines, 1992).

Entre os domínios CH1 e CH2 de certo isótipos de Ig localiza-se uma região denominada dobradiça (do inglês hinge), na qual ocorrem ligações de dissulfeto. Essa região confere certa flexibilidade à estrutura do anticorpo e permite que ele se ligue a epítipos distantes (Klein et al., 1981).

Ao realizar uma clivagem enzimática da Ig na região de dobradiça, entre os segmentos CH1 e CH2, são obtidos fragmentos capazes de interagir com o antígeno. Ao realizar a fragmentação de IgG (150 kDa) utilizando papaína e na presença de um agente redutor da cisteína, por exemplo, podem ser obtidos 3 fragmentos com massa de aproximadamente 50 KDa, sendo dois fragmentos Fab (do inglês antigen-binding) e um fragmento denominado Fc (fragmento cristalizável).

Essa região é menos compacta, o que possibilita a ação da enzima. (Porter, 1959; Masseyeff; Albert; Staines, 1992). O fragmento Fab é a porção da qual faz parte os domínios variáveis (Fv). Já os domínios constantes da região Fc definem o isótipos das Ig (CH2-CH3 ou CH3-CH4), por isso especificam as funções efetoras da biomolécula.

Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura básica de uma imunoglobulina, adaptado de Diamandis e Christopoulos (1996).

Deve-se enfatizar que não existem apenas Ig com estruturas monoméricas. As IgM, por exemplo, podem ser multiméricas, geralmente pentaméricas. Essas estruturas são formadas por meio da união de unidades individuais de IgM por ligações de dissulfeto. Dessa forma, enquanto IgG é uma molécula bivalente, IgM teoricamente, pode interagir com até 10 antígenos (Schroeder; Cavacini, 2010).

Algumas informações relevantes a respeito das Ig são apresentadas na Tabela 1. Como foi relatado anteriormente, apesar das Ig apresentarem algumas características estruturais semelhantes, possuem muitas funções efetoras distintas. Isso porque muitas funções são mediadas pelas regiões constante das cadeias pesadas dessas biomoléculas.

As IgD são encontradas em porcentagens muito baixas no soro, por isso essa Ig é considerada uma proteína de membrana. As funções que desempenha no soro ainda não são bem esclarecidas (Schroeder; Cavacini, 2010; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Do mesmo modo, a concentração de IgE no soro não é elevada. A

IgE é responsável pela hipersensibilidade anafilática, sendo também importante para a proteção contra a infecção de parasitária (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Tabela 1. Estrutura e função das imunoglobulinas. Adaptada de Abbas, Lichtman e Pillai (2012), Murray, Rosenthal e Pfaller (2014) e Vaz, Takei e Bueno (2007).

Ig	% Ig no soro	Vida média no soro (dias)	Forma secretora	Massa Molecular (KDa)	Funções
IgM	5-10	5	pentâmero	900	* Receptor de antígeno em células B virgens Ativação da via clássica do complemento
IgD	<1	2-3	monômero	185	* Receptor de antígeno em células B virgens
IgE	<1	2-2	monômero	190	Hipersensibilidade imediata Infecção de parasitária
IgA	5-15	6	monômero	160	Imunidade das mucosas
IgG	75-85	23	monômero	150	Opsonização de antígenos para fagocitose por macrófagos e neutrófilos Ativação do complemento Imunidade neonatal: transferência de anticorpos maternos através da placenta/intestino Inibição da ativação da célula B por retroalimentação

* Essas funções são medidas por anticorpos ligados à membrana.

A primeira classe de anticorpos secretados durante uma resposta imunológica é a IgM. As IgM têm uma meia-vida curta (5 dias) e são frequentemente usadas para diagnosticar a exposição aguda ao patógeno (Abbas; Lichtman; Pillai, 2012).

A principal imunoglobulina responsável pela imunidade humoral das mucosas é a IgA (Macpherson et al., 2008; Schroeder; Cavacini, 2010). Pode atuar também como um anticorpo neutralizante para agentes patogênicos e exotoxinas (Macpherson et al., 2008).

A concentração de IgG no plasma humano é elevada, representando em torno de 75% do total de imunoglobulinas presentes nos adultos. IgG tem a função de promover a imunidade do organismo para uma grande diversidade de antígenos. É o principal anticorpo da resposta imune secundária e apresenta meia-vida de aproximadamente 23 dias (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Baynes; Dominicsak, 2015).

1.3. A imunoglobulina G humana

A imunoglobulina G humana é a classe de Ig predominante no soro humano e exerce muitas funções biológicas importantes por interagir com vários tipos celulares. Uma importante função de IgG_h, por exemplo, é a opsonização de antígenos para fagocitose por macrófagos e neutrófilos (Marzocchi-Machado; Lucisano-Valim, 2005; Abbas; Lichtman; Pillai, 2012), como foi descrito na Tabela 1.

A concentração sérica normal de IgG_h em adultos varia de 8 a 16 mg mL⁻¹. A concentração de IgG_h pode variar de acordo com fatores endógenos e exógenos. Entre os fatores endógenos mais significativos temos a idade. Por exemplo, a concentração sérica de IgG_h em crianças de um ano de idade é duas vezes menor que de adultos. Os níveis de IgG_h também podem ser alterados por outros fatores, como sazonais (exógeno), consumo de bebida e cigarro. (Kalff, 1970; Lyngbye; Kroll, 1971; Gonzalez-Quintela et al., 2007).

A concentração de IgG_h pode ser significativamente alterada em estados patológicos relacionados a algumas doenças, como infecções e imunodeficiências primárias e adquiridas. A concentração de IgG_h no soro pode ser inferior ou superior ao valor de referência (Silva et al., 2001; Ameratunga et al., 2010; Cantos et al., 2000).

As imunodeficiências primárias, por exemplo, constituem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias causadas por defeitos em um ou mais componentes do sistema imunológico. Compreendem mais de 180 doenças, classificadas de acordo com o componente do sistema imunológico afetado. Uma das principais características das imunodeficiências primárias, comum a quase todas, é o aumento da susceptibilidade a infecções (Al-Herz et al., 2014; Geller; Scheinberg, 2015). Em imunodeficiências de anticorpos e imunodeficiências combinadas existe uma alteração, principalmente diminuição, dos níveis séricos de Ig. Na

agamaglobulinemia ligada ao cromossoma X, por exemplo, há uma severa redução do nível de anticorpos. A concentração de IgG_h chega a ser menor que 2 mg mL⁻¹. Diante disso, a IgG_h pode não ser detectada em exames de rotina (Conley; Rohrer; Minegishi, 2000; Al-Herz et al., 2014).

A determinação de Ig é um dos testes realizados na primeira etapa de triagem para avaliação de imunodeficiências de anticorpos (Geller; Scheinberg, 2015). É importante dizer também que em algumas dessas imunodeficiências pode haver a manutenções dos níveis séricos de Ig ou alteração de algumas classes desses anticorpos (Al-Herz et al., 2014). Em portadores de uma imunodeficiência primária conhecida como síndrome de Hiper-IgM, por exemplo, há uma severa redução da concentração plasmática de IgG e IgA, podendo ser menor que 0,02 mg mL⁻¹, enquanto a concentração de IgM mantém-se normal ou aumenta (Revy et al., 2000).

A determinação de IgG_h não se restringe a medidas realizadas em plasma, esse anticorpo pode ser encontrado em outros fluídos corpóreos, como na saliva, na urina e em líquido cefalorraqueano (Hanson; Tan; 1965, Felgenhauer, 1974). A concentração de IgG_h no líquido cefalorraqueano normal é próxima de 0,02 mg mL⁻¹ e sua alteração pode ser resultado de várias patologias, como a neurosífilis, neurocisticercose e esclerose múltipla (Livramento, 1979; Livramento; Melaragno Filho; Spina-França, 1981). A IgG pode ser encontrada em fluídos orais, mas em quantidade muito menor do que no plasma, aproximadamente 0,02-0,03 mg mL⁻¹ (Divya; Sathasivasubramanian, 2014). Desse modo, os testes que utilizam a saliva devem apresentar baixos limites de detecção (Tamashiro; Constantine, 1994; Chohan et al., 2001).

1.4. Imunoensaios

1.4.1. A interação antígeno-anticorpo

O princípio da ligação do anticorpo ao antígeno envolve a complementaridade de suas estruturas. A ligação é reversível e envolve um conjunto de ligações não covalentes, como interação eletrostática, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de van der Waals (Virella, 2005).

Dois conceitos são importantes ao considerar a interação de um antígeno com o anticorpo, a afinidade e a avidéz. A força de ligação entre um epítipo do antígeno

e o anticorpo é denominada afinidade. A afinidade é inversamente proporcional à constante de dissociação do complexo. Para anticorpos específicos para antígenos naturais, a constante de dissociação geralmente varia de 10^{-7} a 10^{-11} mol L⁻¹. A afinidade média da Ig aumenta durante a resposta imune. A IgM, por exemplo, é expressa no início do desenvolvimento das células B, por isso, são anticorpos de baixa afinidade, tendendo a interagir com uma variedade de antígenos (Abbas; Lichtman; Pillai, 2012; Vaz; Takei; Bueno, 2007). Essa baixa afinidade deve ser considerada ao determinar IgM em um imunoensaio.

O termo avidéz é um parâmetro para a medida da estabilidade geral do imunocomplexo formado e depende de três fatores: da valência do anticorpo e do antígeno, da afinidade intrínseca do antígeno pelo anticorpo e do arranjo geométrico dos componentes interagindo (Masseyeff; Albert; Staines, 1992; Vaz; Takei; Bueno, 2007).

A ligação multivalente de um anticorpo e antígeno resulta em um aumento da estabilidade do complexo formado. Assim, a IgM apresenta elevada avidéz, que é proporcionada pelas interações entre os múltiplos sítios de ligação do IgM e o antígeno, especialmente se o antígeno contém múltiplos epítomos repetidos. Apesar de ser uma imunoglobulina monomérica, a IgG também mostra elevada avidéz por antígenos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). IgG também apresenta baixa afinidade no início da resposta imune, mas após as mutações somáticas dos genes das imunoglobulinas, como descrito na subseção 1.1, são selecionados anticorpos com elevada capacidade de ligação. Devido também à maior concentração de IgG no soro, essas Ig são preferencialmente utilizadas em imunoensaios (Vaz; Takei; Bueno, 2007; Parham, 2011).

1.4.2. Anticorpos policlonais e monoclonais

Os anticorpos podem ser obtidos por meio de uma resposta imune de um animal (ex.: camundongo, coelho e cabra) no qual um antígeno foi injetado. Após a imunização, o animal é sangrado e o anti-soro resultante é usado no desenvolvimento de imunoensaios, por exemplo (Diamandis; Christoulos, 1996). O anti-soro obtido de uma resposta imune é composto por anticorpos policlonais, que reconhecem diferentes epítomos do antígeno (Figura 2). Esses anticorpos podem ser selecionados e purificados antes de serem utilizados.

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos por meio da fusão de células do baço (linfócitos) de um camundongo imunizado com células de mieloma. Há o crescimento e seleção das células fusionadas, os hibridomas. Os hibridomas produtores de anticorpos monoclonais são selecionados e podem ser clonados com o objetivo de obter uma linhagem celular que produz uma única espécie de anticorpo e por um longo período de tempo (Köhler; Milsten, 1975; Baynes; Dominicsak, 2015). Esses anticorpos são homogêneos e reconhecem o mesmo epítipo do antígeno, porque foram gerados a partir de células B iguais (Lehninger, 2006).

Figura 2. Anticorpos policlonais e monoclonais. Adaptada de Kelly (2007).

Em geral, os anticorpos policlonais são constituídos por anticorpos específicos para diferentes epítomos, podendo ser vantajosos em situações nas quais a variação da substância alvo é conhecida e anticorpos policlonais podem fornecer um teste mais robusto (Burns, 2005; Lipman et al., 2005).

Com relação aos anticorpos monoclonais, a sua especificidade é dirigida a um único epítipo do antígeno, e sua natureza altamente específica permite o desenvolvimento de ensaios em que duas substâncias estreitamente relacionadas podem ser diferenciadas. Podem ser úteis, por exemplo, para identificar membros de uma família de proteína. No entanto, o fato de anticorpos monoclonais serem específicos para um determinado epítipo também pode limitar sua aplicação. Pequenas modificações na estrutura de um epítipo do antígeno em consequência de polimorfismo genético ou desnaturação, por exemplo, pode afetar sua ligação ao anticorpo monoclonal. Do mesmo modo, a ligação covalente de enzimas ou radionucleotídeos aos anticorpos pode afetar o sítio de ligação afetando a interação antígeno-anticorpo. Esse feito é menos pronunciado para os anticorpos policlonais.

(Campbell, 1991; Burns, 2005; Lipman et al., 2005). Além disso, o custo associado ao uso de anticorpos monoclonais é elevado e o tempo para sua produção é maior.

1.4.3. Determinação de imunoglobulina G humana por imunoensaios

O analito de um imunoensaio pode ser um antígeno ou um anticorpo. Um teste para averiguar uma infecção viral, por exemplo, pode ser realizado por meio da detecção da própria proteína antigênica ou dos anticorpos específicos que foram produzidos em resposta ao vírus. Já as anti-imunoglobulinas podem ser utilizadas como um anticorpo específico para imunoglobulinas, que neste caso assumem o papel de antígenos. Em um imunoensaio para determinação total de IgG_h, por exemplo, é utilizada a anti-imunoglobulina específica para esse anticorpo, a anti-IgG_h.

O radioimunoensaio é uma das técnicas indicadas para determinação de baixas concentrações de IgG_h. Uma das primeiras proteínas determinadas por meio de imunoensaios, a insulina, fez uso de radioisótopos para quantificação (Yalow; Berson, 1959). Nos radioimunoensaios que utilizam antígenos marcados, uma quantidade fixa dos anticorpos é imobilizada em uma superfície. São adicionados, então, os antígenos (analito) e os antígenos marcados com radioisótopo. Existe uma competição entre os antígenos marcados e aqueles presentes na solução analisada por sítios dos anticorpos imobilizados. O sinal característico do marcador, ou seja, a radioatividade é medida após ser realizada uma lavagem para retirar os antígenos que não complexaram. Os radioimunoensaios são ainda muito utilizados devido à sua elevada sensibilidade (Diamandis; Christopoulos, 1996; Ramachandran et al., 2012). No entanto, existe uma preocupação com relação ao manuseio e descarte seguro desses reagentes. Além dos radioimunoensaios, métodos imunoenzimáticos também são utilizados quando é preciso um método mais sensível e capaz de quantificar imunoglobulinas que estão presentes em baixas concentrações na amostra analisada (Kan; Verspaget; Pefia, 1983; Memish et al., 2002; Ciervo et al., 2004). O Elisa foi utilizado para determinação de imunoglobulinas, por Engvall e Perlmann, em 1971. Segundo os autores, a marcação de antígenos com enzimas oferecem algumas vantagens com relação aos radioisótopos. Os conjugados enzima-antígeno podem ser estabilizados de modo que uma preparação possa ser utilizada durante um longo tempo. Além disso, um equipamento mais simples é

necessário para medir a atividade das enzimas do que para medir a radioatividade. As enzimas HRP (horseradish peroxidase) e a fosfatase alcalina são muito utilizadas como marcadores enzimáticos. Uma configuração semelhante àquela descrita para os radioimunoensaios pode ser usada para o Elisa. Para a imobilização do anticorpo (ou antígeno) é utilizada uma superfície sólida inerte, como uma microplaca de poliestireno. A última etapa consiste na adição de substratos cromogênicos, que sob uma reação enzimática originam produtos coloridos. A quantificação é realizada pela medida da densidade óptica da solução em um espectrofotômetro. O resultado pode ser também comparado com algum padrão de referência (Vaz; Takei; Bueno, 2007). Além dos imunensaios ELISA utilizarem reagentes previamente modificados, eles são métodos exaustivos e prolongados, pois são realizados em várias etapas.

A imunodifusão radial e a nefelometria são também métodos clássicos utilizados para determinação de IgG_h (Livramento, 1979; Davis et al., 2005; Beck; Kaiser, 1981; O'Connell; Horita; Kasravi, 2005; Bottini, 2007). Esses ensaios são amplamente empregados na área clínica, como na tipagem de eritrócitos em bancos de sangue, diagnósticos de doença hemolítica imunologicamente medida e teste para fatores reumatóides (Coico; Sunshine, 2010). Nos teste para fatores reumatóides, por exemplo, anticorpos, geralmente da classe IgM, reconhecem epítomos da fração Fc do anticorpo IgG.

A imunodifusão radial é um dos métodos baseados na imunoprecipitação de proteínas. Neste caso, a formação de precipitados ocorre durante a difusão dos reagentes em um gel de agarose. A difusão ocorre radialmente, a partir de um poço circular. Quando um antígeno proteico solúvel (multivalente) combina com um anticorpo (bivalente) pode haver a formação de um complexo insolúvel e visível, o precipitado. A formação de precipitados é máxima quando as concentrações dos anticorpos e dos antígenos são equivalentes. O antígeno é introduzido dentro de um poço no qual irá difundir-se e reagir com anticorpo, este pode estar imobilizado ou não, dando origem as terminologias imunodifusão radial simples ou dupla, respectivamente (Vaz; Takei; Bueno; 2007; Mancini; Carbonara; Heremans, 1965). Um inconveniente dos ensaios baseados na precipitação é que, geralmente, muitas horas são necessárias para a reação finalizar (24-96 horas). Ainda, a exatidão da imunodifusão radial é muitas vezes comprometida por matrizes complexas. Já a técnica de imunodifusão radial dupla necessita de extratos antigênicos de

concentrações elevadas e anticorpos policlonais de elevada avidéz. (Whicher, 1980; Vaz; Takei; Bueno; 2007; Virella, 2010).

Os métodos nefelométricos são baseados em reações de agregação ou aglutinação, sendo os agregados resultantes de uma série de ligações cruzadas entre os vários antígenos multivalentes particulados e os anticorpos (Figura 3). A aglutinação pode ocorrer com partículas que possuem determinantes antigênicos em sua superfície, como vírus e eritrócitos, ou antígenos imobilizados sobre partículas inertes, como látex (Coico; Sunshine, 2010). Partículas de látex são utilizadas em muitos testes qualitativos para facilitar a visualização da agregação. Um teste semi-quantitativo também pode ser realizado por meio de sucessivas diluições da amostra. Deste modo, é denominado título a maior diluição de um soro em que ainda é visualizada a agregação (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Medidas quantitativas podem ser realizadas utilizando um nefelômetro ou espectrofotômetro. Os imunoensaios nefelométricos empregam partículas coloidais para aumentar a sensibilidade e ampliar o ponto de equivalência. Eles apresentam limites de detecção de aproximadamente $1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Correia et al., 2003; Burtis; Ashwood; Bruns, 2008). Do mesmo modo, esses ensaios baseiam-se na agregação de microesferas poliméricas coloidais (látex) que atuam como um veículo do anticorpo (ou antígeno). A presença da molécula complementar (antígeno ou anticorpo) inicia o processo de aglutinação (Ortega-Vinuesa et al., 1998). Em um ensaio de agregação algumas condições reacionais devem ser ajustadas, como a força iônica, pH, temperatura e viscosidade do meio. Existem alguns anticorpos que não agregam facilmente, como a IgG, por isso outros recursos são utilizados, como o tratamento enzimático e a ajuda de anti-imunoglobulinas (Seadi, 1998). A fácil automatização dos métodos nefelométricos é um dos motivos que faz com que sejam muito empregados em laboratórios clínicos.

Mas, segundo alguns grupos de pesquisa (Serra et al., 1992; Ortega-Vinuesa et al., 1998; Whicher, 1980; Welch; Litwin, 2010), as microesferas de poliestireno apresentam baixa estabilidade no estágio de sensibilização com o anticorpo e, conseqüentemente, é comum a aglutinação não específica. A aglutinação inespecífica pode proporcionar uma baixa precisão para métodos de imunoaglutinação.

Figura 3. Esquema de um ensaio de imunoagregação.

1.5. Imunoensaios baseados na agregação de nanopartículas metálicas

Os grupos de Leuvering (1980) e Englebienne (2000) foram os primeiros a utilizar nanopartículas metálicas em imunoensaios de agregação. Leuvering e colaboradores conseguiram resultados equivalentes a de radioimunoensaios. Já Englebienne (2000) e colaboradores observaram que as partículas de ouro coloidais revestidas com os anticorpos eram menos propensas a agregações inespecíficas, o que seria uma vantagem em relação ao látex. Rosenzweig e Thanh (2002) desenvolveram um imunoensaio baseado na agregação de NPAu para determinação de proteína A com um limite de detecção comparável à de métodos ELISA, e desde então imunoensaios colorimétricos para determinação de diferentes analitos, como hormônios (Zhou et al., 2012), toxinas (Xu et al., 2013) e bacteriófagos (Lesniewsk et al., 2014), foram desenvolvidos.

Os princípios dos imunoensaio de agregação que utilizam nanopartículas metálicas são muito parecidos com aqueles que utilizam o látex. Colóides de ouro e prata, por exemplo, apresentam colorações características, devido à absorção da radiação eletromagnética na região do visível. Com a agregação há uma mudança da coloração e do espectro de absorção do colóide. O analito pode ser detectado em uma análise qualitativa que dispensa o uso de instrumentos de medida, pois há uma alteração da coloração da solução. Enquanto técnicas como a espectroscopia UV-Vis e espalhamento de luz podem ser utilizadas para que a quantificação do analito seja realizada (Huo, 2010; Huang et al., 2015). Alguns fenômenos ópticos

relacionados às nanopartículas metálicas são assuntos abordados nas subseções 1.6.1 e 1.6.2.

Para induzir a agregação das nanopartículas que permaneceram estáveis na presença do antígeno, alguns recursos são utilizados, como o aumento da força iônica do meio. A utilização de polímeros também pode melhorar o desempenho analítico do imunoensaio de agregação. O polietileno glicol, por exemplo, pode aumentar a taxa de aglutinação (Leuving et al., 1980; Du; Li; Cheng, 2008; Gasparyan, 2010).

No método desenvolvido pelo grupo de Yuan (2011), NPAu revestidas com os anticorpos anti-neurogenina 3 permaneceram estáveis após adição de NaCl (30 mmol L⁻¹), porém, ao adicionar a proteína neurogenina 3, houve um aumento da agregação (Figura 4). Neste caso, com agregação do colóide de NPAu, inicialmente vermelho, a coloração muda para azul.

Para haver alteração da coloração (agregação), a distância entre as nanopartículas no sol deve ser menor ou igual à metade do diâmetro médio das nanopartículas. Assim, o imunoensaio de agregação pode ser limitado pelo tamanho do antígeno. Analitos de elevado peso molecular podem limitar a distância mínima entre nanopartículas e mesmo que sejam utilizadas partículas grandes uma mudança de coloração pouco intensa será observada (Wilson, 2008).

Figura 4. Esquema do imunoensaio de agregação desenvolvido por Yuan e colaboradores (2011) para determinação de neurogenina 3.

Embora os ensaios baseados no aumento da agregação sejam mais comuns, em condições específicas, um aumento da estabilidade também pode ser observado

após a interação antígeno-anticorpo (Du; Li; Cheng, 2008). O potencial de superfície das nanopartículas conjugadas ao anticorpo irá mudar após interação com antígeno, podendo proporcionar maior estabilidade ao sistema. De acordo com alguns grupos de pesquisa (Yuan et al., 2012; Xu et al., 2013), os imunoenaios baseados na agregação de nanopartículas podem apresentar menor exatidão, devido à agregação indesejável ocasionada por matrizes complexas. Dessa maneira, os métodos baseados na anti-agregação podem ser menos propensos a resultados imprecisos.

NPAu são utilizadas na maioria dos ensaios baseados na imunoagregação, por terem protocolos de síntese e conjugação bem conhecidos, além da sua elevada estabilidade química (Hermanson, 1996; Penn; Hey; Natan, 2003; Liang, 2012). A prata pode oxidar mais facilmente que o ouro. No entanto, NPAg possuem maior coeficiente de extinção molar, menor custo e são menos propensas a agregação do que NPAu, possivelmente devido a sua menor densidade (Chen; Lei; Chen, 2012; Gasparyan, 2010; Yuan et al., 2012). Por isso, há um grande interesse em aplicar NPAg no desenvolvimento de imunoenaios de agregação (Chen; Lei; Chen, 2012; Gasparyan, 2010, Yuan et al., 2012).

A IgG_h é pouco eficiente para aglutinar partículas sensibilizadas com determinantes antigênicos. Isto porque, com a ligação de IgG_h, há uma variação do potencial de superfície que promove a estabilidade do sistema. Assim, espera-se que em condições específicas IgG_h seja capaz de proporcionar um aumento da estabilidade das nanopartículas. Uma vez que o potencial de superfície é o responsável pela estabilização, esse efeito pode ser observado também ao utilizar outras proteínas, podendo o método ser aplicado à detecção de outros analitos. Ao mesmo tempo, acredita-se que é viável e vantajoso utilizar NPAg para obter imunoenaios para quantificar IgG_h e outras biomoléculas de interesse biológico.

1.6. Nanopartículas metálicas

1.6.1. Ressonância de plasmon de superfície localizado

Uma das mais interessantes particularidades das nanopartículas metálicas (tipicamente de 1-100 nm), como as de ouro e prata, é a absorção da luz devido à interação dos elétrons da banda de condução com a radiação eletromagnética. No

momento em que uma nanopartícula metálica ($R/\lambda < 0,1$, onde R é o raio da partícula e λ é comprimento de onda da luz incidente) é irradiada pela luz, seus elétrons de conduções agem como um oscilador harmônico em resposta ao campo elétrico oscilante. Assim, há um deslocamento da densidade de carga, com o decréscimo da densidade eletrônica em um dos lados da nanopartícula e o aumento no lado oposto (Figura 5). Em consequência, é criado um campo elétrico dentro e fora da nanopartícula metálica em direção oposta ao do campo elétrico incidente. A nuvem eletrônica é deslocada em relação ao núcleo e uma força de restauração decorre devido à atração coulombiana, que resulta em uma série de oscilações na partícula. Essas oscilações coerentes de densidade de carga e campo elétrico são denominadas plasmons superficiais localizados ou ressonância de plasmon de superfície localizado (RPLS) (Kelly et al., 2003; Petryayeva, Krull 2011; Netto-Ferreira, 2015). Esse nome deve-se ao fato da densidade de carga no interior da partícula permanecer nula (Pereira, 2009; Zhang et al., 2013).

Figura 5. Esquema do fenômeno RPLS em uma nanopartícula esférica, que mostra o deslocamento da nuvem de elétrons por condução de carga em relação ao núcleo (Hammond et al., 2014).

O intenso campo ressonante dentro da partícula, que leva a um campo dipolar no exterior da partícula, é responsável pelo aumento da seção de choque de extinção ($W_{\text{extinção}}$), que é definida como a razão entre a potência da luz extinta, por meio de espalhamento (W_{esp}) e absorção (W_{abs}), e a intensidade de luz incidente, I_0 , possuindo dimensão de área:

$$C_{\text{ext}} = \frac{W_{\text{ext}}}{I_0} = \frac{W_{\text{esp}} + W_{\text{abs}}}{I_0} = C_{\text{esp}} + C_{\text{abs}} \quad (1)$$

A contribuição do espalhamento para extinção será pequena para uma nanopartícula esférica que apresenta um raio muito menor que o comprimento de onda. Assim, considera-se que $C_{\text{ext}} = C_{\text{Abs}}$ (Pereira, 2009; Kelly et al., 2003; Petryayeva; Krull 2011).

Para nanopartículas metálicas de ouro, prata ou cobre, por exemplo, a absorção ocorre na região do visível, por isso colóides desses nanomateriais apresentam colorações características. A absorção da radiação eletromagnética na região do ultravioleta ou visível é denominada banda de ressonância plasmônica superficial ou banda plasmônica (Netto-Ferreira, 2015). Na Figura 6 podem ser observados os espectros de absorção de suspensões coloidais de prata, ouro e cobre. No espectro de absorção de nanopartículas esféricas de prata coloidais (diâmetro médio $\cong 10$ nm), por exemplo, observa-se única banda de absorção localizada em aproximadamente 400 nm. A perda de coerência do movimento dos elétrons, ou seja, da oscilação, faz com que a absorção ocorra em diferentes energias, por isso, é observada uma banda no espectro de extinção da solução de nanopartículas (Bonifácio, 2006).

Figura 6. Banda de ressonância plasmônica superficial: nanopartículas coloidais de prata (NPAg), ouro (NPAu) e cobre (NPCu). Adaptada de Netto-Ferreira (2015).

Gustav Mie, em 1908, apresentou uma solução para as equações de Maxwell com objetivo de explicar o espalhamento e absorção por partículas simples. Ele

conseguiu explicar a cor da solução de nanopartículas e a sua relação com o tamanho. Foram obtidos teoricamente os espectros de suspensões coloidais de ouro de diferentes tamanho e comparados com resultados experimentais, o que tornou possível estimar o tamanho das nanopartículas obtidas experimentalmente. A solução de Mie pode ser utilizada para obter os espectros de extinção de nanopartículas pequenas (Equação 2), admitindo que essas partículas estejam distantes e, portanto, não há nenhuma interação entre elas. Neste caso, somente a oscilação dipolar contribui para seção de choque de extinção, C_{ext} (Quinten, 2011; Petryayeva; Krull, 2011):

$$C_{ext} = (24 \pi^2 R^3 \xi_m^{3/2} N) / \lambda \ln(10) * [\xi_j / (\xi_r + \chi \xi_m)^2 + \xi_j^2] \quad (2)$$

Sendo R o raio, N é a densidade eletrônica, ξ_m a constante dielétrica relativa do meio em torno da partícula e $\xi = \xi_r + \xi_i$ a complexa constante dielétrica do material maciço. O fator χ leva em conta a forma de nanopartícula. Para nanopartículas esféricas ($\chi = 2$), a frequência na qual a extinção da luz é máxima ocorre quando $\xi_r = -2\xi_m$. Neste caso, o campo sofre amplificação (Kumar, 2009; Petryayeva; Krull, 2011).

De acordo com a solução de Mie, o C_{ext} pode ser diretamente relacionado ao raio (volume) da partícula e interfere na intensidade da absorbância. Essa influência é introduzida diretamente na constante dielétrica da nanopartículas metálicas, por isso é denominado de efeito de tamanho intrínseco (Link; El-Sayed, 1999).

Porém, para nanopartículas maiores, não devem ser consideradas apenas oscilações dipolares, e neste caso a equação 2 não é mais válida para obter os espectros de extinção das nanopartículas.

Alguns trabalhos reportados na literatura mostram que com o aumento do tamanho da nanopartículas metálicas há um alargamento da banda plasmônica e um deslocamento para menores frequências. Neste caso, a polarização das partículas pelo campo eletromagnético deixa de ser homogênea e ocorrem outros modos superiores de excitação, como o quadrupolo, no qual metade dos elétrons move-se paralelamente ao campo aplicado e a outra metade de forma anti-paralela. A excitação dos modos de ordem mais elevada pode ser explicada em termos de uma polarização não homogênea das nanopartículas pelo campo eletromagnético, já

que o tamanho da partícula torna-se comparável com o comprimento de onda da radiação de excitação. Neste caso, a ressonância ocorre em comprimentos de ondas mais elevados. Uma vez que a absorção total da banda de plasmon é resultado da superposição de todas as oscilações multipolares que contribuem com diferentes energias. O alargamento da banda plasmônica com o aumento da partícula pode ser devido a uma perda da coerência de fase da oscilação mais rápida como resultado das interações entre o dipolo e a quadrupolo (e de ordem superior) movimentos dos elétrons oscilatórios. Esse efeito possui uma relação direta com o tamanho da partícula, por isso é chamado de efeito de tamanho extrínseco (Melo et al., 2012; Link; El-Sayed, 1999; Link; El-Sayed, 2000; Kelly et al., 2003).

Outros fatores também influenciam a natureza da oscilação dos plasmon, como a composição do material, a morfologia e constante dielétrica do meio (Kumar, 2009). Geralmente modelos e teorias eletrostáticas simples são utilizadas para justificar os espectros de extinção de nanopartículas esféricas e que estão distantes. Mas técnicas numéricas mais modernas são introduzidas para discutir as propriedades ópticas de nanopartículas com formas distintas e que estão muito próximas. A aproximação do dipolo discreto, por exemplo, é uma das abordagens utilizadas para calcular os espectros de nanorodos, pois neste caso duas bandas de absorção plasmônica são observadas (Hu et al., 2006; Kelly et al., 2003). Já para nanopartículas que estão muito próximas, ou seja, agregadas, o acoplamento dos dipolos de partículas vizinhas deve ser considerado.

1.6.2. Agregação de nanopartículas metálicas

A estabilidade das nanopartículas é balanceada por interações atrativas, que surgem da interação de van der Waals, e de interações repulsivas, que podem surgir da dupla camada elétrica de partículas carregadas ou da repulsão de uma camada orgânica ao redor da partícula (Perez, 2010). Quando a força de atração supera a força de repulsão ($F_{\text{repulsão}} \ll F_{\text{atração}}$) ocorrerá agregação das nanopartículas e uma mudança da coloração da suspensão pode ser observada. A agregação de nanopartículas metálicas é um fenômeno claramente reconhecido, pois no espectro de absorção observa-se uma nova banda de absorção, que surge em maiores comprimento de onda. Um sistema coloidal estável de NPAg, por exemplo,

apresenta coloração amarela, com a agregação das nanopartículas torna-se laranja, então violeta, até adquirir a coloração da prata na escala macroscópica, como pode ser observado na Figura 7 (Melo et al., 2012). Essas transições de cores correspondem aos diferentes estágios de agregação das nanopartículas. No espectro de absorção de soluções de nanopartículas dispersas observa-se apenas uma banda plasmônica (Figura 7a). Com a agregação das NPAg essa banda torna-se menos intensa e uma nova banda de absorção surge em maiores comprimentos de onda (Figura 7b). Assim, espectros diferentes são obtidos nos diferentes estágios de agregação das nanopartículas.

Figura 7. Espectros de absorção (a) e fotografia (b) de prata coloidal em vários estágios de agregação: (1) amarelo claro, (2) cor laranja, (3) violeta e (4) cinza. Adaptada de Melo et al. (2012).

De uma maneira geral, a agregação é explicada com base no acoplamento de plasmons localizados. A oscilação do plasmon, proporcionada pela radiação eletromagnética, resulta em um forte campo eletromagnético próximo à superfície da partícula, que decai exponencialmente em função da distância. As interações entre nanopartículas agregadas são determinadas pela polarização induzida em cada uma delas devido ao campo eletromagnético resultante de todas as outras partículas (Basu et al., 2007; Jain, El-Sayed, 2010). As interferências mútuas dos campos eletromagnéticos de partículas adjacentes geram ressonâncias em energias maiores, o que explica o surgimento de uma nova banda de absorção (Figura 7).

Dois processos primários são utilizados para explicar as interações entre nanopartículas que estão próximas. As interações relacionadas ao campo próximo (do inglês *near-field*) são utilizadas se a distância entre duas partículas é menor que

o comprimento de onda da luz incidente. Já as interações dipolares relacionadas ao campo distante prevalecem se a distância entre as partículas é da ordem do comprimento de onda. Na região chamada campo distante predominam interações dipolares entre partículas adjacentes (Pettryayeva; Krull, 2011).

Um modelo bem aceito para explicar o acoplamento de nanopartículas que estão muito próximas faz analogia entre o plasmon das nanopartículas e hibridização molecular. Neste caso, considera-se que o plasmon (Ψ_1 e Ψ_2) de duas nanopartículas metálicas hibridiza em fase ($\Psi_1 + \Psi_2$) ou fora de fase ($\Psi_1 - \Psi_2$). (Sheikholeslami et al., 2010; Jain, El-Sayed, 2010; Nordlander; Oubre, 2004). Quando o campo de luz incidente é polarizado ao longo das partículas (polarização longitudinal), a combinação em fase reflete um modo ligante (σ), com o campo elétrico intensificado na junção e uma frequência RPSL deslocada para o vermelho. Enquanto o modo que não está em fase representa uma configuração anti-ligante (σ^*), com o campo elétrico localizado na extremidade das partículas e uma frequência RPLS deslocada para o azul (Pinchuk; Schatz, 2008).

É importante ressaltar que o espalhamento e a absorção de luz por nanopartículas agregadas não dependem somente da distância entre elas, mas também do tamanho das partículas primárias, do tamanho e topologia do agregado, da polarização e direção da onda incidente (Quinten, 2001; Kumar, 2009).

1.6.3. Preparo de nanopartículas metálicas coloidais

O preparo das nanopartículas metálicas é uma etapa crítica que antecede sua utilização, pois muitas das suas propriedades variam com suas características morfológicas. Por isso, em muitos casos é indispensável que sejam obtidas nanopartículas monodispersas, estáveis, com formas e tamanhos definidos. Assim, uma considerável atenção é voltada para mecanismos de formação, preparo e caracterização de nanopartículas metálicas (Henglein; Giersig, 1999; Polte et al., 2012; Yu; Andriola, 2010).

Neste seguimento, duas abordagens são utilizadas: no método *top down* um método físico é utilizado para obter nanopartículas a partir de um material de tamanho maior, já no método *bottom-up* os átomos, produzidos a partir da redução de íons, são agregados para gerar as nanoestruturas (Eustis; El-Sayed, 2005). A redução química (método *bottom-up*) é um método versátil e amplamente utilizado

para obtenção de nanopartículas estáveis em suspensões coloidais aquosas ou em solventes orgânicos (Khan et al., 2011; Li et al., 2012; Henglein; Giersig, 1999).

Para obter nanopartículas coloidais em meio aquoso por meio da redução química é necessário basicamente um agente precursor do íon metálico, um agente redutor e um estabilizante.

Ao utilizar um agente redutor forte, como borohidreto de sódio, um grande número de núcleos é formado, resultando em partículas tipicamente pequenas, menores que 10 nm (Kumar, 2009; Cai et al., 2010; Melo et al., 2012). Enquanto NPAg maiores (50 a 100 nm) são obtidas ao utilizar apenas o reagente citrato de sódio (método Turkevich), pois o íon citrato é um agente redutor fraco. Além disso, citrato interage fracamente com as nanopartículas (Turkevich et al., 1951; Chow; Zukoski, 1994, Pillai; Kamat, 2004).

A escolha do estabilizante é muito crítica porque além da estabilidade ele determina a solubilidade, a reatividade, o tamanho e a forma das nanopartículas (Perez, 2010). Nanopartículas estáveis são obtidas utilizando íons que proporcionam uma interação repulsiva, como citrato (Perez, 2010; Henglein; Giersig, 1999), ou por impedimento estérico, utilizando, por exemplo, polímeros (ex.: polivinilpirrolidona) ou surfactantes (ex.: brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB) (Khan et al., 2011; Li et al., 2012; Yu; Yam, 2005). Assim, por meio da variação da razão entre as quantidades de precursor e do agente de proteção pode-se obter nanopartículas de diferentes tamanhos (Basu et al., 2007). Isso está intimamente relacionado com a relação superfície-volume. Para grandes quantidades de ligante (superfície) em relação ao precursor (volume), a área superficial total que pode ser estabilizada é elevada, assim, são formadas muitas nanopartículas pequenas (Rocha, 2008). Outro fator que influencia o tamanho da partícula é a magnitude da interação entre o estabilizante e o metal. Aqueles que interagem fortemente tendem a formar partículas menores, pois dificultam a incorporação de monômeros ou mesmo os processos de dissolução e aglomeração das partículas (Rocha, 2008).

A fraca interação de muitos estabilizantes com nanopartículas é um dos motivos que dificulta sua aplicação no desenvolvimento de métodos bioanalíticos. As nanopartículas não são estáveis em condições similares às biológicas e a adsorção de proteínas na superfície das nanopartículas também pode levar a uma desestabilização do colóide (Tom et al., 2007; Voicescu; Ionescu; Angelescu, 2012). A substituição do estabilizante por outros ligantes pode ser realizada para obter um

sistema mais estável. NPAg possuem menor estabilidade química quando comparada às de ouro. Neste caso, é mais aconselhável que sua superfície seja funcionalizada para as mais diversas aplicações, principalmente se for utilizado um meio que pode comprometer a integridade do material.

1.6.4. Funcionalização e bioconjugação de nanomateriais metálicos

Nanopartículas metálicas e anticorpos podem ser conjugados por meio da interação direta dessas biomoléculas com a superfície da partícula, ou posteriormente a uma prévia modificação das partículas.

A interação direta de biomoléculas com nanopartículas de metais nobres acontece basicamente por meio da adsorção de regiões hidrofóbicas da biomolécula sobre a superfície metálica; atração eletrostática e ligação covalente entre o metal e os grupos sulfidrilas livres (quimissorção) (Figura 8; Voicescu; Ionescu; Angelescu, 2012; Hermanson, 1996).

A adsorção de biomoléculas sobre nanomateriais pode ser acompanhada da alteração estrutural das proteínas, podendo até mesmo haver perda da estrutura secundária, e a perda da estabilidade do colóide. Em princípio, a interação covalente possui maior efeito na alteração estrutural da proteína, pois quando não há cisteínas disponíveis as ligações dissulfeto intermoleculares (-S-S-) podem ser rompidas para que ocorra a ligação com a nanopartícula, levando a sua agregação (Paul et al., 2006; Gomes, 2009; Voicescu; Ionescu; Angelescu, 2012; Joshi; Soni, 2015).

Figura 8. Representação das interações possíveis entre biomoléculas e NPAu (Hermanson, 1996).

A modificação da superfície da nanopartícula pode proporcionar o aumento da estabilidade do sistema e inserir grupos funcionais para posteriores modificações, como a bioconjugação (Sperling; Parak, 2010; Elias et al., 2013).

A funcionalização das nanopartículas pode direcionar a ligação de proteínas e reduzir interações não específicas dos componentes da matriz com a superfície da nanopartícula, permitindo a formação de bionanoconjugados com diferentes propriedades e funcionalidades. Além disso, uma estabilidade adicional pode ser obtida por meio da funcionalização das nanopartículas. Colóides de ouro, por exemplo, tendem a agregar em elevadas concentrações salinas e de proteínas. Nanopartículas metálicas funcionalizadas com tióis podem permanecer mais dispersas e estáveis em soluções aquosas (Gao et al., 2012; Yuan et al., 2012; Vinik et al., 2009). Na Figura 9 é apresentado um exemplo de uma nanopartícula modificada com um tiol, o ácido mercaptoundecanóico. Neste caso, há uma ligação covalente por meio do grupo $-SH$, enquanto o grupo COO^- pode interagir eletrostaticamente (mais provável) ou por ligações de hidrogênio com os grupos aminas da proteína (Yuan et al., 2011; Gao et al., 2012). A conjugação pode ser realizada também por meio de uma ligação covalente, utilizando um agente de acoplamento, como o 1-etl-(3-dimetilaminopropilo)-carbodiimida/sulfo-N-hidroxi-succinimida (EDC/S-NHS) (Yu; Irudayaraj, 2007; Xu; Ying; Li, 2012; Zhou et al., 2012).

Figura 9. Representação esquemática do bioconjugado citocromo c proveniente de coração de cavalo-ácido mercaptoundecanóico-NPAu (Gao et al., 2012).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu na preparação de suspensões coloidais de nanopartículas de prata visando à aplicação no desenvolvimento de um imunoensaio de agregação para determinação de IgG_h e outras biomoléculas de interesse clínico, como a cromogranina A, a imunoglobulina M humana e o fator IX de coagulação.

As metas principais deste trabalho foram:

- Obter suspensões coloidais monodispersas de NPAg esféricas utilizando diferentes agentes redutores e estabilizante. Caracterizar as NPAg utilizando as técnicas de espectroscopia UV-Vis, espalhamento dinâmico da luz e microscopia eletrônica;
- Obter conjugados estáveis por meio da funcionalização da superfície das nanopartículas;
- Selecionar uma suspensão coloidal de NPAg adequada para o desenvolvimento de um imunoensaio de anti-agregação para determinação de IgG_h.
- Avaliar as condições experimentais e definir os parâmetros ótimos para o imunoensaio. Avaliar a correlação entre a intensidade da agregação, por meio da variação do espectro de absorção e a concentração de IgG_h;
- Avaliar a aplicação da metodologia para a determinação de outras biomoléculas, como a cromogranina A, anti-IgM e fator IX de coagulação;
- Apresentar alternativas para ensaios de bioafinidade baseados na agregação de nanopartículas. Realizar uma modificação do método desenvolvido para determinação de IgG_h com a finalidade de desenvolver uma metodologia baseada no uso de NPAu modificados com aptâmeros para determinação de ATP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

Nitrato de prata (Quimex, 99,5 %); D (+); glicose anidra (Carlo Eba, 99%); hidróxido de sódio (Merk, PA); brometo de hexadeciltrimetilamônio (98%); borohidreto de sódio (99,99 %); adenosina trifosfato dissódico hidratada (99%) e β -ciclodextrina ($\geq 97\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich; ácido mercaptosuccínico (%); citrato de sódio tribásico dihidratado (PA); fosfato de sódio monobásico anidro (PA) e fosfato de sódio bibásico anidro (PA) foram adquiridos da Synth.

Padrão de proteína albumina de soro bovino $1,38 \text{ mg mL}^{-1}$ (BioRad); solução de imunoglobulina G humana 160 mg mL^{-1} com pelo menos 95% de IgG (Berio globina[®]); imunoglobulina G humana liofilizada (95 %; Sigma-Aldrich); soro de anti-IgG humana policlonal H+L; solução de anti-IgG humana H+L policlonal; IgG policlonal anti-cromogranina A de coelho e cromogranina A foram adquiridos da Jackson ImmunoResearch; anti-IgM monoclonal (R1/69) e anti-fator IX de coagulação monoclonal (133-09) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology; amostras das proteínas fator IX de coagulação e IgM humano foram fornecidas pelo Laboratório de Bioprocessos do Instituto Butantan; oligonucleotídeo anti-ATP (5° . CACCTGGGGGAGTA TTGCGGAGGAAGGTT- 3°) foi adquirido da DNA Express Biotecnologia;.

Toda a água utilizada nos experimentos foi purificada pelos sistemas de osmose reversa e eletrodeionização Elix 10 e de ultrapurificação Milli-Q Gradient; ambos da Millipore. Para as medidas de pH foi utilizado pHmetro da marca marcione (modelo PA 200).

3.2. Preparação das NPAg

3.2.1. NPAg preparadas com glicose/ β -ciclodextrina

Em um erlenmeyer foram adicionados 15 mL de uma solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, 15 mL de uma solução de $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de glicose e 30 mL de uma solução $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina. A solução foi aquecida até 60°C sob agitação

constante. Então, foi adicionado 20 mL de AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (uma gota por segundo). O produto foi dialisado para remoção do excesso de reagente.

3.2.2. NPAg preparadas com glicose/CTAB

3.2.2.1. NPAg preparadas sob efeito da sonicação

Foram adicionados 1,1 mL de uma solução alcalina de glicose, recentemente preparada (1 mL da solução de glicose + 100 μL de NaOH 1 mol L^{-1}), a uma solução, sob vigorosa agitação, contendo 1 mL de AgNO_3 100 mmol L^{-1} , 1 mL de CTAB 100 mmol L^{-1} e 6,9 mL de água deionizada. A concentração final de NaOH foi igual a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi mantida sob agitação por 15 minutos e transferida para o ultrassom. Então, foi sonicada por 5 horas a 50°C . Foi avaliada a influência das concentrações de glicose, CTAB e AgNO_3 , por meio da variação dos volumes dos reagentes utilizados. O volume final da reação (10 mL) e a concentração de NaOH mantiveram-se constantes.

3.2.2.2. NPAg preparadas sob efeito da agitação

Foram adicionados 1,1 mL de uma solução alcalina de glicose, recentemente preparada (200 μL de NaOH 1 mol L^{-1} + 2 mL de glicose 100 mmol L^{-1}), a uma solução, sob vigorosa agitação e em ebulição, contendo 0,5 mL de AgNO_3 100 mmol L^{-1} , 1 mL de CTAB 100 mmol L^{-1} e 7,4 mL de água deionizada. A concentração final de NaOH foi igual a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi mantida sob agitação por 30 minutos. Então, a solução foi sonicada por 5 horas a 50°C .

3.2.3. NPAg preparadas com glicose/citrato

A uma solução de 8,9 mL de AgNO_3 5 mmol L^{-1} e citrato de sódio 10 mmol L^{-1} foram adicionados 1,1 mL de uma solução alcalina de glicose preparada previamente (2 mL de glicose 100 mmol L^{-1} + 200 μL de NaOH 1 mol L^{-1}). A reação ocorreu por 15 minutos à temperatura ambiente. A solução resultante foi sonicada a 50°C por 5 horas. Foi avaliada também a influência da concentração de citrato de

sódio. Assim, o procedimento descrito foi realizado utilizando 5 mmol L^{-1} de citrato de sódio.

3.2.4. NPAg preparadas com nanoesferas de carbono

Uma solução aquosa contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de glicose (56 mL) foi mantida por 12 horas em autoclave a 160°C . A solução final contendo as nanoesferas de carbono (NEC) foi purificada por diálise contra água destilada, com trocas sucessivas da água de diálise. A diálise ocorreu por aproximadamente 24 horas à temperatura ambiente. O processo de diálise foi realizado até que não fosse observada significativa alteração do pH da solução da água destilada ($\text{pH} \cong 5,6$).

Foram adicionados $100 \text{ }\mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$ a uma solução, sob vigorosa agitação, contendo 1 mL de nanoesferas e 4 mL de H_2O e 5 mL de uma solução $7,84 \text{ mmol L}^{-1}$ de AgNO_3 . Após 15 minutos a solução foi transferida para o ultrassom, no qual ficou sob sonicação por 5 horas a 50°C .

3.2.5. NPAg preparadas com borohidreto de sódio/citrato

Em um erlenmeyer contendo 80 mL de água deionizada, sob vigorosa agitação, foram adicionados $200 \text{ }\mu\text{L}$ de AgNO_3 100 mmol L^{-1} e $200 \text{ }\mu\text{L}$ de citrato trissódico 100 mmol L^{-1} . Em seguida, uma solução aquosa de NaBH_4 (4,8 mL, 25 mmol L^{-1}) recém preparada foi adicionada rapidamente. A solução permaneceu sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. A solução resultante foi armazenada a 4°C .

3.3. Caracterização das NPAg

3.3.1. Espectroscopia UV-Vis

Para obtenção dos espectros UV-Vis foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis Hitachi U-2010. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm. Os espectros são apresentados em função da absorbância da solução, assumindo-se que a contribuição do espalhamento para a extinção da radiação eletromagnética

é significativamente menor. Os comprimentos de onda da varredura variaram de 270 a 750 nm.

3.3.2. Espalhamento dinâmico da luz e potencial zeta

As medidas do espalhamento dinâmico de luz (DLS; do inglês dynamic light scattering) e potencial zeta foram obtidas utilizando o equipamento MALVERN ZETA SIZER NANO Z 590. As amostras foram sonicadas por aproximadamente 10 minutos antes da realização das medidas. Os valores dos diâmetros médio das nanopartículas obtidos por espalhamento dinâmico da luz foram considerados válidos para amostras que apresentaram índice de polidispersividade iguais ou menores que 0,7.

3.3.3. Microscopia de varredura eletrônica

As imagens foram obtidas por meio do equipamento JEOL-JSM 7401F (FEG). As amostras foram diluídas em água deionizada e sonicadas por aproximadamente 10 minutos. Então, uma pequena gota foi adicionada sobre um substrato de silício. As amostras secaram lentamente à temperatura ambiente.

3.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão

O equipamento MET JEOL JEM 2100 foi utilizado para aquisição das imagens. As amostras foram preparadas por meio da lenta evaporação de uma pequena gota adicionada sobre o suporte de cobre revestido de carbono (GRID): O colóide de NPAg-BH₄ foi adicionado sem diluição prévia. Já a suspensão coloidal de NPAg preparadas com nanoesferas de carbono foi diluída em álcool isopropílico. As amostras foram sonicadas por aproximadamente 10 minutos antes de serem adicionadas no suporte. As micrografias foram utilizadas para obter o diâmetro médio das NPAg-CTAB. O diagrama de distribuição de tamanhos das NPAg foi obtido por meio do programa Image J e organizado em função da frequência do diâmetro das NPAg

3.3.5. Difractometria de raios X

Os difratogramas foram obtidos da amostra na forma pó e foi utilizado o equipamento Rigaku-Mini Flex operando em modo de varredura com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418$; filtro de níquel). A análise foi realizada utilizando uma fenda divergente variável. O intervalo do ângulo de varredura foi de 20 a 80 (2θ) e a velocidade foi igual a 2 (2° min^{-1}). As condições de medida foram: tensão de 30 kW e corrente de 30 mA.

3.4. Imunoensaio de anti-agregação

3.4.1. Obtenção dos conjugados NPAg-anti-IgG_n

3.4.1.1. Funcionalização da superfície das nanopartículas de prata

Na reação com ácido mercaptosuccínio (AMS) foram utilizadas nanopartículas sem qualquer tipo de purificação. A amostra de NPAg preparadas com NaBH_4 /citrato não foi diluída. A uma solução de NPAg foram adicionados diferentes volumes de AMS 20 mmol L^{-1} em microtubos de polipropileno (2 mL). O volume final da reação foi de 500 μL . A solução foi mantida sob agitação (400 rpm) por 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Thermomixer Comfort Eppendorf AG foi utilizado para manter a temperatura e agitação.

Os procedimentos realizados ao utilizar as demais NPAg foram diferentes porque foi necessário utilizar amostras diluídas: em tubo de ensaio foram adicionadas as soluções de NPAg, diferentes concentrações de AMS 20 mmol L^{-1} e água deionizada ($V_f = 500 \mu\text{L}$). Foram utilizados 150 μL de NPAg preparadas com glicose/ β -ciclodextrina, 28 μL de NPAg preparadas com NEC, 20 μL de NPAg preparadas com glicose/CTAB e 15 μL da solução de NPAg preparadas com glicose/citrato. Após verificar que seria necessário utilizar menores concentrações do agente de acoplamento para funcionalizar as nanopartículas preparadas com glicose/ β -ciclodextrina, foi utilizada uma solução 5 mmol L^{-1} de AMS.

O tempo de reação de funcionalização das NPAg preparadas com glicose/citrato foi de 5 horas, enquanto para NPAg preparadas com glicose/CTAB foi

de 24 horas. Para as demais NPAg o tempo de reação de funcionalização foi de 2 horas e 30 minutos.

3.4.1.2. Conjugação dos anticorpos

Após a funcionalização das NPAg, no mesmo tubo de ensaio, foram adicionados 490 μL de uma solução tampão fosfato 10 mol L^{-1} pH 7,5 e 10 μL de uma solução de anti-IgG_h 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ previamente diluída na mesma solução tampão. A solução foi mantida a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 18 horas. O volume final foi igual a 1 mL. No ensaio em que foi utilizado NPAg-citrato a concentração final de anti-IgG_h foi igual a 170 ng mL^{-1} . As amostras foram incubadas por 18 horas. Para avaliar o efeito do tempo de incubação, as amostras obtidas a partir de NPAg preparadas com NaBH_4 /citrato foram incubadas por 18 horas e 36 horas.

3.4.2. Imunoensaio de anti-agregação para determinação de imunoglobulina G humana

As amostras foram retiradas da geladeira uma hora antes do ensaio e mantidas a 15 $^{\circ}\text{C}$. Thermomixer Comfort Eppendorf AG foi utilizado para incubar as amostras. Aos microtubos contendo a solução NPAg-anti-IgG_h foram adicionados 10 μL das soluções de IgG_h de diferentes concentrações (diluídas em solução tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} pH 7,5). Em seguida foram adicionados 10 μL de solução salina de NaClO_4 (2,5 e 3,0 mol L^{-1}). Para os ensaios realizados com NPAg- β -ciclodextrina foram adicionados 25 μL de solução salina 2,5 mol L^{-1} . Os espectros de absorção foram obtidos após 10 minutos. Foram utilizadas cubetas de quartzo. O ensaio realizado com NPAg-citrato foi levemente alterado. Foram adicionados 2 μL da solução padrão dos antígenos e 28 μL da solução salina de NaClO_4 1,0 mol L^{-1} à solução de NPAg-anti-IgG_h. A medida de absorbância foi realizada 10 minutos após a adição do sal.

3.4.2.1. Imunoensaio utilizando NPAg-BH₄

Para avaliar a agregação dos conjugados obtidos (item 3.4.1.2) com o tempo, após a adição da solução salina, foram obtidos espectros de absorbância em

intervalos de 2 minutos (1-17 minutos). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

O tempo decorrido entre a adição do antígeno (IgG_h) e a adição da solução salina também foi analisado. Foram utilizados intervalos de 0 a 240 minutos. A medida de absorbância foi realizada 10 minutos após a adição do sal.

Outros parâmetros avaliados foram o pH da solução tampão (etapa de conjugação), a temperatura da reação e a concentração de NaClO₄ (Tabela 2). O ensaio foi realizado de acordo com o descrito no item 3.4.2.

Tabela 2. Parâmetros avaliados na otimização do imunoenensaio de anti-agregação. Foram utilizadas as NPAg preparadas com NaBH₄. [anti-IgG_h] = 150 ng mL⁻¹.

pH (T = 15 °C/NaClO ₄ = 3,0 mol L ⁻¹)	Temperatura / °C (pH = 7,5/ NaClO ₄ = 3,0 mol L ⁻¹)	NaClO ₄ / mol L ⁻¹ (T = 15 °C/ pH = 7,5)
6,5	15	1
7,5	25	2
8,5	37	2,5
-	-	3,0

3.4.2.2. Procedimento para determinação de imunoglobulina G humana

Foi adicionado 1 µL de uma solução 15 mmol L⁻¹ de AMS a 499 µL da solução de NPAg para realizar a funcionalização. A reação ocorreu por 2 horas e 30 minutos. Após esse período foram adicionados 490 µL de solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 7,5 e 10 µL de uma solução 15 µg mL⁻¹ de anti-IgG_h. O ensaio de agregação foi realizado de acordo com o item 3.4.2. Foram utilizados 10 µL de NaClO₄ 2,5 mol L⁻¹. A concentração de IgG_h variou de 0 a 200 ng mL⁻¹. O ensaio foi realizado em uma temperatura de 15 °C e a medida foi realizada 10 minutos após adição dos reagentes. As medidas foram realizadas em triplicata e as barras de erros representam o desvio padrão da média. O limite de detecção foi determinado pela equação: LD = (s x 3)/IC, na qual s é o desvio padrão das medidas do branco (n = 3) e IC a inclinação da curva obtida.

Foram analisadas amostras, obtidas do plasma humano, em diferentes estágios de purificação da imunoglobulina M. As medidas foram realizadas em duplicatas.

3.4.2.3. Avaliação da seletividade

A seletividade do anticorpo anti-IgG_h com relação à IgG_h foi avaliada de duas maneiras.

Em um primeiro momento, o anticorpo anti-cromgranina A, um anticorpo que não é específico para IgG_h, foi conjugado as NPAg e avaliou-se a resposta ao adicionar IgG_h (100 ng mL⁻¹).

Posteriormente, albumina bovina (1 µg mL⁻¹) e IgG de rato (IgG_c = 100 ng mL⁻¹) e IgG_h (IgG_c = 100 ng mL⁻¹) foram utilizados como analitos no ensaio de anti-agregação para avaliar possíveis interferentes.

Os procedimentos utilizados para funcionalização, conjugação dos anticorpos e realização do ensaio foram iguais àqueles descritos nos itens 3.4.1. e 3.4.2.

3.4.2.4. Determinação de cromogranina, fator IX de coagulação e IgM

O ensaio de anti-agregação foi aplicado à determinação de cromogranina A, fator IX e IgM_h. Foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-fator IX e anti-IgM_h. Para o ensaio realizado para a determinação de cromogranina A (CgA) foi utilizado o anticorpo policlonal anti-cromogranina A (anti-CgA). Os procedimentos utilizados para funcionalização, conjugação dos anticorpos e realização do ensaio foram iguais àqueles descritos nos itens 3.4.1. e 3.4.2.

3.5. Ensaio para determinação de ATP

3.5.1. Preparo das nanopartículas de ouro

As NPAu foram preparadas a partir da redução de HAuCl₄ por citrato (Liu et al., 2014). Uma solução de citrato de sódio (10 mL; 38,8 mmol L⁻¹) foi adicionada rapidamente a uma solução em ebulição e sob vigorosa agitação de HAuCl₄ (100 mL; 1 mmol L⁻¹). Após 20 minutos em ebulição, a solução foi retirada da chapa de aquecimento e resfriou a temperatura ambiente. A solução foi armazenada a 4 °C.

3.5.2. Procedimento para detecção de ATP utilizando NPAu e aptâmeros

Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 μL da solução do aptâmero anti-ATP ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), 5 μL das soluções padrões do ATP e 14 μL de solução tampão Tris HCl 8,0 contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. A reação ocorreu por 10 minutos a 25°C . Então, foi adicionado 230 μL da solução de NPAu e após 3 minutos a solução foi diluída com 470 μL de H_2O deionizada e 300 μL de tampão fosfato 7,4 contendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Os espectros de absorbância foram obtidos 2 minutos após a adição do sal. A concentração de ATP variou de 0 a $40 \mu\text{mol L}^{-1}$. Cubetas de quartzo e cubetas semi-micro em acrílico UVT (caminho óptico de 10 mm) foram utilizadas nas análises por espectroscopia no UV-Vis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados referentes às diferentes etapas realizadas com o propósito de desenvolver um imunoenensaio baseado na anti-agregação de nanopartículas de prata. A IgG_h humana foi o analito inicialmente utilizado. A primeira etapa envolveu a produção e a caracterização das amostras de NPAg utilizadas. A absorção da luz por nanoesferas de prata é resultado da ressonância dos seus elétrons superficiais e é bem conhecido que as propriedades ópticas de nanopartículas metálicas são dependentes do seu tamanho e forma (Xu; Suslick, 2010; Jain et al., 2006; Link; El-Sayde, 1999). Assim, a meta inicial foi controlar a morfologia das nanopartículas preparadas.

Na segunda etapa, todas as amostras de NPAg preparadas foram testadas e apenas uma foi selecionada. Por fim, foram obtidos os parâmetros reacionais ótimos para a análise quantitativa de IgG_h. Após desenvolver o imunoenensaio, ele foi adaptado para a determinação de outras biomoléculas visando ampliar o escopo de aplicação da metodologia.

Considerou-se pertinente apresentar neste trabalho também uma metodologia analítica similar àquela desenvolvida para determinação de IgG_h, ou seja, baseada na agregação de nanopartículas metálicas. Desta maneira, posteriormente, são apresentados e discutidos os resultados referentes a um ensaio baseado na agregação de nanopartículas de ouro para determinação de ATP, no qual foi utilizado aptâmero como elemento de reconhecimento.

4.1. Preparação e caracterização das NPAg

4.1.1. NPAg preparadas com glicose e β -ciclodextrina

As diferentes rotas utilizadas neste trabalho para o preparo de NPAg foram baseadas na redução química, em meio aquoso. Em uma das rotas de preparo das NPAg, apresentada nesta subseção, foram utilizados os reagentes glicose (agente redutor) e β -ciclodextrina (estabilizante). Em todas as rotas o precursor do íon metálico utilizado foi AgNO₃.

Uma suspensão coloidal estável e avermelhada foi obtida ao preparar NPAg com glicose e β -ciclodextrina (NPAg- β -ciclodextrina). A suspensão coloidal foi utilizada para obter o espectro de absorção, que é apresentado na Figura 10. Pode ser observada uma estreita banda de absorção, com um comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) em aproximadamente 410 nm e uma largura a meia altura (LMA) igual a 92 nm. Como mencionado anteriormente, os espectros foram apresentados em função da absorbância da solução, assumindo que a contribuição do espalhamento para a extinção da radiação eletromagnética seja significativamente menor. De maneira geral, os espectros de absorção UV-Vis são úteis para confirmar a formação das NPAg e avaliar a dispersão do colóide obtido (Jiang et al., 2014). Existem trabalhos relatados na literatura que correlacionam também os espectros de absorção com o tamanho e forma das NPAg (Kelly et al., 2003; Baset et al., 2011; Leopold; Lendl, 2003). A presença de apenas uma banda de absorção localizada em aproximadamente 410 nm indica que foram obtidas nanoesferas de prata estáveis com diâmetro médio de aproximadamente 30 nm (Andrade et al., 2015). Ainda, a estreita banda de absorção pode indicar que foram obtidas partículas monodispersas.

Figura 10. Espectro de absorção da suspensão de NPAg- β ciclodextrina.

A amostra de NPAg- β -ciclodextrina foi caracterizada também utilizando a técnica de difração de raios X e o difratograma obtido é apresentado na Figura 11. São observados picos em $12,1^\circ$, $22,8^\circ$ e $32,0^\circ$ (2θ), correspondentes à fase cristalina da β -ciclodextrina (Andrade et al., 2015). Porém, não são observados picos

correspondentes à estrutura cristalina das NPAg. Provavelmente, devido à fase orgânica ter se cristalizado na superfície da partícula (Gopalan; Annaselvi; Subramaniam, 2013).

Figura 11. Difratograma das NPAg-β-ciclodextrina.

As características morfológicas das NPAg foram avaliadas também por MEV e as micrografias obtidas são apresentadas na Figura 12. As micrografias indicam que existem duas populações de NPAg e por meio do diagrama de distribuição do tamanho das NPAg (Figura 12c) percebe-se um domínio da população de nanopartículas com diâmetro médio de 5,1 nm. Já a segunda população de NPAg apresenta um diâmetro médio de 24 nm. Observa-se também que são NPAg esféricas. Ainda, nas micrografias foram observadas estruturas com dimensões muito superiores às das NPAg (> 300 nm), que podem ser cristais de β -ciclodextrina (Figura 12a).

De acordo com Liu e colaboradores (2003), a ciclodextrina mantém interações hidrofóbicas com os pequenos cristais de nanopartículas metálicas, o que limita a coalescência das nanopartículas e, assim, pode levar à formação de nanopartículas menores.

Figura 12. Micrografias das NPAg-β-ciclodextrina: a e b referem-se a diferentes resoluções. Histograma da distribuição de tamanho das NPAg-β-ciclodextrina (c). Número de partículas = 82.

4.1.2. NPAg preparadas com glicose e CTAB

Existem poucos trabalhos na literatura que empregam CTAB na obtenção de NPAg esféricas (Li et al., 2012; Khan et al., 2011). Um dos desafios das metodologias que utilizam o surfactante é a obtenção de suspensões coloidais em que predominam NPAg esféricas e estáveis. A concentração dos reagentes utilizados no preparo de NPAg definem o tamanho, a forma e a estabilidade da suspensão. Por isso, foram avaliadas as concentrações de glicose (agente redutor), CTAB (estabilizante) e AgNO_3 (precursor de Ag^+).

De uma maneira geral, nos primeiros minutos após a adição dos reagentes a coloração da reação mudou de incolor para branca, com um aspecto opalescente, devido supostamente à formação do complexo CTAB- Ag^+ (Li et al., 2012). A

coloração da suspensão alterou-se lentamente e foi obtida uma suspensão concentrada de NPAg, turva e de coloração esverdeada, com aspecto muito semelhante à suspensão de NPAg preparada com glicose e citrato de sódio, que pode ser observada na Figura 19a (subseção 4.1.3).

Os espectros de absorção UV-Vis foram utilizados para avaliar a formação das nanopartículas e para caracterizá-las. Como foi relatado anteriormente, os colóides de NPAg apresentam bandas de absorção características e podem ser utilizados para avaliar a forma, tamanho e estabilidade da dispersão.

Os espectros das suspensões coloidais preparadas com glicose e CTAB (NPAg-CTAB), nas diferentes condições experimentais avaliadas, são apresentados na Figura 13. A presença de uma banda de absorção localizada em aproximadamente 400 nm indica que foram formadas partículas esféricas.

Figura 13. Espectros de absorção das suspensões coloidais de NpAg-CTAB: variação da concentração de glicose (a), CTAB (b) e AgNO₃ (c), em mmol L⁻¹. As concentrações dos demais reagentes foram iguais a 10 mmol L⁻¹.

A concentração de glicose, que foi estudada na faixa de 10 a 40 mmol L⁻¹, exerceu pouca influência na formação das partículas (Figura 13a). Já o aumento da concentração do surfactante CTAB (10 a 40 mmol L⁻¹) proporcionou uma diminuição da intensidade da absorbância e um aumento da largura da banda do plasmon, devido, possivelmente, ao aumento do tamanho das nanopartículas (Figura 13b).

A concentração de Ag⁺ também apresentou um efeito sobre o tamanho das NPAg. Com o aumento da concentração de Ag⁺, provavelmente, ocorreu um aumento do tamanho das partículas, como pode ser observado na Figura 13c.

Deve-se deixar claro que as soluções de NPAg foram previamente diluídas para a obtenção dos espectros de absorção. Para avaliar uma determinada variável foi realizada a mesma diluição para o conjunto de concentrações avaliadas. No entanto, pode haver variações na intensidade dos espectros de absorbância devido às diferentes diluições realizadas para os três parâmetros avaliados.

Figura 14. Espectro de absorção da suspensão coloidal de NPAg-CTAB: [C₆H₁₂O₆] = 10 mmol L⁻¹, [AgNO₃] = 5 mmol L⁻¹ e [Na₃C₆H₅O₇] = 10 mmol L⁻¹.

Baseado na avaliação dessas três variáveis definiu-se uma condição experimental na qual foram utilizados 5 mmol L⁻¹ de Ag⁺, 10 mmol L⁻¹ de CTAB e 10 mmol L⁻¹ de glicose. Assim, foi obtido um colóide de prata que foi caracterizado por uma banda estreita de absorção, como apresentado na Figura 14. O valor da largura a meia altura (LMA) da banda de absorção foi igual a 96 nm e o $\lambda_{\text{máx}}$ localizado em aproximadamente 412 nm. Essas NPAg foram avaliadas também por difração de raios X e MEV.

No difratograma apresentado na Figura 15 pode ser observado que o pico correspondente aos planos (111), em $38,17^\circ$ (2θ), predomina em relação ao pico correspondente aos planos (200), em $45,49^\circ$, que apresentou baixa intensidade. Os picos apresentados entre parêntese e marcados com um asterisco são referentes à estrutura cúbica do AgBr (Yu; Yam, 2005). Esse resultado indica que foram formadas esferas, porque os planos (111) predominam para nanoestruturas de prata que apresentam essa morfologia (Christopher; Linic, 2010), enquanto para nanorodos e nanocubos prevalecem os planos (100) e (200), respectivamente (Siekkinen et al., 2001).

Figura 15. Difratograma das NPAg-CTAB. Os planos indicados entre parêntese e marcados com um asterisco correspondem à estrutura cúbica do AgBr.

Para Ag cristalina com estrutura cúbica de face centrada (fcc) as energias superficiais dos diferentes planos cristalinos são diferentes e seguem a ordem: (111) < (100) < (011) (Wang, 2000). A adsorção seletiva de CTAB em vários planos cristalográficos, devido a fatores termodinâmicos que conduzem a diferentes energias superficiais, pode proporcionar o crescimento de cristais anisotrópicos (Sal; Murphy, 2004; Li et al., 2012). De acordo com Yu e Yam (2005), CTAB provavelmente liga-se mais fortemente aos planos (200) do que aos planos (111) e (110), o que proporciona a maior velocidade de crescimento ao longo da direção (111) e menor velocidade de crescimento de planos (100). No entanto, de acordo com o trabalho apresentado por Li e colaboradores (2012), se o surfactante CTAB está em excesso, ele adsorve em todos os planos e assim são formadas esferas. Na

Figura 16 é apresentada uma das possíveis morfologias de NPAg quando a concentração de CTAB é insuficiente.

Considera-se também que a sonicação favorece a estabilidade do complexo CTA-Br-Ag⁺, sendo assim, o sistema permaneceu mais disperso e homogêneo. Já o uso de um redutor fraco (glicose) possibilita o controle da morfologia do nanocristal em crescimento.

Figura 16. Possível morfologia das NPAg formadas ao utilizar baixas concentrações de CTAB (Liu et al., 2012).

Por meio das micrografias obtidas por MEV, apresentadas nas Figuras 17a e 17b, observa-se que as nanoesferas prevalecem. Ainda, a MEV revela que as nanopartículas tem boa monodispersividade. As NPAg-CTAB possuem um diâmetro médio de 25 nm. O diagrama de distribuição de tamanhos das NPAg pode ser observado na Figura 17c .

A rota de preparo de NPAg-CTAB também foi avaliada alterando-se outros parâmetros experimentais. Por exemplo, o procedimento foi realizado apenas sob agitação e a adição dos reagentes foi realizada com a solução em ebulição, enquanto o tempo de reação utilizado foi de 30 minutos. A agitação torna a metodologia mais simples, no entanto, pode favorecer a formação de partículas com morfologias distintas, como nanobastões e nanofios, conforme pode ser observado nas Figuras 18a e 18b. Entre as possíveis causas, a agitação intensa pode desestabilizar a interação do surfactante com nanocristais de prata, diminuindo a homogeneidade da solução. Esta mudança na incorporação de átomos de prata à partícula pode alterar a morfologia e o tamanho das NPAg.

Figura 17. Micrografias das NPAg-CTAB: (a) e (b) referem-se a imagens obtidas em diferentes regiões e com diferentes resoluções; e (c) histograma de distribuição dos diâmetros das NPAg. (número de partículas = 365).

Na Figura 18c é apresentado o espectro de absorção da suspensão coloidal de NPAg-CTAB preparadas com o uso da agitação. Nota-se uma banda intensa de absorção, que apresenta um $\lambda_{\text{máx}}$ em aproximadamente 410 nm, muito semelhante à observada para soluções colodais de NPAg-CTAB preparadas sob sonicação. Portanto, os espectros de absorção não fornecem informações suficientes para definir a homogeneidade das amostras preparadas.

Figura 18. NPAg-CTAB preparadas por agitação magnética: (a) e (b) são micrografias referentes a imagens obtidas em diferentes regiões e com diferentes resoluções (c) espectro de absorção da suspensão coloidal. $[C_6H_{12}O_6] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[AgNO_3] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$; $[Na_3C_6H_5O_7] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.1.3. NPAg preparadas com glicose e citrato de sódio

O método descrito para obtenção de NPAg por meio de glicose e CTAB foi ligeiramente modificado para obter NPAg reduzidas com glicose e estabilizadas com citrato de sódio (NPAg-citrato). Decidiu-se por substituir o estabilizante CTAB por citrato porque ao realizar a conjugação de NPAg-CTAB com IgG_h a suspensão coloidal resultante apresentou baixa estabilidade. Os resultados referentes à aplicação das NPAg-CTAB no imunoensaio são apresentados e discutidos na subseção 4.2.1.1.

As concentrações molares utilizadas no preparo das NPAg foram iguais àsquelas utilizadas para preparar NPAg-CTAB, ou seja, 10 mmol L^{-1} de glicose, 10 mmol L^{-1} citrato e 5 mmol L^{-1} e $AgNO_3$.

Após a adição da solução alcalina de glicose ao meio contendo citrato e AgNO_3 , ocorre um rápido escurecimento da solução, que se torna rapidamente turva e amarelo-esverdeada. A suspensão coloidal de NPAg obtida pode ser observada na Figura 19a. O espectro de absorção da suspensão coloidal diluída é apresentado na Figura 19b. Observa-se uma banda estreita com uma LMA de 65 nm e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 408 nm. O valor do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda de absorção é semelhante ao verificado para NPAg-CTAB (410 nm), no entanto, a LMA é menor.

O diâmetro médio das NPAg-citrato foi obtido por meio da técnica de DLS. Na Figura 20 é apresentada a distribuição de tamanho das NPAg-citrato. A variação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas seguiu uma distribuição bimodal, com diâmetro médio de 6,4 e 64 nm.

Figura 19. NPAg-citrato: fotografia da suspensão coloidal (a) e espectro de absorbância da suspensão coloidal (b). $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{AgNO}_3] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$.

As NPAg-citrato também foram caracterizadas por difração de raios X. Na Figura 21 é apresentado o difratograma obtido, que contém picos referentes aos planos cristalinos da prata, com valores de 2θ igual $38,1^\circ$ (111); $44,2^\circ$ (200); $64,5^\circ$ (220) e $77,5^\circ$ (333) (Agasti; Kavshik, 2014). Picos referentes a outros materiais cristalinos não foram observados.

Figura 20. Histograma da distribuição dos tamanhos das NPAg-citrato. Valores obtidos da por meio da técnica DLS.

Figura 21. Difratograma das NPAg-citrato.

Os valores dos potenciais de redução do citrato de sódio ($E^{\circ} = -0,180 \text{ V}$) e da glicose ($E^{\circ} = -0,05 \text{ V}$) são bem inferiores ao do borohidreto de sódio ($E^{\circ} = -0,418 \text{ V}$), o que favorece a formação de nanopartículas maiores (Hoonacker; Englebiehner, 2006). Os potenciais de redução indicam que o citrato atua como agente redutor. Já os grupos hidroxila da glicose proporcionam a estabilização da NPAg por passivação, podendo, por exemplo, evitar a agregação e aumentar o período de estabilidade durante o tempo de estocagem (Ortega-Arroyo, et al., 2013). O citrato também estabiliza as nanopartículas por meio de grupos carboxílicos. Henglein e Giersig (1999) observaram que ao utilizar concentrações elevadas de citrato para obtenção de NPAg, empregando a redução por radiólise, há um favorecimento da coalescência de partículas, levando à formação de partículas com tamanho maior.

Por outro lado, ao utilizar concentrações muito baixas de citrato, o cristal pode não ser eficientemente estabilizado, o que leva à formação de partículas mais largas.

Figura 22. Micrografia das NPAg-citrato. Imagem obtida por MEV. $[C_6H_{12}O_6] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[AgNO_3] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[Na_3C_6H_5O_7] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$.

Então, para avaliar o efeito da concentração de citrato sódico, uma concentração igual a 5 mmol L^{-1} desse reagente foi utilizada no preparo das NPAg-citrato. Portanto, a razão molar entre a Ag^+ e citrato foi 1:1. Na Figura 23 são apresentados os espectros de absorbância das suspensões coloidais de NPAg-citrato preparadas com 10 mmol L^{-1} e 5 mmol L^{-1} de citrato. Os espectros de absorção para as diferentes concentrações de citrato são similares.

Já na Figura 24 (a e b) podem ser observadas as micrografias das NPAg obtidas ao utilizar menor concentração de citrato. Não há um efetivo controle da forma das partículas e as nanopartículas maiores predominam. Cabe esclarecer que, de maneira similar ao observado para NPAg-CTAB, a conjugação dos anticorpos (anti-IgG_h) a essas NPAg levou a uma diminuição da estabilidade coloidal. Por outro lado, ao utilizar NPAg-citrato preparadas com 10 mmol L^{-1} de citrato, os resultados foram mais satisfatórios. Os resultados serão apresentados na subseção 4.3.3.

Por fim, notou-se que todas as nanopartículas preparadas por meio da redução com glicose e citrato, ou seja, as NPAg- β -ciclodextrina, NPAg-CTAB e NPAg-citrato apresentaram tamanhos superiores às preparadas por meio da redução com borohidreto de sódio e estabilizadas com citrato de sódio (Doty et al., 2015; Melo et al., 2012). A utilização de um agente redutor fraco leva à formação de

poucas sementes e crescimento lento das partículas, o que frequentemente proporciona a formação de cristais maiores (Pillai; Kamat; 2004).

Figura 23. Espectros de absorvância das suspensões coloidais de NPAg-citrato preparadas com diferentes concentrações de citrato de sódio. $[C_6H_{12}O_6] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[AgNO_3] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 24. Micrografias das NPAg-citrato: (a) e (b) referem-se a imagens obtidas em diferentes regiões e com diferentes resoluções. $[C_6H_{12}O_6] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[Na_3C_6H_5O_7] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$; $[AgNO_3] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.1.4. NPAg preparadas com nanoesferas de carbono

As nanoesferas de carbono (NEC) foram preparadas por meio do tratamento hidrotérmico de uma solução aquosa de glicose. As NEC foram utilizadas para preparar as nanopartículas de prata (NEC-NPAg), aquelas atuam tanto como agente redutor como agente estabilizante. Por meio da redução com NEC foi obtida uma suspensão coloidal concentrada de NEC-NPAg, turva, e com coloração verde

escuro. Cabe dizer que, ao realizar a diluição de todas as NPAg obtidas neste trabalho como uma solução concentrada, uma suspensão coloidal com coloração amarela foi observada. Na Figura 25 é apresentada a fotografia das NEC-NPAg (Figura 25a) e os espectros de absorção das suspensões coloidais de NEC e NEC-NPAg (Figura 25b). No espectro de absorção da solução de NEC-NPAg é observada uma estreita banda de absorção, similar à observada para as demais nanopartículas preparadas, com uma largura a meia altura de 62 nm e um comprimento de máxima absorção em aproximadamente 402 nm.

Figura 25. NPAg-EC: Fotografia da suspensão coloidal de NEC-NPAg (a) e espectros de absorção das suspensões coloidais de NEC e de NEC-NPAg (b).

O mecanismo simplificado da reação de formação de NEC envolve a desidratação do hidrato de carbono no primeiro passo, e subsequente carbonização dos compostos orgânicos previamente formados. O esquema das etapas de formação das nanoesferas de carbono é apresentado na Figura 26. Grupos -OH e grupos -C=O, formados a partir de carboidratos parcialmente ou não desidratados, estão distribuídos na superfície da esfera, o que confere hidrofiliabilidade a esta região da esfera (Titirici et al., 2006; Sun; Li, 2004). Esses grupos podem reduzir Ag^+ e proporcionar estabilidade às microesferas em sistemas aquosos (Sun; Li, 2004). As NEC foram tratadas com NaOH para aumentar a densidade dos grupos ativos, o que pode proporcionar o aumento da adsorção de íons metálicos (Huang et al., 2014; Song et al., 2011). Song e colaboradores (2011) verificaram que o tratamento da estrutura de carbono com NaOH proporciona um aumento da adsorção e redução de Ag^+ à prata metálica, devido ao aumento de grupos funcionais na superfície das

NEC, como grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ e carboxílico. O grupo de Song também sugere que o carboxilato atua como um grupo quelante para o metal, e $-\text{CH}_2\text{OH}$ atua como um redutor.

Figura 26. Esquema que representa um modelo para as etapas de formação das NEC. (Sun; Li, 2004).

De acordo com alguns trabalhos reportados na literatura, o tratamento com uma base forte modifica a superfície da NEC sem aumentar a área superficial e não há uma alteração significativa da massa do núcleo da estrutura de carbono (Chen; Wu, 2004; Song et al., 2011).

A técnica DLS foi utilizada para realizar a análise da distribuição dos tamanhos das NEC e das NEC-NPAg. Os gráficos são apresentados na Figura 27. Os resultados revelam que NEC apresentavam diâmetro médio hidrodinâmico de aproximadamente 54 nm, e as NEC-NPAg apresentavam diâmetro médio hidrodinâmico de aproximadamente 36 nm. Uma possível explicação para a diminuição do diâmetro médio é a alteração da hidrofiliicidade da superfície das nanoesferas proporcionada pela adsorção da prata metálica.

Na Figura 28 são apresentados os difratogramas das NEC e das NEC-NPAg. No difratograma das NEC, não são observados picos bem definidos. O sinal provavelmente é proveniente do substrato. No difratograma obtido das NEC-NPAg foram indexados picos referentes aos planos cristalográficos (111), (200), (220) e (222) da estrutura fcc da Ag^0 (Li et al., 2012).

O produto do tratamento hidrotérmico da glicose foi também caracterizado por meio da MEV para verificar a formação das NEC. Na micrografia obtida, apresentada

na Figura 29, foram observadas nanoestruturas com morfologia esférica e relativamente uniformes. Formaram-se esferas menores que 100 nm.

Figura 27. Histograma da distribuição dos tamanhos das NEC (a) e NEC-NPAg (b). Valores obtidos por meio da técnica DLS.

Figura 28. Difratoograma das NEC e das NEC-NPAg.

Para encontrar evidências com relação à adsorção da prata sobre as NEC, o que comprovaria a formação de partículas de configuração *core-shell*, o produto obtido do preparo de NPAg com NEC foi avaliado por TEM. As imagens das NEC-NPAg são apresentadas na Figura 30 a, b e c. Por meio das micrografias não foi possível afirmar se houve o recobrimento das nanoesferas com o metal. Neste caso, uma análise de microscopia eletrônica de transmissão por difração de elétrons poderia ser utilizada. No entanto, como será apresentado na subseção 4.3.2, as NEC-NPAg mostraram-se inadequadas para a aplicação no imunensaio, por isso, não foram realizadas outras caracterizações.

Figura 29. Micrografia das NEC. Imagem obtida por MEV.

Figura 30. Micrografias das NEC-NPAg em diferentes resoluções e regiões da amostra: 50 nm (a) 20 nm (b) e 10 nm (c). Imagens obtidas por MET.

Song e seus colaboradores (2011) encontram evidências que a esfera de carbono reduz o íon metálico e que a prata fica adsorvida na sua superfície. Mas é importante ressaltar que no trabalho publicado por esses autores foram utilizadas

esferas bem maiores, que apresentavam 400 a 500 nm de diâmetro, e as condições reacionais foram diferentes.

Apesar das nanopartículas esféricas prevalecerem, outras estruturas são observadas. As imagens indicam também que as nanopartículas podem ter muitos defeitos estruturais.

As estruturas das sementes são primeiramente determinadas pela energia da superfície. A superfície de NPAg menores que 20-10 nm geralmente é um poliedro, constituídos de planos (111) e (100) (Wang; 2000; Kumar, 2009). Os estágios de nucleação e crescimento são críticos para definição da forma dos nanocristais. O crescimento será influenciado por alguns fatores, como a concentração do precursor, a velocidade de nucleação, a presença do agente de capeamento, e mais importante ainda, sua adsorção nos diferentes planos cristalográficos (Kumar, 2009).

A alta tensão superficial, baixa energia de macla (falha no empilhamento dos átomos) e a baixa energia de superfície dos planos compactos (111) dos metais fcc somados ao aumento da relação superfície/volume podem levar a modificações estruturais significativas das nanopartículas metálicas. Além da contração nas distâncias interatômicas, outro defeito observado é a formação de estruturas denominadas partículas multi-macladas (*Multiply Twinned Particles* - MTPs) (Zanchet, 1999). A geminação ou macla é um dos defeitos planares mais comuns em nanocristais e é frequentemente observada para nanocristais de fcc, sendo resultado de dois subgrãos que compartilham de um plano cristalográfico comum (Wang, 2000). No preparo de pequenas nanopartículas metálicas, a cristalização geralmente ocorre com a formação de partículas com morfologia decaedra ou icosaedra (MTPs), que contém vários limites individuais. A estrutura icosaedra, como pode ser observada na Figura 24c, é composta por 20 subunidades tetraédricas com 30 limites individuais, resultando em uma superfície delimitada por 20 planos (111), e ao contrário de sólidos cristalinos típicos, as partículas icosaédricas não são cristais únicos. As estruturas MTPs não ocorrem apenas em metais fcc, mas também em materiais relacionados, como carbono e silício (Marks, 1984; Wu et al., 2012; Patala; Marks; Cruz, 2013). Do ponto de vista termodinâmico, acredita-se que as nanopartículas icosaédricas são estáveis apenas em tamanhos muito pequenos (Patala, 2013).

As MTPs (decaedro e icosaedro), apesar de não serem estruturas cristalográficas, são formadas por um conjunto de tetraedros distorcidos que mantêm

uma relação angular (orientação) bem definida, gerando um padrão de difração próprio (Zanchet, 1999).

A fim de compensar a deformação causada pela estrutura dos defeitos de geminação o cristal geminado tende também a crescer ao longo da direção axial (Li et al., 2012).

Na Figura 30c também é observada uma nanoesfera que apresenta um espaçamento interplanar de 0,23 nm, que é coerente com o plano (111) da estrutura fcc da prata (Temgire; Joshi, 2004), o que pode indicar que cristais simples também foram formados.

Outros defeitos cristalinos são comuns em nanopartículas, como as falhas de empilhamento. Além disso, nanocristais têm maior energia de superfície, por isso, segundo Wang (2000), é possível que os defeitos de superfície sejam abundantes.

4.1.5. Nanopartículas preparadas com borohidreto de sódio

Uma suspensão coloidal estável de NPAg e de coloração amarela foi obtida por meio da redução de AgNO_3 com NaBH_4 (NPAg- BH_4), como pode ser observado na Figura 31a. O espectro da solução de NPAg indica que o $\lambda_{\text{máx}}$ ocorre em aproximadamente 393 nm (Figura 31b), enquanto a largura a meia altura é igual 62 nm. Esses valores são inferiores ao verificado para as demais NPAg preparadas.

Segundo Polte e colaboradores (2012), quatro etapas envolvem a formação de nanopartículas reduzidas com NaBH_4 , que são formadas por coalescência. A redução é rápida na primeira etapa e proporciona a formação de pequenos aglomerados metálicos (dímeros, trímeros, etc). Ocorre a coalescência dos aglomerados até o momento em que as partículas alcançam maior estabilidade. Nesse período as partículas têm um intervalo de tamanho intermediário e elevada polidispersividade. Há um período metaestável e ocorre uma nova coalescência, então, são formadas nanopartículas menos polidispersas.

A técnica DLS foi utilizada para avaliar a distribuição dos tamanhos das NPAg- BH_4 e os resultados indicaram a formação de nanopartículas com diâmetro médio hidrodinâmico de aproximadamente 2,1 nm. A utilização de um agente redutor forte, como o NaBH_4 , geralmente proporciona a formação de um grande número de núcleos e, portanto, as partículas formadas são relativamente pequenas, entre 2 a 3 nm (Liu, Guyot-Sionnest, 2005; Wilcoxon, Provencio, 2004). Mas, segundo Kumar

(2009), os valores obtidos para o diâmetro médio de NPAg preparadas com NaBH_4 muitas vezes é superestimado quando se utiliza a TEM, por exemplo, devido à aglomeração das nanopartículas no suporte de cobre sob o bombardeamento de elétrons.

Figura 31. NPAg- BH_4 : fotografia da solução obtida (a) e espectro de absorvância (b).

O difratograma das NPAg- BH_4 é apresentado na Figura 32. É possível observar os picos referentes aos planos (111) e (200) da prata.

Figura 32. Difratograma das NPAg- BH_4 .

As imagens obtidas por MET são apresentadas na Figura 33. Observa-se a formação de nanopartículas muito pequenas e dispersas. Grandes aglomerados também foram observados. A redução com NaBH_4 na presença de citrato

geralmente incluem nanocristais multiplanares. Como comentado anteriormente, as energias superficiais dos diferentes planos cristalinos são diferentes, o que induz a formação de planos nos pequenos cristais. Para NPAg com diâmetro médio inferior a 10 nm a superfície geralmente é um poliedro e constituída de planos (111) e (100). Os múltiplos planos parecem reduzir a energia da superfície pela exposição de planos mais estáveis e planos (111). Além de cristais simples, pequenos aglomerados de metais nobres comumente apresentam cristais geminados, sendo geralmente reconhecido como um decaedro, no qual o cristal tem cinco limites individuais e são todos planos (111). (Wang, 2000; Liu; Guyot-Sionnest, 2005; Kumar, 2009).

Figura 33. Micrografias das NPAg-BH₄. Imagens obtidas por MET.

4.1.6. Tamanho e polidispersividade das NPAg preparadas

Na subseção anterior foram apresentados os resultados referentes ao preparo e caracterização das NPAg. Na Tabela 3 são apresentados os diâmetros médios das NPAg preparadas, os $\lambda_{\text{máx}}$ e a largura a meia altura. Entende-se que não é adequado realizar uma comparação direta do perfil dos espectros obtidos e o diâmetro médio das NPAg preparadas. Uma vez que foram obtidas partículas com distribuição bimodais e as nanopartículas são estabilizadas por diferentes agentes de capeamento. Discussões sobre as propriedades ópticas e o tamanho das nanopartículas metálicas restringem-se a solução de nanopartículas metálicas com estreita distribuição de tamanho (Kreibig; Genzel, 1985; Link; El-Sayed, 1999). Porém, algumas observações podem ser feitas. A banda de absorção plasmônica

das NPAg-CTAB é deslocada para o vermelho com relação às demais partículas, e a largura da banda também é maior. Já o diâmetro médio das NPAg-CTAB é relativamente pequeno. Em tamanhos de partícula com cerca de 3 a 20 nm, não há uma forte dependência entre o espectro de absorção com o tamanho de partícula. Neste caso, as partículas estão abaixo do tamanho em que termos de ordens superiores tornam-se relevantes para a constante de absorção, de acordo com a fórmula de Mie, sendo considerado apenas o termo dipolo, que depende apenas da concentração total do metal na solução e não do tamanho da partícula (Henglein, 1993). Para partículas maiores, a aproximação do dipolo não é mais válida, e a ressonância dependerá explicitamente do tamanho (Link; El-Sayed, 1999; Link; El-Sayed, 2000).

Tabela 3. Largura a meia altura (LMA), comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) e diâmetro médio das NPAg preparadas: NPAg-CTAB (1), NPAg- β -ciclodextrina (2), NPAg-citrato (3), NEC-NPAg (4) e NPAg- NaBH_4 (5). A unidade de todos os parâmetros é apresentada em nm.

NPAg	1	2	3	4	5
$\lambda_{\text{máx}}$	412	410	408	402	393
LMA	96	92	65	62	62
Diâmetro médio ^a	-	-	6 e 64	36	3
Diâmetro médio ^b	26	5 e 24	-	-	-

Valores obtidos da por meio da técnica DLS^a e Microscopia eletrônica (MEV/TEM)^b.

A existência de poucos nanobastões pode ter proporcionado o deslocamento da banda de absorção para maiores comprimento de onda, pois o deslocamento da banda é influenciado mais significativamente pela alteração da morfologia em comparação ao aumento do tamanho. Liz-Marzán observou que o aumento do diâmetro de NPAu de 10 para 100 nm leva a um deslocamento de 47 nm, enquanto para elipsoides, uma mudança na razão de 2,5 para 3,5 promove um deslocamento da banda longitudinal do plasmon de 92 nm (Liz-Marzán, 2006). Além disso, se uma molécula adsorvida altera o índice de refração do meio ou a densidade de carga da superfície, espera-se que haja uma alteração da posição do máximo de absorção (Henglein, 1993). Também, uma das possíveis causas da variação dos espectros obtidos para as diferentes nanopartículas.

A alteração da constante dielétrica do material circundante, por exemplo, também terá um efeito sobre a frequência de oscilação devido à variação da capacidade da superfície para acomodar a densidade de cargas eletrônicas das nanopartículas. Com a mudança do solvente há uma mudança da constante dielétrica, mas o material de cobertura é mais importante na determinação do deslocamento da ressonância de plasmon devido à natureza local do seu efeito sobre a superfície das nanopartículas (Eustis; El-Sayed, 2005).

Por fim, foram obtidas NPAg com diferentes tamanhos, polidispersividades e em diferentes meios. Por isso, espera-se que ocorra uma considerável variação entre os resultados obtidos durante as etapas de conjugação e realização do ensaio.

4.2. Imunoensaio de anti-agregação

Como descrito previamente, o procedimento de detecção do imunoensaio para determinação de IgG_h baseia-se em um mecanismo de anti-agregação, em que a ligação do analito ao anticorpo que reveste as AgNP tem a função de impedir a agregação, induzida por meio da variação da força iônica, devido ao aumento da repulsão eletrostática entre as partículas (Yuan et al., 2012).

Na Figura 34 é apresentado o esquema do imunoensaio de anti-agregação, que envolve duas etapas preliminares: a funcionalização com ácido mercaptosuccínico (AMS) e a conjugação com anticorpo policlonal anti-IgG_h. Após o preparo dos conjugados, é realizado o ensaio de anti-agregação, que consiste na adição das soluções de diferentes concentrações de IgG_h, seguida da adição da solução salina (NaClO₄). A alteração da estabilidade coloidal foi avaliada por meio do espectro de absorção. Cabe dizer que o NaClO₄ possui uma baixa capacidade complexante. Além disso, é considerado um eletrólito inerte, por isso frequentemente é utilizado para o ajuste da força iônica (Urbansky, 1998).

As NPAg preparadas neste trabalho foram utilizadas sem prévia purificação, pois alguns procedimentos, como a centrifugação, podem modificá-las parcialmente. Além disso, a remoção do agente estabilizante pode proporcionar a agregação da suspensão coloidal (Ma et al., 2013; Chang et al., 2005). As NPAg foram diluídas para o preparo dos conjugados, exceto aquela preparada com NaBH₄. A diluição foi definida de acordo com a absorbância final do sistema coloidal contendo os conjugados ($\approx 1,2$). A funcionalização e a conjugação consistiram basicamente na

reação do ácido mercaptossuccínico (AMS) com as NPAg (2h30min), seguida da adição do tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 7,5) e anticorpo (150 ng mL^{-1} de anti-IgG_h). A solução foi então incubada a 4°C por 18 horas e a suspensão coloidal final, composta por conjugados dos anticorpos acoplados às NPAg (NPAg-anti-IgG_h), foi então utilizada no imunoensaio de anti-agregação, que envolve poucas etapas. À suspensão coloidal contendo NAg-anti-IgG_h foi adicionada a solução padrão de IgG_h e em seguida a solução salina ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$). Após 10 minutos foi realizada a medida de absorvância. Apesar de ter sido observada uma pequena variação na velocidade da agregação para os diferentes sistemas, a agregação foi completa em aproximadamente 10 minutos.

Figura 34. Esquema do imunoensaio baseado na anti-agregação de NPAg.

Inicialmente, realizou-se um estudo sobre a influência das concentrações de AMS e anti-IgG_h sobre a conjugação com objetivo de obter um sistema coloidal estável. Em algumas condições experimentais observou-se uma agregação intensa e irreversível durante a conjugação. Do mesmo modo, a concentração de AMS influenciou também significativamente a variação da agregação após a adição do sal. Sendo assim, avaliou-se a agregação dos sistemas coloidais funcionalizados com diferentes concentrações de AMS após a adição da solução salina.

Portanto, serão apresentados e discutidos primeiramente os resultados relacionados aos assuntos abordados acima. Então, serão apresentados os resultados referentes aos ensaios realizados com os conjugados obtidos a partir das NPAg preparadas.

4.2.1. Funcionalização e estabilidade dos conjugados

A conjugação da anti-IgG_h às NPAg foi realizada utilizando um reagente de acoplamento, o AMS. Esse ácido pode estabilizar as nanopartículas por passivação, por meio de grupos sulfidrilas (tiol) e carboxílicos (Yuan et al., 2012). Trabalhos reportados na literatura indicam que carboxilatos residuais estão presentes na superfície da partícula (Zaluzhna et al., 2011; Sumesh, 2011) e podem interagir eletrostaticamente com grupos aminas residuais do anticorpo. Além de dificultar a interação de proteínas com a superfície da nanopartículas metálica, o AMS proporciona uma estabilidade adicional ao sistema e pode impedir a intensa agregação observada em colóides de NPAg não funcionalizadas (Botasini; Mendez, 2013). O procedimento é simples. A conjugação ocorre por meio da interação eletrostática entre os grupos residuais do AMS e do anticorpo. É importante ressaltar que este tipo de conjugação pode ser tão eficiente quanto àquela realizada por ligação covalente com os grupos aminas das proteínas (Yuan et al., 2011).

A concentração de AMS exerceu forte influência na estabilidade do conjugado, sendo que comportamentos inversos foram observados para os diferentes sistemas coloidais. Assim, os resultados serão apresentados de acordo com o efeito observado para as diferentes NPAg utilizadas.

4.2.1.1. Efeito desestabilizante proporcionado pelo aumento da concentração de AMS

Inicialmente é importante dizer que as suspensões coloidais de todas as NPAg funcionalizadas apresentavam coloração amarela, e a agregação foi evidenciada pela mudança da coloração da solução. Neste caso, a coloração da solução está correlacionada à agregação das NPAg e depende das propriedades dos parâmetros estruturais dos agregados (Basu et al., 2007). Mas, em todos os casos, em um primeiro estágio da agregação, o sistema coloidal torna-se laranja ou vermelho.

A concentração de AMS exerceu grande influência na conjugação das NPAg-NaBH₄. Como pode ser observado na Figura 35, a conjugação realizada com 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMS e 300 ng mL⁻¹ de anticorpo resultou em um sistema (NPAg-anti-IgG_h) aparentemente estável. Entretanto, há uma intensa atenuação da intensidade de absorção. Após a adição do antígeno, não foi observada uma alteração

significativa do sistema coloidal. Os espectros foram obtidos após 18 horas de incubação. A diminuição da concentração de AMS ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) proporcionou a obtenção de um sistema coloidal que permaneceu estável por pelo menos 36 horas de incubação. O valor do potencial zeta obtido para NPAg foi igual a $-37,7 \text{ mv}$. Após a conjugação o valor do potencial zeta, em módulo, diminui ($\xi = -26,4 \text{ mv}$), o que sugere que o anticorpo liga-se as nanopartículas por meio de ligações de hidrogênio e interação eletrostática, havendo interação entre os grupos aminoterminais da proteína e os grupos carboxilas terminais do AMS (Yuan et al., 2012). Neste caso, a concentração de anticorpo não interferiu na estabilidade do sistema. Ao utilizar 150 ou 300 ng mL^{-1} , o sistema coloidal permaneceu estável e nenhuma mudança significativa foi observada após a adição de IgG_h . O conjugado foi armazenado por pelo menos uma semana a 4°C e, mais uma vez, nenhuma mudança foi observada.

A intensidade da agregação de NPAg-anti- IgG_h durante a realização do ensaio também está relacionada à concentração de AMS. A avaliação inicial da intensidade da agregação consistiu na adição de NaClO_4 à solução NPAg-anti- IgG_h .

Os espectros de absorção foram utilizados para correlacionar os diferentes estágios da agregação. Foi utilizada a razão entre os valores da absorbância em 396 nm (A_{396}) e em 564 nm (A_{564}), ou seja, A_{396} / A_{564} , sendo que A_{396} e A_{564} representam a quantidade relativa de NPAg dispersas e agregadas, respectivamente.

Ao analisar os gráficos da Figura 36, percebe-se que o aumento da concentração de agente de funcionalização proporciona um aumento da intensidade da agregação. Cabe ressaltar que ao funcionalizar as NPAg- BH_4 constatou-se que concentrações muito baixas do ácido ($<10 \mu\text{mol L}^{-1}$) são pouco efetivas para manter a estabilidade das nanopartículas, pois uma intensa agregação foi observada após adição do sal. Assim, fica evidente a relevância e eficiência da funcionalização.

Diversos fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais, como o tamanho, potencial de superfície e influência da dupla camada elétrica das nanopartículas e agregados (Basu et al., 2007). O potencial zeta das nanopartículas diminui após a funcionalização e conjugação, de $-37,8 \text{ mv}$ para $-26,0 \text{ mv}$. No entanto, entende-se que a alteração da força iônica proporcionada pelo aumento da concentração do ácido, ionizado neste pH e em excesso na solução, é a maior causa da diminuição da estabilidade do sistema coloidal.

Figura 35. Estabilidade de NPAg-BH₄ após a conjugação, antes e após a adição de IgG_h. A concentração de AMS variou em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de anti-IgG_h e IgG_h em ng mL^{-1} .

Figura 36. Espectros de absorção das sistemas coloidais de NPAg-anti-IgG_h após adição de NaClO₄ (29 mmol L^{-1}): variação da concentração de AMS (anti-IgG_h = 150 ng mL^{-1}).

Um efeito negativo proporcionado pelo aumento da concentração de AMS também foi observado ao utilizar NPAg estabilizadas com CTAB. Além disso, foi mais difícil obter conjugados estáveis. O aumento da concentração de AMS proporcionou o aumento da instabilidade do sistema coloidal. Ao utilizar $0,3$ e 3 mmol L^{-1} de AMS ($\text{IgG}_h = 150 \text{ ng mL}^{-1}$) ocorreu a agregação das NPAg após a adição da solução tampão. Já ao utilizar $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ de AMS, a solução permaneceu estável após a adição do tampão, entretanto, após 16 h incubadas, precipitaram completamente, como pode ser constatado na Figura 37.

O procedimento adequado para obtenção de conjugados consistiu no aumento do tempo de reação com o ácido mercaptossuccínico para 24 h e na diluição das

NPAg-CTAB com uma solução de CTAB 100 mmol L^{-1} . Foi utilizado um procedimento similar ao relatado por Xu e colaboradores (2013). Deve-se dizer que ao alterar somente o tempo de reação para 24 horas, diluindo a suspensão coloidal com água destilada, também foram obtidos conjugados instáveis. Esses resultados indicam que a diluição das NPAg-CTAB com água destilada proporcionou uma diminuição da concentração de CTAB, promovendo assim a desestabilização das nanopartículas.

Figura 37. Fotografia das NPAg-CTAB precipitadas após a conjugação.

A baixa estabilidade coloidal de nanopartículas metálicas preparadas com CTAB e modificadas com tióis já foi relatada em outros trabalhos (Ma, 2014). Wang e colaboradores (2012) realizaram estudos sobre a funcionalização de nanobastões de ouro que prepararam utilizando sementes de prata. Os pesquisadores notaram que a presença de prata metálica e íons prata exerce uma influência negativa na funcionalização. Segundo os próprios pesquisadores, os íons prata, devido à formação de um complexo estável com CTAB, impedem a ligação do tiol. A ineficiente funcionalização das NPAg-CTAB preparadas no presente trabalho pode ter proporcionado baixa estabilidade ao sistema coloidal obtido.

A menor estabilidade de nanopartículas também pode ser relacionada ao seu tamanho. Uma vez que forças de van der Waals são proporcionais às dimensões das partículas, as maiores tendem a agregar primeiro (Doty et al., 2005). Assim, nanopartículas menores podem proporcionar conjugados mais estáveis (Liu et al., 2009; Szymanski; Porter 2013). Porém, como foram preparadas suspensões coloidais com diferentes índices de polidispersividade e utilizando diferentes estabilizantes, é incorreto correlacionar os resultados obtidos com o tamanho médio das NPAg.

Após o preparo dos conjugados a partir de NPAg-CTAB, foi avaliada a agregação devido à variação da força iônica. No entanto, ao adicionar o sal ocorreu

a gelificação do colóide. Por isso, não foram realizados novos experimentos utilizando essas nanopartículas.

4.2.1.2. Aumento da estabilidade das NPAg proporcionado pelo aumento da concentração de AMS

Ao utilizar NPAg-citrato e NPAg- β -ciclodextrina verificou-se que o aumento da concentração de AMS utilizada na funcionalização proporcionou um aumento da estabilidade do sistema coloidal de NPAg-anti-IgG_h. Na Figura 38 são apresentados os espectros dos conjugados preparados a partir de NPAg-citrato. Um pequeno deslocamento e alargamento da banda de absorção plasmônica foram observados. A agregação foi evidenciada também pela alteração da coloração da solução, que adquiriu uma tonalidade laranja. O aumento da concentração de AMS proporcionou um leve aumento da estabilidade.

Figura 38. Espectros de absorvância das suspensões coloidais de NPAg-citrato obtidos após a conjugação (NPAg = 15 μ L; anti-IgG_h = 170 ng mL⁻¹) em diferentes concentrações de AMS.

O aumento da estabilidade com o aumento da concentração do agente de funcionalização foi também observado ao variar a força iônica. Na Figura 39 são mostrados os espectros de absorvância obtidos, após a adição do sal, das soluções de NPAg-anti-IgG_h funcionalizadas com 400 μ mol L⁻¹ e 800 μ mol L⁻¹. Nota-se que a agregação foi mais intensa para o sistema coloidal funcionalizado com 400 μ mol L⁻¹ de AMS.

A conjugação das NPAg- β -ciclodextrina com anticorpos foi realizada utilizando concentrações de AMS que variaram de 10 a $10^3 \mu\text{mol L}^{-1}$. Não foi observada nenhuma alteração significativa da coloração das soluções obtidas, ou seja, todas as soluções permaneceram aparentemente estáveis após a conjugação.

Figura 39. Espectros de absorção das suspensões coloidais de NPAg-anti-IgG_h após adição de NaClO₄ (27 mmol L⁻¹): variação da concentração de AMS. (anti-IgG_h = 170 ng mL⁻¹).

Os conjugados obtidos a partir de NPAg- β -ciclodextrina mostraram-se também altamente estáveis frente à variação da força iônica. Ao utilizar baixas concentrações de NaClO₄, o sistema permaneceu estável. Assim, foi necessária uma elevada concentração de NaClO₄ (60 mmol L⁻¹) para promover a agregação dos conjugados obtidos a partir de NPAg- β -ciclodextrina. Os espectros de absorção das suspensões coloidais das NPAg funcionalizadas com diferentes concentrações de AMS são apresentados na Figura 40. Uma significativa alteração do espectro de absorção foi observada ao utilizar $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMS, devido à intensa agregação. Mas houve um aumento da estabilidade com o aumento da concentração de AMS.

Figura 40. Espectros de absorção das soluções de NPAg-anti-IgG_h funcionalizadas com diferentes concentrações de AMS, após adição de NaClO₄ (60 mmol L⁻¹). [Ab] = 150 ng mL⁻¹.

As β-ciclodextrina são polissacarídeos cíclicos e possuem uma estrutura semelhante a um cone trancado (toroidal) com uma cavidade hidrofóbica e um exterior hidrofílico (Cannavà et al., 2008). Liu e colaboradores acreditam que devido à interação hidrofóbica entre as nanopartículas e β-ciclodextrina, aquelas são menos propensas a agregação (Liu et al., 2003). Mas, apesar da β-ciclodextrina ser conhecida pela capacidade de formar complexos de inclusão com pequenas moléculas hidrofóbicas, alguns autores relatam que não encontraram evidências que as nanopartículas metálicas estão incluídas nas cavidades hidrofóbicas das moléculas de β-ciclodextrina (Liu et al., 2003; Jaiswal; 2010; Andrade et al., 2014). Assim, em princípio, a inclusão das NPAg na cavidade da β-ciclodextrina não seria o motivo da elevada estabilidade das suspensões coloidais de NPAg-β-ciclodextrina. Polímeros conferem elevada estabilidade à NPAu devido ao grande impedimento estérico proporcionado (Gao et al., 2012), e entende-se que seja o motivo principal da maior estabilidade observada para esses sistemas.

As soluções de NEC-NPAg também permaneceram estáveis após a conjugação. As concentrações de AMS utilizadas na funcionalização variaram de 20 a 1000 μmol L⁻¹. Entretanto, nenhuma correlação foi observada entre a intensidade de agregação e concentração do agente de funcionalização.

4.3. Imunoensaio de anti-agregação para determinação de IgG_h

O perfil dos espectros de agregação das NPAg variou para as diferentes soluções preparadas. A padronização dos procedimentos tornou-se difícil devido às características particulares das suspensões coloidais. Deste modo, algumas alterações foram realizadas para poder avaliar o efeito da variação da concentração do antígeno (IgG_h). De acordo com os resultados apresentados anteriormente, a concentração de AMS e NaClO₄ foram previamente definidas.

4.3.1. NPAg- β -ciclodextrina

As NPAg preparadas com β -ciclodextrina proporcionaram a obtenção de conjugados altamente estáveis, por isso, uma elevada concentração de NaClO₄ foi utilizada (60 mmol L⁻¹) para avaliar o efeito da presença de IgG_h sobre os sistemas contendo os conjugados NPAg-anti-IgG_h. Convém recordar que apenas foi possível observar a agregação ao utilizar uma baixa concentração de AMS (10 μ mol L⁻¹), e a concentração de anticorpo utilizada na conjugação foi igual a 150 ng mL⁻¹. Uma coloração laranja estável foi observada após a adição do sal, analogamente ao observado anteriormente. Ao variar as concentrações de IgG_h, uma alteração pouco significativa da coloração e do deslocamento da banda de absorção foi observada (Figura 41a). Ao aumentar a concentração de anticorpo conjugado às NPAg, 300 ng mL⁻¹, ocorreu um leve deslocamento e aumento da banda de absorção máxima (Figura 41b). Neste caso, a banda de absorção plasmônica correspondente às NPAg separadas alterou-se de 420 a 428 nm ao variar a concentração de IgG_h de 0 para 300 ng mL⁻¹. Observa-se um deslocamento mais significativo para a banda correspondente à interação dipolo-dipolo das NPAg, podendo ter ocorrido um aumento da proximidade e tamanho dos agregados.

De acordo com o trabalho apresentado por Wang e Irudayaraj (2008), o deslocamento da banda plasmônica ocorre devido à interação da proteína com a superfície da nanopartícula metálica. Dessa maneira, há um aumento do nível de refração local, ou seja, ao redor da partícula. Assim, com relação ao ensaio realizado com as NPAg- β -ciclodextrina, é possível que as nanopartículas não tenham sido completamente funcionalizadas.

Figura 41. Espectros de absorção dos sistemas coloidais de conjugados obtidos a partir de NPAg- β -ciclodextrina. A medida foi realizada após adição de diferentes concentrações de IgG_h (0 a 300 ng mL⁻¹) e sal (NaClO₄ = 60 mmol L⁻¹): ao utilizar 150 ng mL⁻¹ (a) e 300 de anti-IgG_h¹ (b). [AMS] = 10 μ mol L⁻¹.

Mas outros motivos podem proporcionar o deslocamento da banda plasmônica. Como mencionado previamente, o deslocamento da banda máxima de absorção ocorre com o aumento do tamanho das nanopartículas. Além disso, o deslocamento também pode ser devido à agregação em razão da curta distância entre as partículas (Basu et al. 2012). O coeficiente de extinção das nanopartículas agregadas depende do tamanho das partículas primárias, do tamanho e da topologia do agregado e das nanopartículas e, também, da polarização e da direção de propagação da onda incidente. O aumento da dimensão dos agregados, por exemplo, pode proporcionar o deslocamento da banda de absorção plasmônica para o vermelho, o que pode ocorrer também quando o número de nanopartículas no agregado mantém-se constante, mas a distância entre elas diminui (Quinten, 2001; Kumar, 2009).

Por fim, são vários os fatores responsáveis pela alteração da banda plasmônica das nanopartículas metálicas. Mais importante ainda, os resultados indicam que não foi observada uma diminuição da agregação proporcionada pela presença do antígeno (IgG_h). Por isso, entende-se que as NPAg- β -ciclodextrina não são adequadas para a realização do imunoensaio proposto.

Aachmann e colaboradores (2003) observaram que os resíduos aromáticos das proteínas podem interagir com as cadeias laterais da ciclodextrina. Entre as observações realizadas pelos autores destaca-se que a interação pode alterar a função da proteína, sendo o efeito muito particular para cada biomolécula. Assim, é

possível que ocorra uma alteração estrutural da anti-IgG_h devido à interação com a β -ciclodextrina, afetando a interação antígeno-anticorpo.

4.3.2. NEC-NPAg

Embora as NEC-NPAg tenham permanecido estáveis durante a conjugação, uma agregação intensa foi observada após a adição do sal. Ocorreu uma transição de coloração das suspensões coloidais que correspondem aos diferentes estágios de agregação: amarela, laranja, verde e cinza escuro. Na Figura 42 são apresentados os espectros obtidos dos sistemas coloidais de NPAg-anti-IgG_h, após a agregação, para diferentes concentrações de IgG_h. Nota-se que o aumento da concentração de IgG_h proporcionou um aumento da dispersão das NPAg. No entanto, um máximo foi observado ao utilizar 25 ng mL⁻¹ de IgG_h. Os valores obtidos da razão A_{396}/A_{640} estão inseridos na Tabela 4.

Observa-se nos espectros de absorção (Figura 42) uma diminuição da banda localizada em 400 nm e o surgimento de uma banda em aproximadamente 640 nm de igual intensidade ($A_{396}/A_{640} = 1,05$), que correspondente ao forte efeito de acoplamento eletrodinâmico das nanopartículas. O perfil do espectro de absorção é diferente daquele observado ao utilizar NPAg-BH₄ (subseção 4.2.1.1), que pode ser verificado na Figura 42. No espectro de absorção do sistema coloidal de conjugados obtidos a partir de NPAg-BH₄, a última banda de absorção localizou-se em aproximadamente 560 nm.

Novamente podem-se utilizar as características dos agregados para explicar os resultados apresentados acima. Quando as nanopartículas que compõe o agregado estão enfileiradas, por exemplo, a banda de absorção é proporcional número de partículas e da distância entre elas. Uma tendência similar é observada para NPAg agregadas de forma aleatória. Com o aumento do tamanho dos agregados há um alargamento e deslocamento da banda de absorção. Além disso, a banda de absorção primária pode se dividir em diversas novas ressonâncias, que é proporcional ao número de partículas que compõem o agregado (Kumar, 2009).

Figura 42. Espectros de absorção das suspensões coloidais dos conjugados obtidos a partir de NPAg-β-ciclodextrina, após adição de diferentes concentrações de IgG_h (0, 25, 50, 100, 150 ng mL⁻¹) e sal (NaClO₄ = 24 mmol L⁻¹). [anti-IgG_h] = 150 ng mL⁻¹.

Tabela 4. Valores obtidos para A_{396}/A_{640} em função da concentração de IgG_h.

[IgG _h] / ng mL ⁻¹	0	25	50	100	150
A_{396}/A_{640}	1,045	1,927	1,061	1,182	1,466

4.3.3. NPAg-citrato

De maneira semelhante ao que ocorreu com NEC-NPAg, a agregação das NPAg-citrato resultou em uma diminuição da banda em 408 nm e o surgimento de uma nova banda de absorção em aproximadamente 640 nm. Observou-se, sequencialmente, a alteração da coloração da solução, proporcionada pelos diferentes estágios de agregação do sistema. No início amarela, a solução torna-se laranja, verde e, então, cinza. A razão A_{408}/A_{564} foi utilizada para acompanhar o processo de anti-agregação.

Nas Figuras 43 a 46 são apresentados os espectros de absorção obtidos nos ensaios realizados. Foram utilizadas diferentes concentrações de AMS para funcionalizar as NPAg (200, 400, 600 e 800 μmol L⁻¹). Como demonstrado anteriormente, o aumento da concentração de AMS, de maneira geral, proporcionou a diminuição da agregação da solução de NPAg-anti-IgG_h preparadas a partir das NPAg-citrato.

Figura 43. Espectro de absorção dos sistemas coloidais de NPAg-anti-IgG_h obtido após a adição do sal e diferentes concentrações de IgG_h, que variou de 0 a 400 ng mL⁻¹. (a). Correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h (b). [Anti-IgG_h] = 170 ng mL⁻¹ e [AMS] = 200 μmol L⁻¹.

Figura 44. Espectro de absorção dos sistemas coloidais de NPAg-anti-IgG_h obtido após a adição do sal e diferentes concentrações de IgG_h, que variou de 0 a 400 ng mL⁻¹. (a). Correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h (b). [Anti-IgG_h] = 170 ng mL⁻¹ e [AMS] = 400 μmol L⁻¹.

Figura 45. Espectro de absorção dos sistemas coloidais de NPAg-anti-IgG_h obtido após a adição do sal e diferentes concentrações de IgG_h, que variou de 0 a 400 ng mL⁻¹. (a). Correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h (b). [Anti-IgG_h] = 170 ng mL⁻¹ e [AMS] = 600 μmol L⁻¹.

Figura 46. Espectro de absorção dos sistemas coloidais de NPAg-anti-IgG_h obtido após a adição do sal e diferentes concentrações de IgG_h, que variou de 0 a 400 ng mL⁻¹ (a). Correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h (b). [Anti-IgG_h] = 170 ng mL⁻¹ e [AMS] = 800 μ mol L⁻¹.

Os resultados apresentados na Figura 43b ([AMS] = 200 μ mol L⁻¹) e Figura 44b ([AMS] = 400 μ mol L⁻¹) indicam que com o aumento da concentração de IgG_h a agregação é menos intensa (A_{408}/A_{564}). Verifica-se uma resposta muito similar para os dois sistemas.

Os resultados também foram semelhantes ao utilizar 600 e 800 μ mol L⁻¹ de AMS, como pode ser visto nas Figuras 45 (a e b) e 46 (a e b). A diminuição da agregação é observada até uma concentração de IgG_h de 200 ng mL⁻¹.

A banda proveniente do acoplamento eletrodinâmico das nanopartículas depende do tamanho do agregado, como foi comentado anteriormente. Além disso, a banda de absorção primária pode se dividir proporcionalmente ao número de partículas no agregado, devido ao surgimento de novas ressonâncias (Kumar, 2009), como pode ser observado nos espectros apresentados nas Figuras 44 e 45.

Observou-se um crescente aumento da estabilização proporcionada pela presença de IgG_h. As NPAg-citrato seriam supostamente adequadas para o imunoensaio de anti-agregação. Apesar disso, partículas com formas pouco definidas e com duas distribuições de tamanho foram obtidas, o que pode proporcionar um baixo controle no preparo dos conjugados. O número de moléculas necessárias para a modificação química da superfície pode variar muito e a reprodutibilidade dos ensaios pode ser comprometida.

4.3.4. NPAg-NaBH₄

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, com o aumento da concentração do AMS utilizado na funcionalização das NPAg-BH₄ há uma diminuição da agregação. Esse efeito pode ser observado na Figura 47. Na Figura 47a é possível observar os espectros de absorção obtidos das soluções dos conjugados, que foram funcionalizados com 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMS, nas quais foram adicionadas diferentes concentrações de IgG_h e da solução salina. Percebe-se que não há uma diferença significativa entre os espectros de absorção obtidos, ou seja, das bandas de absorção plasmônica. Por outro lado, a funcionalização com 240 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMS proporcionou uma intensa agregação da suspensão coloidal de NPAg-anti-IgG_h (Figura 47f).

O resultado obtido da razão A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h para diferentes concentrações de AMS empregadas na funcionalização das nanopartículas é apresentado na Figura 48. Ao utilizar 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMS, observou-se uma correlação aparentemente linear entre A_{396}/A_{564} e a concentração de IgG_h até 100 ng mL⁻¹. Percebe-se que há uma diminuição da sensibilidade do ensaio com o aumento da concentração de AMS utilizado na funcionalização das NPAg. Um efeito semelhante já foi reportado na literatura (Yuan et al., 2011, Yuan et al., 2012).

Estes resultados foram satisfatórios, por isso optou-se por utilizar as NPAg-BH₄ para desenvolver o imunoensaio. Adicionalmente, o preparo destas nanopartículas é fácil e reprodutível, o que levou a um maior controle sobre o processo de funcionalização. Por fim, deu-se seguimento à avaliação dos parâmetros experimentais relevantes para a obtenção de um imunoensaio de anti-agregação para determinação de IgG_h.

Figura 47. Espectros de absorção das suspensões coloidais de NPAg-anti-IgG_h obtidos após a adição de NaClO₄ e diferentes concentrações de IgG_h, que variou de 0 a 250 ng mL⁻¹. As NPAg foram funcionalizadas com diferentes [AMS], em μmol L⁻¹: a) 40; b) 80; c) 120; d) 170; e) 200 e f) 240. [anti-IgG_h] = 150 ng mL⁻¹ e [NaClO₄] = 29 mmol L⁻¹.

Figura 48. Correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h . Resultados obtidos dos imunoenaios realizados com NPAg-BH₄ funcionalizadas com diferentes concentrações de AMS.

4.3.4.1. Avaliação dos parâmetros experimentais

Como observado anteriormente, com o aumento da concentração de AMS há uma diminuição da estabilidade do sistema coloidal e o efeito proporcionado pela presença de IgG_h foi minimizado, o que ocasionou uma diminuição da sensibilidade do ensaio. Dessa maneira, para a obtenção dos demais parâmetros experimentais, quando preparado um novo lote de nanopartículas, avaliou-se primeiramente a concentração de AMS utilizada nos experimentos. A concentração de AMS considerada ótima foi aquela na qual houve uma agregação considerável do sistema coloidal, entretanto, não acentuada a ponto da intensidade da banda correspondente ao estado agregado ($\lambda = 564$ nm) se torne igual ou maior que a intensidade da banda correspondente a suspensão coloidal dispersa ($\lambda \cong 396$ nm). Os espectros correspondentes a uma avaliação realizada são apresentados na Figura 49. Observa-se que ao utilizar $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMS a agregação ocorre em um estágio intermediário. Neste caso, considerou-se adequada essa concentração para funcionalização desse lote de NPAg.

Mesmo que preparadas por meio de protocolos bem estabelecidos e buscando máxima reprodutibilidade, de maneira geral, espera-se que ocorram pequenas variações com relação à forma e diâmetro médio das nanopartículas e, assim, sua área superficial. Supõe-se, portanto, que haja uma pequena alteração da

concentração de AMS considerada adequada para a funcionalização de diferentes lotes de nanopartículas.

Consequentemente, durante a apresentação dos resultados, a concentração de AMS utilizada pode variar. Além disso, espera-se que haja uma pequena variação da resposta ótima. Contudo, considera-se que algumas variáveis sejam independentes da concentração do agente de funcionalização, como a temperatura.

Figura 49. Espectros de absorção das suspensões coloidais de NPAg–Anti-IgG_h, funcionalizadas com diferentes concentrações de AMS, após a adição de NaClO₄ (29 mmol L⁻¹). [Anti-IgG_h] = 150 ng mL⁻¹.

Após os estudos sobre a influência da concentração de AMS, foi avaliada a influência da concentração do anticorpo anti-IgG_h, que foi estudada na faixa de 150 a 900 ng mL⁻¹. Houve uma diminuição da agregação proporcional à concentração de IgG_h ao utilizar 150 ng mL⁻¹ e 300 ng mL⁻¹ de anticorpo. Esses resultados são apresentados na Figura 50 e Figura 51, respectivamente. Ao utilizar 150 ng mL⁻¹ de anticorpo a diminuição da agregação foi mais evidente e variou aparentemente de forma linear até 250 ng mL⁻¹ de IgG_h (Figura 50b). O decréscimo do sinal em maiores concentrações de antígeno pode ser proporcionado pela saturação dos sítios de ligação. A variação da agregação foi menos significativa ao utilizar 300 ng mL⁻¹ de anticorpo (Figura 51a) e estabilizou em uma concentração de 100 ng mL⁻¹ de IgG_h.

Ao utilizar 700 ng mL⁻¹ (Figura 52a) e 900 ng mL⁻¹ (Figura 52b) de anticorpo uma variação menos significativa foi observada.

Figura 50. Ensaio de anti-agregação utilizando 150 ng mL⁻¹ de anticorpo: a [IgG_h] variou de 0 a 450 ng mL⁻¹ (a); correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h (b). [AMS] = 20 μ mol L⁻¹.

Figura 51. Ensaio de anti-agregação utilizando 300 ng mL⁻¹ de anticorpo: a [IgG_h] variou de 0 a 450 ng mL⁻¹ (a); correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h (b). [AMS] = 20 μ mol L⁻¹.

Existem protocolos de imunoenaios baseados na desestabilização de nanopartículas de ouro em consequência da interação do antígeno com o anticorpo conjugado à nanopartícula (Thanh, Rosenzweig, 2002; Yuan et al., 2011). A frequência de colisões efetivas, que depende da densidade dos sítios ativos, é um dos fatores considerados importantes no processo de agregação e de anti-agregação (Thanh, Rosenzweig, 2002; Yuan et al., 2012). Portanto, com o aumento da concentração de anticorpo deve haver um aumento da densidade dos sítios ativos. No entanto, notou-se que o efeito proporcionado pela presença de IgG_h foi menos significativo ao utilizar maiores concentrações de anticorpo. Possivelmente, um excesso de anticorpos livres, ou seja, não conjugados, pode interferir no processo de anti-agregação.

Figura 52. Ensaio de anti-agregação utilizando 750 ng mL^{-1} (a) e 900 ng mL^{-1} (b) de anticorpo. A $[\text{IgG}_h]$ variou de 0 a 450 ng mL^{-1} . $[\text{AMS}] = 20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

O tempo de incubação do antígeno (100 ng mL^{-1}) também foi avaliado. Considerou-se o tempo de incubação o intervalo entre a adição do antígeno e a adição do sal. A agregação das NPAg variou pouco para um tempo de incubação de até 60 minutos, como pode ser observado na Figura 53. Observa-se que com o aumento do tempo de incubação há um aumento da agregação. Ao incubar o antígeno com o anticorpo por duas horas foi observada uma significativa agregação. Um resultado muito semelhante foi obtido ao utilizar 50 ng mL^{-1} de antígeno. Estes resultados sugerem que maiores tempos de incubação não proporcionam um aumento da sensibilidade do ensaio.

Figura 53. Variação da agregação do sistema coloidal ao utilizar diferentes tempos de incubação, em minutos. $[\text{AMS}] = 20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{anti-IgG}_h] = 150 \text{ ng mL}^{-1}$; $[\text{IgG}_h] = 100 \text{ ng mL}^{-1}$.

A interação antígeno-anticorpo envolve uma série de reações consecutivas (Diamandis; Christopoulos, 1996) que pode levar a formação de precipitados, de acordo com a equação 3 descrita abaixo:

na qual Ab é o anticorpo, Ag é o antígeno, (AgAb)_x é um complexo primário formado, AbAg é uma estrutura solúvel de composição variável e k e k' são as constantes de velocidade de associação e dissociação, respectivamente ($k_1 > k_1'$ e $k_1 \gg k_2$ ou k_3).

No imunoensaio de anti-agregação também há primeiramente a ligação do antígeno. Ao utilizar os anticorpos em soluções diluídas, pode ser considerado que existe uma ligação univalente e de segunda ordem. Já em um segundo estágio há uma aproximação de analitos que não estão ligados à sonda NPAg-Ab para formar agregados (Yuan et al., 2012; Diamandis; Christopoulos, 1996). Esses estágios levam certo tempo para ocorrer e considera-se que a ligação entre o antígeno e o anticorpo é rápida devido à elevada afinidade entre eles (Yuan et al., 2012). Por isso, menores tempos de reação favorecem a anti-agregação.

O soro de anticorpos IgG_h foi utilizado nos estudos das variáveis apresentadas até o momento. O soro é formado prioritariamente por anticorpos específicos para o antígeno de interesse e são comumente empregados no desenvolvimento de imunoensaios. Mas, para avaliar a influência do pH, temperatura e força iônica optou-se por utilizar anticorpos policlonais anti-IgG_h purificado, pretendendo obter resultados mais precisos e reprodutíveis.

Assim, a influência do pH no imunoensaio de anti-agregação foi avaliada. A razão A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h é apresentada na Figura 54. Ao utilizar soluções com pH 6,5 e 7,5, foi observada uma relação crescente entre as concentrações de antígeno e a diminuição da agregação. Além disso, não foi observada uma diferença significativa entre essas duas condições. Em pH 7,0 a relação A_{396}/A_{564} permaneceu constante para as diferentes concentrações de IgG_h utilizadas. Embora IgG_h apresente maior estabilidade em pH 7,0, há maior tendência à agregação devido à proximidade do ponto isoelétrico da maioria das moléculas envolvidas, ou seja, dos anticorpos (Szenczi et al., 2006). NPAg, por exemplo,

formam aglomerados reversíveis com caseína (NPAg-caseína) em valores de pH próximos do ponto isoelétrico da proteína, provavelmente devido às ligações de hidrogênio, interação carga- π e interações hidrofóbicas entre as biomoléculas (Ashraf et al., 2013). Além disso, a distribuição de carga das moléculas envolvidas é um fator que tem grande influência no processo de estabilização do sistema.

Figura 54. Variação da agregação do sistema coloidal ao utilizar diferentes pH (6,5; 7,0; 7,5): correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h. [AMS] = 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [IgG_h] = 150 ng mL^{-1} ; [NaClO₄] = 29 mmol L^{-1} .

De acordo com alguns trabalhos reportados na literatura, a reestabilização de colóides de partículas de látex conjugadas a IgG_h, com o aumento da força iônica, é proporcionada por forças de hidratação (Dávalos-Patoja et al. 2001; Molina-Bolívar et al., 1998). A desidratação parcial de íons adsorvidos e/ou grupos carregados devido à aproximação de duas superfícies resultará no aumento da energia do sistema, levando a um aumento da força repulsiva, sendo que este efeito é mais pronunciado para superfícies hidrofílicas (Leikin; Kornyshev, 2001; Dávalos-Patoja et al., 2001). Assim, sugere-se que o processo de anti-agregação possa ser influenciado pelo caráter (hidrofóbico/hidrofílico) das moléculas envolvidas. Em pH 7,0, há a proximidade do ponto isoelétrico da maioria das imunoglobulinas (Szenczi et al., 2006), deste modo, tanto forças eletrostáticas repulsivas como as força de hidratação poderão ser minimizadas neste pH. Ao desenvolver imunoenaios de agregação, alguns autores verificaram que o pH ótimo foi igual a 7,0 (Du et al., 2008; Thanh; Rosenzweig, 2002; Xu et al., 2013), o que novamente pode ser explicado pela minimização dessas forças repulsivas.

A influência da temperatura também foi avaliada. Os ensaios foram realizados a 15 °C, 25 °C e 37 °C e os resultados são apresentados na Figura 55. Ao analisar a correlação entre a concentração de IgG_h e a variação da agregação das nanopartículas (A_{396}/A_{564}) observa-se uma sensibilidade maior ao utilizar a temperatura de 15 °C. Este resultado é coerente com aqueles apresentados por outros grupos de pesquisa (Thanh; Rosenzweig, 2002; Yuan et al., 2011; Yuan et al., 2012), que indicam que a temperatura ótima para realização de imunoensaios baseados na agregação de nanopartículas está entre 15-25 °C. Embora as velocidades das reações químicas geralmente aumentem com a temperatura, a reação de agregação envolve uma variação negativa na entropia ($\Delta S < 0$). Portanto, com o aumento da temperatura há um aumento da energia livre (ΔG) e uma diminuição da estabilidade do agregado formado. Entretanto, de acordo com Thanh e Rosenzweig (2002), temperaturas muito baixas (4 °C) podem também aumentar a ocorrência de agregações inespecíficas. Por esse motivo não foram avaliadas temperaturas inferiores a 15 °C.

Figura 55. Variação da agregação do sistema coloidal ao utilizar diferentes temperaturas: correlação entre A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgG_h. [AMS] = 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [anti-IgG_h] = 150 ng mL^{-1} .

Outra observação relevante com respeito aos resultados obtidos em diferentes temperaturas é que em concentrações $\geq 150 \text{ ng mL}^{-1}$ ocorre um efeito contrário ao efeito gancho (do inglês *hook effect*). Em ensaios de agregação, o efeito gancho leva a uma diminuição do sinal devido ao excesso de antígeno que promove a inibição da agregação (Byun et al., 2013). Assim, resultados falsos negativos podem ser

observados, sendo que o efeito pode ser comprovado por meio da diluição da amostra. É importante dizer que, neste caso, a resposta analítica, inclusive a faixa linear, está sujeita a muitas variáveis e de maneira significativa dependerá da concentração do agente de funcionalização e da força iônica do meio.

A concentração de NaClO_4 foi estudada considerando que a concentração de AMS exerceu forte influência sobre a intensidade da agregação, e para que fosse avaliada a influência da concentração salina foi necessário, primeiramente, avaliar a influência da concentração de AMS em diferentes concentrações de sal. Como pode ser observado na Figura 56, ao utilizar $9,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de NaClO_4 e $40\text{-}120 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMS a agregação foi pouco significativa, o que pode proporcionar uma baixa sensibilidade e pequena faixa de resposta. Uma agregação considerável foi observada ao utilizar $80 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMS e 20 mmol L^{-1} de NaClO_4 , no entanto, a sensibilidade do ensaio nestas condições experimentais foi pouco significativa, devido provavelmente à elevada concentração de agente de funcionalização utilizado que interferiu negativamente.

A força iônica é um fator crítico no desempenho do ensaio, já que uma baixa concentração pode prejudicar a sensibilidade do ensaio e uma elevada concentração pode reduzir o efeito proporcionado pela presença do antígeno (Yuan et al., 2011).

Figura 56. Variação da agregação do sistema coloidal ao utilizar diferentes concentrações salinas e de AMS: espectros obtidos ao utilizar $9,8 \text{ mmol L}^{-1}$ (a) e 20 mmol L^{-1} (b) de NaClO_4 . $[\text{anti-IgG}_h] = 150 \text{ ng mL}^{-1}$.

Du e colaboradores (2008) desenvolveram um imunoensaio para determinação de IgG_h baseado na agregação de NPAu. Neste caso, a variação da força iônica foi um recurso utilizado para promover a agregação, por isso, foi avaliada. Du e

colaboradores observaram que em uma estreita faixa de concentração salina, de aproximadamente 20 a 27 mmol L⁻¹ de NaCl, a IgG_h não induziu o sistema à agregação. Ao contrário disso, houve um aumento da estabilidade do sistema. Devido aos resultados mencionados acima, decidiu-se fazer uma nova avaliação sobre a concentração de NaClO₄. Desta maneira, uma concentração salina igual a 24 mmol L⁻¹ foi utilizada com o objetivo de obter melhores resultados e a melhor resposta analítica foi obtida nesta condição. O resultado é apresentado na próxima subseção (4.3.4.2).

Uma prévia avaliação havia sido realizada sobre a variação dos estágios de agregação do sistema com o tempo após a adição do sal, que foi reavaliada após definidos os parâmetros analíticos. Por meio da Figura 57 é possível observar a variação da agregação, representada pela razão A_{396}/A_{564} . Nos primeiros minutos observou-se uma rápida variação dos estágios de agregação. Mas, em aproximadamente 10 minutos, o sistema apresenta significativa estabilidade. Percebe-se também que a presença de IgG_h não causa uma variação relevante na velocidade da agregação. Assim sendo, considerou-se apropriado realizar as medidas de absorbância 10 minutos após a adição da concentração salina.

Figura 57. Agregação da suspensão coloidal de NPAg-anti-IgG_h em função do tempo, na presença e ausência de IgG_h. [NaClO₄]: 24 mmol L⁻¹; [anti-IgG_h] = 150 ng mL⁻¹; [AMS] = 30 μmol L⁻¹.

4.3.4.2. Determinação de imunoglobulina G humana

Após a avaliação das variáveis experimentais, utilizou-se uma condição considerada adequada para a realização do imunoensaio de anti-agregação. Na Figura 58 são apresentados os espectros do ensaio de anti-agregação obtidos para diferentes concentrações de IgG_h. É evidente que há um aumento da estabilidade do sistema com o aumento da concentração do analito. Na Figura 59a é apresentado o resultado da correlação entre a concentração de IgG_h e a razão entre as absorbâncias em diferentes comprimentos de onda (A_{396}/A_{564}). Uma resposta linear define o sinal medido para concentrações de IgG_h entre 0 a 200 ng mL⁻¹ de ($A_{396}/A_{564} = 0,06 + 0013 [\text{IgG}_h]$; $r = 0,9508$). O limite de detecção foi estimado em 25 ng mL⁻¹. É importante destacar que ferramentas quimiométricas podem ser empregadas para avaliar o sinal analítico obtido, buscando melhores razões entre os comprimentos de ondas utilizados e as concentrações do analito. Na Figura 59B, por exemplo, é apresentado o gráfico obtido da razão entre as intensidades de absorbância em 405 nm e 564 nm em função da concentração de IgG_h. Neste caso, a correlação entre os pontos é maior ($r = 0,9634$) e os desvios relacionados a algumas medidas também diminui. Assim, pode haver um aumento da sensibilidade.

Figura 58. Imunoensaio de anti-agregação para determinação de IgG_h; a concentração do analito variou de 0 a 200 ng mL⁻¹. [anti-IgG_h] = 150 ng mL⁻¹; [AMS] = 30 μmol L⁻¹; pH 7,5. [NaClO₄] = 24 mmol L⁻¹.

Figura 59. Correlação entre A_{396}/A_{564} (a) ou A_{405}/A_{564} (b) e a concentração de IgG_h (0, 25, 50, 100, 150 e 200 ng mL⁻¹).

Por meio do imunoensaio de anti-agregação é possível detectar IgG_h em concentrações próximas ou mesmo inferiores à detecção proporcionada por alguns métodos Elisa e radioimunoensaios (Woo et al., 1979; Kan, Verspaget; Peña, 1983). Kan e colaboradores (1983), por exemplo, desenvolveram um Elisa para determinação de IgG_h que apresentou uma faixa linear de 12,5 a 100 ng mL⁻¹. Como previamente relatado na primeira parte deste trabalho, estes métodos, especialmente o Elisa, são os mais empregados quando é necessário determinar baixas concentrações IgG_h e outras biomoléculas de interesse clínico, como a cromogranina A (Delfos, 1991; Stridsberg et al., 2003; Vinik et al., 2009) e o fator IX de coagulação (Chaves et al., 2006; Ørstavik; Ørstavik, 1981). Como apresentado nas subseções 4.3.5 e 4.3.7, o método foi aplicado também para a determinação dessas biomoléculas. Cabe dizer que o imunoensaio baseado na anti-agregação de NPAg é de fácil execução e apresenta um baixo custo de análise.

É importante destacar que, de uma maneira geral, os métodos baseados na agregação de nanopartículas metálicas podem ser automatizados com maior facilidade que o Elisa, por exemplo, devido ao menor número de etapas envolvidas (Thanh; Rosenzweig, 2002).

É pertinente comentar também que para avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido neste trabalho para determinação de IgG_h, foram analisadas amostras obtidas do plasma humano em diferentes estágios de purificação da imunoglobulina M. As amostras foram fornecidas pelo Instituto Butantan. O plasma foi purificado sequencialmente utilizando as técnicas de cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade. Foi analisada uma

amostra obtida no segundo estágio de purificação e outra obtida no último estágio de purificação. Os resultados obtidos foram coerentes com os resultados esperados. De acordo com eles, a concentração de IgG_h na amostra obtida do segundo estágio de purificação ($0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) é maior do que a concentração de IgG_h na amostra obtida do terceiro estágio ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.3.4.3. Resposta de IgG_h ao utilizar os anticorpos anti-cromogranina A conjugados às NPAg

Para verificar se a diminuição da agregação é proporcionada por um evento específico, ou seja, ocorre em consequência da interação antígeno-anticorpo, o anticorpo anti-cromogranina A (anti-CgA) foi conjugado às NPAg, um anticorpo não específico à IgG_h. Uma alteração pouco significativa da variação da absorbância (A_{396}/A_{564}) foi observada ao empregar o sistema contendo NPAg-anti-cromogranina na detecção de IgG_h, como pode ser observado na Figura 60. Já o processo de anti-agregação devido à interação antígeno-anticorpo foi confirmado novamente ao utilizar o sistema contendo NPAg-anti-IgG_h.

Figura 60. Substituição de anti-IgG_h por anticorpo não específico (anti-CgA): espectros de absorção obtidos na presença e ausência de IgG_h (100 ng mL^{-1}).

4.3.4.4. Seletividade do imunoensaio

Apesar da interação antígeno-anticorpo ser muito seletiva, ela não está imune a interferentes. As reações-cruzadas entre um anticorpo e um ou mais antígenos

estão entre as principais causas da perda da seletividade de um imunoensaio. As reações cruzadas podem advir da interação fortuita entre epítomos sem nenhuma relação; de anticorpos de origem muito próxima (e. g., anticorpos de coelhos e hamsters mostram reação-cruzada com anticorpos de camundongos e ratos, devido a grande homologia entre os aminoácidos nas espécies) e de epítomos similares, presentes em outras proteínas, com origem evolucionária similar ou não (Masseyeff; Albert; Staines, 1992).

Por isso, para verificar a seletividade do imunoensaio de anti-agregação, foi verificada a resposta de potenciais interferentes para este ensaio, como a albumina do soro bovino (BSA) e uma IgG produzida por coelho (IgG_c). Deve-se esclarecer que a BSA possui uma estrutura muito semelhante à da albumina humana (HSA; em inglês *Human Serum Albumin*), por isso é utilizada como modelo em sistemas biomiméticos (Ferreira, 2009).

Foi medida a variação da absorbância ($\Delta A_{396}/A_{564}$) na ausência e na presença dos analitos avaliados (100 ng mL⁻¹ de IgG_h; 100 ng mL⁻¹ de IgG_c; 1 µmol L⁻¹ de BSA). A interferência de BSA na detecção de IgG_h também foi avaliada (100 ng mL⁻¹ de IgG_h + 1 µmol L⁻¹ de BSA). Como pode ser observado na Figura 61, ocorreu uma significativa variação da absorbância ao utilizar IgG_h. O valor da $\Delta A_{396}/A_{564}$ obtido ao utilizar IgG_c foi pouco significativo ($\cong 2\%$). Ao utilizar BSA a variação da absorbância foi de 7 %, no entanto, esse valor é bem inferior quando comparado ao obtido para a IgG_h. A BSA proporcionou uma diminuição de 26 % no valor da $\Delta A_{396}/A_{564}$ com relação ao sinal obtido ao utilizar somente IgG_h.

Existem algumas estratégias para minimizar interferências de matriz, como pré-purificação da amostra e o uso de metodologia de adição padrão (Diamandis; Christopoulos, 1996; Taylor et al., 2012). Esta metodologia é especialmente apropriada para matrizes complexas, como o soro humano. Enfim, este método pode detectar IgG_h com elevada seletividade.

Como mencionado na primeira parte deste trabalho, espera-se que o método desenvolvido seja potencialmente aplicável à detecção de vários analitos presentes em amostras clínicas. Desta maneira, para verificar a versatilidade do método, avaliou-se a aplicação da metodologia baseada na anti-agregação das NPAg para determinação do marcador tumoral cromogranina A (CgA), do fator IX de coagulação e da anti-imunoglobulina M humana (IgM_h). Foram mantidos os parâmetros experimentais otimizados para a detecção de IgG_h.

Figura 61. Variação da estabilidade da suspensão coloidal (A_{396}/A_{564}) na presença de IgG_h (100 ng mL⁻¹), IgG de coelho (IgG_c = 100 ng mL⁻¹), BSA (1 µg mL⁻¹) e BSA (1 µg mL⁻¹) + IgG_h (100 ng mL⁻¹).

4.3.5. Determinação de cromogranina A

A concentração no plasma da proteína CgA ($\cong$ 49 KDA) pode ser utilizada na diferenciação de tumores neuroendócrinos, bem como pode ser útil para avaliar a progressão do tumor e a resposta ao tratamento. A faixa de referência de CgA no plasma está entre 6-40 ng mL⁻¹ e a determinação de CgA é feita principalmente por radioimunoensaio direto e ensaio imunoenzimático direto (Delfos, 1991; Stridsberg et al., 2003; Vinik et al., 2009).

Para avaliar a aplicabilidade do imunoensaio de anti-agregação para determinação de CgA, os anticorpos policlonais anti-CgA foram conjugados às NPAg-BH₄. Foi avaliada a alteração da razão A_{396}/A_{564} devido à interação da CgA com NPAg-anti-CgA. Os espectros de absorvância referentes a diferentes concentrações de CgA utilizadas são apresentados na Figura 62. Ocorreu uma minimização da agregação devido à presença desta proteína. No entanto, em concentrações de 100 a 200 ng mL⁻¹ não é observada uma correlação entre os estágios de agregação do sistema e a concentração de CgA. Nota-se, que a agregação permaneceu constante para concentrações de CgA até 50 ng L⁻¹. Observou-se uma significativa dispersão do sistema para uma concentração de CgA igual a 100 ng mL⁻¹. Por fim, maiores concentrações de proteína (150 e 200 ng mL⁻¹) levaram ao aumento da intensidade da agregação.

Figura 62. Variação da agregação para diferentes concentrações de CgA (0 a 200 ng mL⁻¹).

Como foi demonstrada anteriormente, uma série de reações consecutivas leva a formação de precipitados. Uma baixa afinidade do antígeno irá desfavorecer a anti-agregação. Além disso, a diferença do potencial de superfície antes e após a ligação determinará a predisposição à agregação. Eventualmente, a utilização de parâmetros otimizados para determinação da CgA propicie resultados mais satisfatórios.

4.3.6. Determinação de imunoglobulina M humana

A concentração normal de IgM_h no soro varia de 0,40-1,20 mg mL⁻¹ (O'Toole, 2013). O nível de IgM_h pode ser alterado em diversas imunodeficiências primárias. Enquanto baixos níveis representam deficiência na imunidade inata, níveis elevados podem ser proporcionados também por uma infecção (Al-Herz et al., 2014).

Para os experimentos apresentados nesta subseção, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-IgM humana (imunoglobulina G específica para IgM_h). Na Figura 63a são apresentados os espectros de absorvância para diferentes concentrações de IgM_h. Para 12,5 ng mL⁻¹ de IgM_h, observa-se um significativo aumento da resistência à agregação, por outro lado, o aumento da concentração de IgM_h é acompanhado de um constante aumento da intensidade da agregação do sistema coloidal. Houve uma diminuição da razão A_{396}/A_{564} à medida que concentração de IgM_h variou de 12,5 para 75 ng mL⁻¹. Ainda, há uma variação linear da razão A_{396}/A_{564} em função da concentração de IgM_h de 12,5 para 50 ng mL⁻¹ (Figura 63b).

Como relatado anteriormente, o aumento da agregação também pode ser um evento válido quando se pretende desenvolver imunoenaios.

A imunoglobulina M é classificada como uma proteína aglutinante, pois é capaz de superar o potencial de superfície (potencial zeta) apresentado por certos antígenos particulados (ex.: eritrócitos) e induzir sua agregação. A IgM é uma molécula pentavalente e as regiões Fab do anticorpo estão suficientemente distantes, podendo interagir com os anticorpos imobilizados sobre partículas (ex.: eritrócitos), em princípio, separadas pelo potencial de superfície (Coico, sunshine, 2010). Desta maneira, os resultados referentes ao imunoenensaio de anti-agregação aplicado à detecção de IgM_h podem ser devido ao fenômeno descrito acima.

Os anticorpos monoclonais apresentam particularidades, como o fato de não possuírem a aditividade da afinidade conferida pela ligação de dois anticorpos, pois a ligação de mais de um anticorpo cria um vínculo de afinidade maior do que um anticorpo sozinho. Pelo fato também de serem específicos para um epítipo apenas, não precipitam antígenos a menos que eles possuam múltiplos epítipos idênticos. (Diamandis; Christoulos, 1996).

Figura 63. Variação da agregação para diferentes concentrações de IgM_h (0 a 75 ng mL⁻¹) (a) e correlação entre A_{398}/A_{564} e a concentração de IgM_h (b).

Os anticorpos monoclonais são específicos para o reconhecimento de um epítipo e, como efeito, o fenômeno de precipitação é observado somente se o antígeno possui múltiplos epítipos idênticos (Diamandis; Christoulos, 1996). A natureza pentamérica de IgM_h faz com que possua múltiplos epítipos iguais para se ligar ao anticorpo, o que pode promover a agregação.

Além das observações acima, pode-se dizer que a agregação pode ser limitada pelo tamanho do analito, pois depende da distância entre as nanopartículas no sol e o diâmetros médio delas, que deve ser igual ou menor que diâmetro médio das partículas (Wilson, 2008). Desde que a IgM_h possui um peso molecular maior que da IgG_h, entende-se que o impedimento estérico não é a principal causa do aumento da dispersão das NPAg, mas a repulsão eletrostática.

Ainda, deve-se ressaltar que os imunoenaios foram realizados a 15 °C e a aglutinação de anticorpos IgG_h é favorecida a 37 °C. Ao contrário disso, para o anticorpo IgM_h, temperaturas baixas, entre 4-22 °C, favorecem a aglutinação (Seadi, 1998).

4.3.7. Determinação do fator IX de coagulação

Outro analito de grande relevância clínica testado foi o fator IX de coagulação (FIX). Foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-fator IX. A variação da agregação para diferentes concentrações de FIX utilizadas, representada pela razão A_{396}/A_{564} , pode ser observada na Figura 64. Há uma diminuição da agregação com o aumento da concentração do analito, mas a variação dos espectros de absorção é sutil (Figuar 64a). Uma correlação linear é observada ao relacionar A_{396}/A_{564} em funções da concentração de FIX. No entanto, observa-se uma baixa sensibilidade, mas como discutido anteriormente, as condições experimentais do imunoenasão de anti-agregação aplicável à determinação do FIX podem ser otimizadas.

Figura 64. Variação da agregação para diferentes concentrações de FIX (0 a 150 ng mL⁻¹) (a) e correlação entre A_{396}/A_{564} e a concentração de FIX (b).

O FIX é uma proteína envolvida no sistema de coagulação sanguíneo e sua deficiência no plasma humano é o resultado de uma doença conhecida como hemofilia B. (Taran, 1997). A concentração de FIX no plasma é cerca de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a hemofilia se manifesta quando a concentração é menor que $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Gage; Christen, 1992). Os resultados indicam que o método baseado na anti-agregação de NPAg aplicado à determinação do FIX pode apresentar limites de detecção bem inferiores a 100 ng mL^{-1} . Sendo assim, o método pode ser adequado para quantificação dessa proteína.

4.4. Quantificação de ATP com o uso de aptâmeros

Nesta etapa do trabalho foi utilizado um aptâmero específico para adenosina trifosfato ($5^0\text{-CACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTT-}3^0$) com nucleotídeos adicionados à sequência 3' terminal, que é capaz de formar uma hibridização intramolecular com 5' terminal (Tan et al., 2012). Assim, na ausência do analito uma estrutura rígida é formada, havendo a diminuição da exposição de grupos responsáveis pela estabilidade das NPAu. No entanto, ao ligar-se à adenosina trifosfato (ATP), ocorre uma alteração estrutural e as sequências terminais ficam disponíveis para estabilizar as NPAu. Uma representação da mudança estrutural do aptâmero após a ligação com ATP é apresentada na Figura 65.

Figura 65. Mudança estrutural do aptâmero após a ligação com ATP. Adaptada de Tan et al. (2012).

Os aptâmeros são fitas simples de DNAs ou RNAs ou uma combinação desses oligonucleotídeos com nucleotídeos não naturais, que por meio de estruturas

tridimensionais são capazes de reconhecer alvos específicos (Smuc; Ahn; Ulrich, 2013).

Os aptâmeros são sintetizados e comumente identificados em uma vasta biblioteca combinatória que compreende 10^{13} - 10^{15} sequências diferentes por um processo chamado evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (Selex– systematic evolution of ligands by exponential enrichment), que compreende a repetição de cinco etapas principais: ligação, partição, eluição, amplificação e condicionamento. (Stoltenburg; Reinemann; Strehlitz, 2007). Esses ligantes foram desenvolvidos para diferentes alvos, como pequenas moléculas orgânicas até mesmo organismos inteiros. Aptâmeros podem se ligar a moléculas alvo com alta afinidade (constante de afinidade- $\mu\text{mol L}^{-1}$ a pmol L^{-1}) e seletividade (Howard; Kaser, 2014). Além disso, podem ser modificados quimicamente com o objetivo de aumentar sua estabilidade (ex.: resistência à nucleases), incluir novas características e melhorar sua capacidade de ligação (Kusser, 2000).

Essas moléculas possuem um grande potencial para aplicação terapêutica e aplicações (bio) analíticas. Muitos ensaios analíticos baseados na interação aptâmero-analito vêm sendo desenvolvidos para detecção de pequenas moléculas biológicas, proteínas e bactérias (Wang; Liu, 2008; Park; Paeng, 2011; Zhang; Liu, Sun, 2013; Wu et al., 2015).

O uso de oligonucleotídeos tiolados é uma abordagem comumente utilizada no desenvolvimento de ensaios que utilizam nanopartículas (Li et al., 2014; Chávez et al., 2010). Entretanto, a obtenção de oligonucleotídeos modificados, geralmente, não é um procedimento simples.

Moléculas de ssDNA (oligonucleotídeo fita simples) são capazes de estabilizar nanopartículas em elevadas concentrações salinas, devido à interação de grupos contendo nitrogênio. Logo, duas abordagens são frequentemente utilizadas para obtenção de ensaios de agregação que não empregam aptâmeros modificados. Na primeira, ao interagir com o alvo, estruturas rígidas como G-duplexes podem ser formadas, o que dificulta a interação dos aptâmeros com as nanopartículas, como está representado na Figura 66a (Cai et al., 2010; Shi et al., 2015; Wang et al., 2006). Assim, com o aumento da concentração do analito há uma tendência em diminuir a inibição da agregação proporcionada pelo aptâmero. Entretanto, não são todos os aptâmeros que adquirem estruturas rígidas durante o reconhecimento, podendo assim estabilizar parcialmente as nanopartículas. Então, o uso de fitas

complementares é uma estratégia utilizada por alguns grupos de pesquisa (Wang et al., 2007). Um esquema é apresentado na Figura 66b. A interação de dsDNA (oligonucleotídeo de fita dupla) com as nanopartículas metálicas são relativamente pequenas porque as bases nitrogenadas estão isoladas (Wang et al., 2007). Desta maneira, o oligonucleotídeo que inicialmente está ligado à sua fita complementar, ao ligar-se ao analito, libera a fita simples que estabiliza as nanopartículas em solução.

Figura 66. Estratégias utilizadas para desenvolver ensaios que não utilizam aptâmeros modificados: (a) oligonucleotídeos fitas simples e (b) fitas duplas (complementares) de oligonucleotídeos.

A ATP ocorre em todas as formas de vida conhecidas e é uma constituinte natural dos tecidos do corpo humano e animal. Essa molécula é considerada um intermediário de “alta energia”, responsável por grande parte da troca energética relacionadas a eventos celulares. Além disso, a ATP é uma substância indispensável para a síntese dos ácidos nucleicos e está envolvida na regulação de muitos processos bioquímicos (Voet; Voet, 2013; Khlyntseva, 2009). A sua ligação direta com a geração de energia e, conseqüentemente, com a matéria viva, faz com que a determinação de ATP seja utilizada para as mais diversas finalidades, como avaliar a viabilidade celular (Petty et al., 1995), medida de proliferação celular e

citotoxicidade (Crouch et al., 1993), detectar contaminação recente de água potável com micróbios (Deininger; Lee, 2001; Vang et al., 2014) e avaliar a limpeza de equipamentos e ambientes na indústria alimentícia e estabelecimento de saúde (Velten, et al., 2007; van Doornmalen Gomez Hoyos, 2015).

Por fim, na próxima subseção (4.4.1) serão apresentados os resultados referentes ao preparo e caracterização das NPAu e, seguidamente, serão apresentados os resultados referentes ao desenvolvimento do ensaio.

4.4.1. Preparo e caracterização das nanopartículas de ouro

O espectro de absorbância da suspensão coloidal de NPAu preparadas por meio da redução com citrato é apresentado na Figura 67. Observa-se uma banda de absorção relativamente estreita e com um $\lambda_{\text{máx}}$ localizado em aproximadamente 525 nm, o que indica a formação de partículas com diâmetro médio aproximado de 20 nm (Basu e al., 2007). De acordo com os resultados obtidos por meio da técnica de DLS, foram preparadas NPAu com diâmetro médio hidrodinâmico de 38 nm. A suspensão coloidal preparada apresentava coloração violeta e boa estabilidade.

Figura 67. Espectro de absorção da suspensão coloidal de ouro preparada.

No difratograma de raios X da amostra preparada, Figura 68, são observados picos referentes à estrutura cristalina do ouro. O pico localizado em $38,3^{\circ}$ (2θ) correspondente ao plano 111 da estrutura cristalina do ouro. São observados

também outros picos de difração menos intensos, correspondentes aos planos 200 ($2\theta = 44,4^\circ$), 220 ($2\theta = 64,9^\circ$) e 311 ($2\theta = 77,7^\circ$) (Gubciza et al., 2013).

Figura 68. Difratograma das NPAu.

A técnica MET foi utilizada com o objetivo de avaliar a morfologia das partículas obtidas. As imagens das NPAu podem ser visualizadas na Figura 69 e observa-se que as nanopartículas aglomeraram. Isso provavelmente ocorreu durante o preparo das amostra para a análise de TEM, pois, como foi observado anteriormente, o espectro de absorção indicou que foi preparada uma solução de NPAu estável. Por meio da micrografia foi possível observar que formaram NPAu esféricas e com estreita distribuição de tamanho. Essas NPAu foram utilizadas no ensaio de agregação para determinação de ATP.

Figura 69. Micrografias das NPAu. Imagens obtidas por MET.

4.4.2. Ensaio de agregação de NPAu para determinação de ATP

O ensaio baseado na agregação de NPAu consistiu nas seguintes etapas: primeiro o aptâmero foi incubado com a ATP; após o período de incubação, foi adicionada a solução de NPAu; a solução foi diluída com água deionizada e, então, foi adicionada a solução salina tamponada. A medida de absorbância foi realizada 2 minutos após a adição da solução salina. A agregação das NPAu foi avaliada por meio da relação entre os valores da absorbância medidos em 525 nm e 665 nm (A_{525}/A_{665}). Na presença de aptâmero ou ATP, surgiu uma intensa banda de absorção após adição da solução salina ($\cong 665$ nm), como pode ser observado na Figura 70, referente às NPAu agregadas. No entanto, pode-se observar que após a variação da força iônica da solução de NPAu exposta ao aptâmero e ATP, ocorreu uma diminuição da agregação. Desta maneira, a banda de absorção localizada em maiores comprimento de onda foi significativamente atenuada (Figura 70). Esses resultados sugerem que a estabilização das NPAu foi proporcionada pelo complexo formado após a interação aptâmero-ATP.

Figura 70. Espectros UV-Vis dos sistemas coloidais contendo aptâmero, ATP e aptâmero + ATP. [aptâmero] = $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$; [ATP] = $40 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Na Figura 71, são apresentados os espectros obtidos para diferentes concentrações de nucleotídeos utilizados. É possível observar que a diminuição da agregação ($A_{525 \text{ nm}} / A_{665 \text{ nm}}$) pode ser correlacionada à concentração de ATP. O gráfico da correlação entre a concentração de ATP e a razão $A_{525 \text{ nm}} / A_{665 \text{ nm}}$ é apresentado na Figura 72. Observa-se que uma resposta linear define o sinal

medido para concentrações de ATP entre 10 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($A_{525}/A_{665} = 0,20 + 0,027$ [ATP]), com um coeficiente de correlação de 0,9806. A estimativa do limite de detecção fornece um valor de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATP.

Figura 71. Espectros UV-Vis dos sistemas coloidais de NPAu contendo o aptâmero anti-ATP e diferentes concentrações de ATP (0, 10, 15, 20 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Figura 72. Correlação entre A_{525}/A_{665} e a concentração de ATP (a). Relação linear entre A_{525}/A_{665} e a concentração de ATP no intervalo de 10 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (b). [aptâmero] = 0,1 $\mu\text{mol mL}^{-1}$; T = 25 °C.

Uridina 5' trifosfato (UTP) e Citidina 5' trifosfato (CTP) foram utilizados para avaliar a seletividade do ensaio. A variação do sinal foi pouco significativa quando foi utilizado UTP, mas a resposta relativa proporcionada por CTP foi igual a 82 % (Figura 73).

Força intermoleculares não-covalentes estão envolvidas na interação entre o aptâmero e alvo, como ligações de hidrogênio, empilhamento de anéis aromáticos, interações de van der Waals e eletrostáticas (Hermann; Patel, 2000). Aptâmeros interagem com seus alvos em condições específicas, nas quais foram selecionados. Por isso, geralmente, não é necessário avaliar parâmetros como a temperatura e pH. Os ensaios geralmente são realizados a 25 °C e em soluções que apresentam pH e força iônica adequados, iguais aos utilizados nos processos de seleção dos aptâmeros. Desta maneira, deve-se considerar que ao adaptar o uso do aptâmero a um determinado método pode haver uma diminuição da sua afinidade e especificidade devido a uma pequena variação das condições experimentais.

Cabe ressaltar que o ensaio baseado no uso de aptâmeros apresentado nessa subseção pode ser utilizado como um método de rastreamento (do inglês screening), para verificar a presença de células bacterianas e fúngicas, por exemplo, indicando contaminação. Além da simplicidade, o método apresenta baixo custo porque são utilizadas baixas concentrações de NPAu e aptâmeros.

Figura 73. Variação da agregação (A_{525}/A_{665}) observada para UTP, CTP e ATP, em concentração molar igual a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. [aptâmero] = 0,1 $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

Há uma intensa pesquisa voltada para a seleção de aptâmeros de elevada afinidade (Kuwahara; Sugimoto, 2010; Elshafey; Siaj; Zourob, 2014). Por isso, um método mais seletivo pode ser obtido por meio da estratégia apresentada. Adicionalmente, em princípio, o método pode ser empregado para detecção de qualquer molécula que possua um aptâmero específico, podendo apresentar elevada versatilidade.

5. CONCLUSÃO

A primeira etapa do desenvolvimento do imunoensaio consistiu no preparo e caracterização das nanopartículas metálicas. É preciso obter nanopartículas monodispersas e estáveis. O agente redutor e estabilizante definem a forma e o tamanho das nanopartículas. Além disso, esses reagentes podem interferir na funcionalização, estabilidade e interação entre as moléculas envolvidas.

Foram estudadas NPAg preparadas com os agentes redutores borohidreto de sódio, citrato e glicose. Citrato de sódio, CTAB e β -ciclodextrina foram utilizados como agentes estabilizantes. A glicose é um reagente atóxico, de fácil acesso e de fácil aquisição. No entanto, é um fraco agente redutor, o que proporciona geralmente a formação de NPAg maiores. Nanopartículas esféricas e com estreita distribuição de tamanho podem ser obtidas ao utilizar um excesso de CTAB com relação ao precursor de íon metálico. A adsorção seletiva desse surfactante induz a obtenção de NPAg anisotrópicas. O contrário foi observado ao utilizar o estabilizante citrato, que pode induzir a formação de NPAg com formas pouco definidas. Nanoesferas de carbono podem ser obtidas por um método simples, baseado no tratamento térmico de uma solução de glicose. Grupos funcionais presentes na superfície das nanoesferas são responsáveis pelo caráter redutor desse material. Assim, nanopartículas estáveis foram obtidas em meio aquoso, mas não foi possível comprovar a adsorção das NPAg sobre a superfície da esfera. O método tradicional para produção de nanopartículas de prata, que utiliza NaBH_4 como redutor, produziu partículas muito pequenas (< 10 nm) e estáveis. O método é simples e reprodutível.

A espectroscopia UV-Vis é uma ferramenta simples e indicada para acompanhar desde a formação até a morfologia das nanopartículas. No entanto, é importante utilizar técnicas complementares para obter informações mais precisas sobre as características das nanopartículas.

De uma maneira geral, foram preparados conjugados estáveis de NPAg. Ácido mercaptosuccínico foi utilizado como agente de funcionalização. Esse tiol liga-se covalentemente as NPAg por meio do grupo sulfidril e interage eletrostaticamente com o anticorpo por meio de grupos carboxílicos ionizados.

A estabilidade das NPAg e suas propriedades ópticas são dependentes da estrutura do ligante e da carga da superfície. Nanopartículas são estáveis devido à repulsão eletrostática e impedimento estérico. A diminuição da agregação do

sistema (NPAg-anti-IgG_h) devido à presença de IgG_h foi mais evidente ao utilizar NPAg-citrato e NPAg-BH₄. Sugere-se, portanto, que é mais indicado o uso de NPAg estabilizadas eletrostaticamente no imunoensaio de anti-agregação. NPAg-BH₄ apresentaram-se mais propícias para aplicação no imunoensaio, pois proporcionam a obtenção de partículas muito pequenas, apresentaram elevada estabilidade, e o preparo é relativamente reprodutível.

A concentração de AMS, a concentração de IgG_h, pH e a temperatura foram parâmetros avaliados para o desenvolvimento do imunoensaio. Notou-se uma grande influência do agente de funcionalização, o AMS, na estabilidade das NPAg. Há, portanto, uma grande dependência entre os fatores relacionados à intensidade de agregação das NPAg, como a concentração de AMS e a variação da força iônica.

Ao realizar o ensaio em condições otimizadas observou-se uma correlação linear entre diminuição da agregação do sistema (NPAg-anti-IgG_h) e a concentração de IgG_h (0 a 200 ng mL⁻¹). O limite de detecção foi estimado em 25 ng mL⁻¹. Do mesmo modo, uma correlação linear foi observada ao relacionar a concentração de fator IX de coagulação em função de A_{396}/A_{564} . Assim, o método baseado na anti-agregação das NPAg pode ser versátil e apresentar um baixo custo de análise. O método colorimétrico apresentou também boa seletividade.

Foi desenvolvido também um método para determinação de ATP baseado na agregação de NPAu. Aptâmeros foram utilizados como elemento de reconhecimento. Em princípio, o método pode apresentar muitas características positivas, como versatilidade, simplicidade e baixo custo.

6. BIBLIOGRAFIAS

Aachmann, F. L.; Otzen, D.E.; Larsen, K.L.; Wimmer, R. **Protein Engineering** v. 16, p. 905-912, 2003.

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 560 p.

Agasti, N.; Kavshik, N. **American Journal of Nanomaterials** v. 2, p. 4-7, 2014.

Al-Herz, W.; Bousfiha, A.; Casanova, J. L.; Chatila, T.; Conley, M. L.; Cunningham-Rundles, C.; Etzioni, A.; Franco, J. L.; Gaspar, H. B.; Holland, S. M.; Klein, C.; Nonoyama, S.; Ochs, H. D.; Oksenhendler, E.; Picard, C.; Puck, J.M.; Sullivan, K.; Tang, M. L. K. **Frontiers in immunology** v. 5, 1-33, 2014.

Almeida, J. R. C.; Pedrosa, N. L.; Leite, J. B.; Fleming, T. R. P.; Carvalho, V. H.; Cardoso, A. A. A. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 53, p. 305-316, 2007.

Ameratunga, R.; Brewerton, M.; Slade, C.; Jordan, A.; Gillis, D.; Steela, R.; Koopmans, W.; Woon, S. T. **Frontiers in Immunology** v. 5, p. 1-9, 2010.

Amiral, J.; Adalbert, B.; Adam, M. **Clinical Chemistry** v. 30, p. 1512-1516, 1984.

Andrade, P.F.; Faria A. F.; Silva, D. S.; Bonacian, J. A.; Gonçalves, M. C. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.118, p. 289-297, 2014.

Ashraf, S.; Pfeiffer, C.; Hussan, S. Z.; Gil, P. R.; Parak, W. J.; Hussain, I. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces** v. 102, p. 511- 518, 2013.

Baset, S.; Akbari, H.; Zeynali, H.; Shafie, M. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures** v. 6, p. 709-716, 2011.

Basu, S.; Gosh, S. K.; Kundu, S.; Panigrahi, S.; Praharaj, S.; Pande, S.; Jana, S.; Pal, T. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 313, p. 724-734, 2007.

Baynes, J. W.; Dominicsak, M. H. **Bioquímica Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, 656 p.

Beck, O. E., Kaiser, P. E. **Clinical Chemistry** v. 27, p. 310-312, 1981

Bock, J. L. **American Society of Clinical Pathologists** v.113, p. 628-64, 2000.

Bonifácio, L. S. **Processos de Agregação e Fusão de Nanopartículas de Ouro: Uma Abordagem Química**. 2006, 116 f. Dissertação (Mestre em Química), Instituto de Química da USP. São Paulo, 2006.

Botasini, S.; Mendez, E. **Journal of Nanoparticle Research** v. 15, p. 1526-1532, 2013.

Bottini, P. V. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v. 29, p. 23-26, 2007.

Burns, R. (Ed.) **Methods in Molecular Biology**. 3 ed. Totowa: Humana Press, 2005. V. 295: Immunochemical protocols. 310 p.

Burtis, C. A.; Ashwood, E. A.; Bruns, D. **Tietz Fundamentos de Química Clínica** 6 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008. 984 p.

Byun, J. Y.; Shin, Y. B.; Kim, D. M.; Kim, M. G. **Analyst** v. 138, p.1538-1543, 2013.

Cai, W.; Fan, Y.; Jiang, Z.; Yao, J. **Talanta** v. 81, p. 1810-1815, 2010.

Campbell, A. M. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Monoclonal antibody and immunosensor technology**. Elsevier Science Publishers B.V: NY-USA, 1991. 427 p.

Cannavà, C.; Crupi, V.; Ficarra, P. Guardo, M.; Majolino, D.; Stancanelli, R.; Venuti, V. **Vibrational Spectroscopy** v. 48, p.172-178, 2008.

Cantos, G. A.; Prando, M. D.; Siqueira, M. V.; Teixeira, R. M. **Revista da Associação Médica Brasileira** v. 46, p. 335-341, 2000.

Cardoso, A. A. A. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 53, p. 305-316, 2007.

Chaves, D. G.; Rodrigues, C. V.; Ferreira, W. A; Siqueira, P. F. M.; Duarte, C. G.; Proietti, A. B. F. C.; Santoro, M. M. **Brazilian Archives of Biology and Tchenology** v. 49, p. 605-609, 2006.

Chávez, J. L. **Biosensors and Bioelectronics** v. 26, p. 23-28, 2010.

Chang, J. Y.; Wu, H. M.; Chen, H.; Ling, Y. C.; Tan, W. H. **Chemical Communications** V.8, p. 1092-1094, 2005.

Chen, J. P.; Wu S. **Langmuir** v. 20, p. 2233-2242, 2004.

Chen, Z.; Lei, Y.; Chen, X. **Microchimica Acta** v. 179, p. 241-24, 2012.

Chohan, B. A.; Lavreys, L.; Mandaliya, K. N.; Kreiss, J. K.; Bwayo, J. B.; Ndinya-Achola J. A.; MARTIN Jr J. L. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8 (2) p. 346-348, 2001.

Chow, M. K.; Zukoski, C. F. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 165, p. 97-109, 1994.

Christopher, P.; Linic, S. **ChemCatChem** v. 2, p. 78-83, 2010.

Ciervo, A.; Petrucca, A. Viscac, P. Cassone, A. **Journal of Microbiological Methods** v. 59, p. 135 – 140, 2004.

Coico, R.; Sunshine, G. **Imunologia** ed.6.Traduação de Eiler Fritschi Toros, E. F. Rio de Janeiro: Gunabara Koogan, 2010. 42 p.

Conley, M. L.; Rohrer, J.; Minegishi, Y. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology** v., p. 183-204, 2000.

Correia, L. C. L.; Lima, J. C.; Gerstenblith, G.; Magalhães, L. P.; Moreira, A.; Barbosa Jr., O.; Dumet, J.; Passos, L. C. S.; D'Oliveira Júnior, A.; Esteves, J. P. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 81, p.129-32, 2003.

Crouch, S.P.M.; Kozlowski, R.; Slater, K.J.; Fletcher, J. **Journal of Immunological Methods** v. 160, p. 81-88, 1993.

Cruvinel, W. M.; Júnior, D. M.; Araújo, J. A. P.; Catelan T. T. T., Souza, A. W. S.; Silva, N. P.; Andrade, L. E. C. **Revista Brasileira de Reumatologia** v. 50, p. 434-461, 2010.

Dávalos-Patoja; Ortega-Vinuesa, J. L. ; Bastos-Gonzáles, D.; Hidalgo-Álvarez, R. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 20, p. 165-175, 2001.

Davis, D. G.; Schaefer, D. M. W.; Hinchcliff, K. W.; Wellman, M. L.; Willet, V. L.; Fletcher, J. M. **Journal of Veterinary Internal Medicine** v. 19, p. 93-96, 2005.

Deininger, R. A.; Lee, J. L. **Field Analytical Chemistry and Technology** v. 5, p. 185-189, 2001.

Delfos L. J. **Endocrine Reviews** v. 12, p. 181-187, 1991.

Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K. (Ed.) **Immunoassay** San Diego: Academic Press, 1996.

Divya, V. C.; Sathasivasubramanian, S. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine** v. 5, p. 90-94, 2014.

Doty, R. C.; Tshikhudo, T. R., Brust, M.; Fernig, D. G. **Chemical Materials** v. 17, p. 4630-4635, 2005.

Du, B.; Li Z.; Cheng, Y. **Talanta** v. 75, p. 959-964, 2008.

Elias, D. R.; Poloukhine, A; Popik, V.; Tsourkas, A. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** v. 9, p 194-201, 2013.

Elshafey,R.; Siaj, M.; Zourob, M. **Analitical Chemistry** v. 86, p. 9196–9203, 2014.

Englebienne, P.; Hoonacker, A. V.; Valsamis, J. **Clinical Chemistry** v. 46, p 2000-2003, 2000.

Eustis S.; El-Sayed M. A. **Chemical Society** Review v. 35, p. 209-217, 2005.

Failaice, R.; Fernandes, F. **Hemograma: manual de interpretação** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

Felgenhauer, K. **Wiener Klinische Wochenschrift** v. 52, p. 1158-1164, 1974.

Ferreira, S. F. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009, 116 f. Tese (Doutor em Ciências), Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP. Riberão Preto, 2009.

Gage, F. H (Ed.); Christen, Y. (Ed.) **Research and Perspectives in Neurosciences: Gene Transfer and Therapy in the Nervous System** (1992) New York, Springer-Verlag, 211 p.

Gao, J.; Huang, X.; Liu, H.; Zan, F.; Ren, J. **Langmuir** v. 28, p.4464-4471, 2012.

Gasparyan, V. K., **Colloids and Surfaces B: Interfaces** v. 80, p. 180-183, 2010.

Geller, M.; Scheinberg, M. **Diagnóstico e Tratamento das doenças imunológicas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Gil, E. S.; Kubota, L. T. Yamamoto, Y. I. **Química Nova** v. 22, p. 874-881, v. 1999.

Gitlin, D. **Annual Review of Medicine** v.17, p. 1-22, 1966.

Gomes, I. I. F. (2009) **Interacção de Proteínas com Superfícies Nanoestruturadas e Nanopartículas de Metais Nobres**. 170 f. Dissertação (Doutorado em Química Inorgânica)-Faculdade de Ciências e Tecnologia, Nova Lisboa, Lisboa, 2009.

Gonzalez-Quintela, A.; Alende, R.; Gude, F. Campos; Rey, J.; Meijide, L. M. Fernandez-Merino, C.;Vidal, C. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 151, p. 42-50, 2007.

Gopalan, P. R.; Annaselvi, A. G.; Subramaniam, P. **International Journal of Nanomaterials and Biostructures** v. 3, p. 26-30, 2013.

Gubicza, J.; Lábár, J. L.; Quynh, L. M.; Nam, N. H.; Luong, N. H. **Materials Chemistry and Physics** v. 138, p. 449-453, 2013.

Hammond, J. L.; Bhalla, N.; Rafiee, S. D.; Estrela, P. **Biosensors** v.4, p. 172-188, 2014.

Hanson, L. H.; Tan, E. M. **Journal of Clinical Investigation** v. 44, p. 703-705, 1965.

Henglein, A. **Journal of Physical Chemistry** v. 97, p. 5457-54-71, 1993.

Henglein, A.; Giersig, M. **Journal of Physical Chemical B**, v. 103, p. 9533-9539, 1999.

Hermann, T.; Patel, J. **Biochemistry** v. 287, p. 819-825, 2000.

- Hermanson, G. T. **Bioconjugate techniques**, e.1. San Diego: Academic Press, 1996. 785 p.
- Hoonacker, A. V.; Englebiehner, P. **Current Nanoscience**, v. 2, p. 359-371.
- Howard, G. C. (Ed); Kaser, M. R. (Ed.) **Marking and using antibodies: A practical Handbook**. 2 ed. CRC express: Boca Raton, 2014. 429 p.
- Hu, M.; Chen, J.; Li, Z.; Au, L.; Hartland, G. V.; Li, X.; Marqueze, M.; Xia, Y. **Chemical Society Review** v. 35, p. 1084-1094, 2006.
- Huo, Q. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 78, p. 259-265, 2010.
- Huang, F. C.; Lee, C. K.; Han, H. L.; Chao, W. C.; Chao, H. P. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** v. 45, p. 2805-2812, 2014.
- Huang, X.; Xu, Z.; Mao, Y.; Ji, Y.; Xu, H.; Xiong, Y.; Li Y. **Biosensors and Bioelectronics** v. 66, p. 184-190, 2015.
- Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. **Chemical Physics Letters** v. 487, p 153-164, 2010.
- Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. **Journal of Physical Chemistry B** v. 110, p. 7238-7248, 2006.
- Jaiswal, S.; Duffy, B.; Jaiswal, A. K.; Stobie, N.; McHale, P. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 36, p. 280-283, 2010.
- Jiang, M.; Chen, H.; Li, B. Liu, K.; Shan, C.; Shen, D. **Journal of Materials Chemistry** v. 2, p. 56-63, 2014.
- Joshi, D.; Soni, R. K. **Journal of Nanopartarticle Research** v.17, p. 1-14, 2015.
- Kalff, M. W. **Clinica Chimica Acta** v. 28, p. 277-289, 1970.
- Kan, P. L.; Verspaget, H.W.; Pefia A.S. **Journal of Immunological Methods** v. 57, p. 51-57, 1983.
- Kelly J. (2007) **Understanding the Immune System** How It Works, 2007. 54 p. Disponível:<http://www.imgt.org/IMGTEducation/Tutorials/ImmuneSystem/UK/the_immune_system.pdf>. Acessado em 07 de ago de 2015.
- Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. **Journal of Physical Chemical B**, v. 107, p. 668-677, 2003.
- Khan, Z.; Al-Thabaiti, S. A; Obaid, A. Y.; Al- Youbi Z. A.O. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 513-517, 2011.
- Khlyntseva, S. V; Bazel, Y. R; Vishnikin, A. B.; Andruch, V. **Journal of Analytical Chemistry** v. 64, p 657-673, 2009.

Klaassen, C.; Watkins, B.J. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2 ed, Porto Alegre: AMGH, 2012, 460 p.

Klein M.; Haefner-Cavaillon, N.; Isenman, D. E.; Rivat, C.; Navia, M. A.; Davies, D. R.; Dorrington, K. J. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 78, 525- 528, 1981.

Köhler, G.; Milsten, C. **Nature** v. 275, p. 495-497, 1975.

Kreibig, U.; Genzel, L. **Surface Science** v. 156, p. 678-700, 1985.

Kumar, C. S. S. R. (Ed.) **Metallic Nanomaterials**, e. 5., Weinheim: Wiley-VCH, 2009, 571 p.

Kuwahara, M; Sugimoto, N. **Molecules** v. 15, p. 5423-5444, 2010.

Kusser, W. **Reviews in Molecular Biotechnology** v. 74, p. 27-38, 2000.

Lehninger, A. L. **Princípios de bioquímica** ed. 4 São Paulo: Sarvie, 2006. 1202 p.

Leikin, S.; Kornyshev, A. A. **Physical Review A** v. 44, p. 2, 1991.

Leopold, N.; Lendl, B. **Journal of Physical Chemistry B** v. 107, p. 5723-5727, 2003.

Lesniewski , A.; Los M.; Jonsson-Niedziolka, M.; Krajewska, A. A.; Szot K.; Los J. M.; Niedziolka-Jonsson J. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, p. 644-648, 2014.

Leuving, J. H. W.; Thal, P. J. H. M.; Waart, M. V.D.; Schuurs, A. H. W. M. **Journal of Immunological Methods**, v. 45, p. 183-194, 1980.

Li, H.; Zhu, Y.; Dong, S.; Qiang, W.; Sun, L.; Xu, D. **Analytica Chimica Acta** v. 829, p. 48–53, 2014.

Li, X., Shen, J., Du, A., Zhang, Z., Gao, G., Yang, H, Wu, J. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.400, p. 73-79, 2012

Liang, A.; Liu, Q.; Wen, G.; Jiang, Z. **Trends in Analytical Chemistry** v. 37, p. 32-47, 2012.

Link, S.; El-Sayed M. A. **Journal of the American Chemical Society** v. 103, p. 8410-8426, 1999.

Link, S.; El-Sayed M. A. **International Reviews in Physical Chemistry** v. 19, p. 409-453, 2000.

Lins, M. G. M.; Horowitz, M, R.; Silva, G. A. P.; Motta, M. E. F. H. **Jornal de Pediatria** v. 86, 285-289, 2010.

Lipman, N.S.; Jackson, L. R.; Trudel, L. J.; Weis-Garcia, F. **ILAR Journal**, v. 46, p. 258–268, 2005.

Liu, Y.; Male, K. B.; Bouvrette, P.; Luong, J. H. T. **Chemistry of Material** v. 15, p. 4172-4180, 2003.

Liu, M.; Guyot-Sionnst, P. **Journal of Physical and Chemistry B** v. 109, p. 22192-22200, 2005.

Liu, Y.; Liu Y.; Mernaughc, R. L.; Zeng, X. **Biosensors Bioelectronics**. v. 24, p. 2853-2857, 2009.

Liu, J.; Bai, W.; Niu, S.; Zhu, C.; Yang, S.; Chen, A. **Scientific Reports** v. 4, p. 1-6, 2014.

Livramento J. A.; Melaragno Filho R.; Spina-França, A. **Arquivo de Neuro-psiquiatria** v. 9, p. 156-161, 1981.

Livramento, J. A. **Arquivos de Neuro-psiquiatria** v. 37, p. 230-249, 1979.

Liz-Marzán, L. M. **Langmuir** v. 22, p. 32-41, 2006.

Lopes, A. C. (Ed.) **Diagnósticos e Tratamentos**. 1 ed. Barueri, SP: Manole, 2006. 543 p.

Lyngbye, J.; Kroll, J. **Clinical Chemistry** v. 17, p. 495-500, 1971.

Ma, P.; Liang F.; Jin Y.; Chen Y.; Wang X.; Zhang H.; Gao D.; Song D. **Microchimica Acta** v. 180, p. 1173-1180, 2013.

Ma, Y.; Zhou, J.; Shu, L.; Li, T.; Petti, L.; Mormile, P. **Journal Nanoparticle Research** v. 6, p. 2438-2439, 2014.

Macpherson, A. J; McCoy, K. D; Johansen, F. E.; Brandtzaeg, P. **Mucosal Immunology** v. 1, p. 11-22, 2008.

Mancini, G.; Carbonara, A. O.; Heremans, J. F. **Immunochemistry Pergamon Press** v. p. 235-254, 1965.

Marzocchi-Machado, C. M; Lucisano-Valim, Y. M. **Medicina (Ribeirão Preto)** v. 38, p. 82-95, 2005.

Marks, L. D. **Phisolophical Magazine A** v. 49, p. 81-93, 1984.

Masseyeff, R. F.; Albert, W. H. W.; Staines, N. **Methods of immunological analysis - Fundamentals**. New York: VCH Publishers, 1992.

Melo, Jr. M. A.; Santos, L. S. S.; Gonçalves, M. C.; Nogueira, A. F. **Química Nova** v. 35, p. 1872-1878, 2012.

Memish, Z. A.; Almuneef, M.; Mah, M. W.; Qassem, L. A.; Osobad, A. O. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 44, p. 129-132, 2002.

Mesquita Júnior, D.; Araújo, J. A. P.; Catelan, T. T. T; Souza, A. W. S.; Cruvinel, W. M.; Andrade, L. E. C.; Silva, N. P. S. **Revista Brasileira de Reumatologia** v. 50, p. 552-80, 2010.

Mie G. **Annalen der Physik** 1908, v. 25, p. 377- 445.

Mitsudome, T.; Arita, S. Mori, H.; Mizugaki, T.; Jitsukawa, K.; Kaneda, K. **Angewandte Chemie International Edition** v. 47, p. 7938 -7940, 2008.

Molina-Bolívar, J. A.; Galisteo-González, F; Hidalgo-Alvarez, R. **Journal of Immunologicals Methods** v. 211, p. 87–95, 1998.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. **Microbiologia médica** traduzido por Andreza Martinz. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 874 p.

Netto-Ferreira, J. C. **Revista Virtual de Química** v. 7, p. 165-217, 2015.

Nordlander, P.; Oubre, C. **Nano Letters**, v. 4, p. 900-903, 2004

O'Connell, T. X.; Horita, T. J.; Kasravi, B. **American Family Physician** v. 71, p. 105-112, 2005.

Ortega-Vinuesa, J. L. Hidalgo-Álvarez, R.; de las Nieves, F. J.; Davey C. L.; Newman D. J.; Price P. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 204, p. 300-311, 1998.

Ortega-Arroyo, L.; Martin-Martinez, E. S.; Aguilar-Mendez, M. A.; Cruz-Orea, A.; Hernandez-Pérez, I.; Glorieux, C. **Starch** v. 65, p. 814-821, 2013.

Ørstavik, K. H.; Ørstavik, I. **Thrombosis Research** v. 22, p. 253-257, 1981.

O'Toole, M. T. (Ed) **Mosby's Medical Dictionary**. 9 ed. Saint Louis: Mosby/Elsevier, 2013. 1984 p.

Park, H.; Paeng, I. R. **Analytical Chimica Acta** v. 685, p. 65-75, 2011.

Parham, P. **O Sistema Imune** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

Patala, S.; Marks, L. D.; Cruz M. O. **Journal of Physical Chemistry Letter** v. 4, p. 3089–3094, 2013.

Paul, R., Farrar, D., Perry C. C. **Journal of the American. Chemical Society** v. 128, p. 3939-3945, 2006.

Penn, S. G; Hey L.; Natanz, M. J. **Current Opinion in Chemical Biology** v. 7, p. 609-615, 2003.

Pereira, K. F. **Ressônança de Plasmon de Superfície Localizado**. 2009.108 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Perez, D. P. (Ed) **Silver Nanoparticles** InTech, India, 2010; 334 p. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/silver-nanoparticles>. Acessado em 1 de agosto de 2015.

Petty, R. D.; Sutherland, L. A.; Hunter, E. M.; Cree, I. A. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence** v. 10, p. 29-34, 1995

Petryayeva, E; Krull, U. J. **Analytica Chimica Acta** v. 706, p. 8-24, 2011.

Pillai, Z. S.; Kamat, P. V. **Journal of Physical Chemistry B** v. 108, p. 945-951, 2004.

Pinchuk, A. O; Schatz, G. C. **Materials Science and Engineering B** v. 149, p. 251-258, 2008.

Polte, J.;Tuaev, X.; Wuithschick, M.; Fischer, A.; Thuenemann, A. F.;Rademann, K.; Kraehnert, R.; Emmerling, F. **ACS Nano**, v. 2, p.5791-5802, 2012.

Porter, R. R. **Biochemical Journal** v. 73, p. 119-26, 1959.

Quinten, M. **Applied Physics B** v. 73, p. 245-255, 2001.

Quinten, M. **Optical Properties of Nanoparticle Systems: Mie and Beyond** Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2011.

Ramachandran, R.; Bech, P.; Murphy, K. G.; Dhillo, W. S.; Meeran, K. M.; Chapman, R. S.; Caplin, M.; Ghatei, M. A.; Blom, S. R.; Martin, N. M. **Clinical Endocrinology** v. 76, p. 831-836, 2012.

Revy, P.; Muto, T; Levy, Y.; Geissmann, F.; Plebani, A.; Sanal, O.; Catalan, N.; Forveille, M.; Dufourcq-Lagelouse, R.; Gennrv, A.; Tezcant, G.; Ersoy, F.; Kaysenli, H.; Ugazio, A. G.; Brousse, N.; Muramatsu, M.; Notarangelo, L. D.; Kinoshita, K.; Honjo, T.; Fisher, A.; Durandy, A. v. 102, **Cell Press** p.565-575, 2000.

Rocha, T. C. R. **Nanopartículas Esféricas Anisotrópicas: Mecanismos de Formação e Aplicações Ópticas**, 2008 Tese (Doutor em Física), Instituto de Física, Universidade estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

Romano, P. **Avaliação da Biodisponibilidade de uma nova formulação de micofenolato mofetil e de um método para monitorização terapêutica**. 2007, 102 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Faculdade de Medicina da USP. São Paulo, 2007.

Sau, T. K.; Murphy, C. J. **Journal of the American Chemical Society** v. 126, p. 8648-8649, 2004.

Schroeder Jr, H. W.; Cavacini, L. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 125 (2 suppl. 2) p. 541-552 2010.

Seadi, C. **Princípios Básicos de Imunologia**. Canoas: Ed. da Ulbra, 1998, 248 p.

Serra, J.; Puig, J.; Martin, A.; Galisteo, F.; Gálvez, M.; Hidalgo-Alvarez, R. **Colloid & Polymer Science** v. 270, p. 574-583, 1992.

Sheikholeslami, S.; Jun, Y. W.; Jain, P. K.; Alivisatos, A. P. **Nano Letters** v. 10, p. 2655-2660, 2010.

Shi, Q.; Shi, Y.; Pan, Y.; Yue, Z.; Zhang, H.; Yi, C. **Microchimica Acta** v. 182, p. 505-511, 2015.

Siekkinen, A. R.; McLellan, J. M.; Chen, J.; Xia, J. **Chemical Physics Letters** v. 432, p. 491-496, 2001.

Silva, M. T. N.; Centeville, M.; Tani, S. M.; Toro, A. A. D. C.; Rossi, C.; Vilela, M. M. S. **Jornal de Pediatria**, v. 77, p. 209-218, 2001.

Smuc, T.; Ahn, Y.; Ulrich H.; **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis** v. 81, p. 210-217, 2013.

Song, X.; Gunawan, P.; Jiang, R.; Leong, S. S. L.; Wang K.; Xu R. **Journal of Hazardous Materials** v.194, p.162-168, 2011.

Sperling, R. A.; Parak, W. J. **Philosophical Transactions** v. 368, p. 1333-1383, 2010.

Stoltenburg R.; Reinemann C.; Strehlitz B. **Biomolecular Engineering** v. 24, p. 381-404, 2007.

Sumesh, S; Bootharaju, M. S.; Pradeep, A. T. **Journal of Hazardous Materials** v.189, p. 450–457, 2011.

Sun, X.; Li, Y. **Angewandte Chemie International Edition** v. 43, p. 597-601, 2004.

Stridsberg, M.; Eriksson, B.; Öberg, K.; Janson, E. T. **Journal of Endocrinology** v.177, p. 337-341, 2003.

Szenczi, Á.; Kardos, J. ;Medgyesi, A. G.; Závodszky ,P. **Biologicals** v. 34, p. 5-14, 2006.

Szymanski, M. S.; Porter, R. A. **Journal of Immunological. Methods**, v. 387, p. 262-269, 2013.

Tan, Y.; Zhang, X.; Xie, X.;Zhao, R.; Tan, C.; Jiang Y. **Analyst** v. 137, p. 2309-2312, 2012.

Tamashiro, H.; Constantine, N. T. **WHO Bulletin OMS**, v. 72, p.135-143, 1994.

Taylor, T. P.; Janech, M. G.; Slate, E. H.; Lewis, E. C.; Arthur, J. M.; Oates, J. C. **Biomarker Insights** v. 7., p. 1-8, 2012.

Taran, L. D. **Biochemistry** (Mosc). v. 62, p. 685-93, 1997.

Temgire, M. K.; Joshi, S.S. **Radiation Physics and Chemistry** v. 71, p. 1039-1044, 2004.

Titirici, M. M.; Antonietti, M.; Thomas, A. **Chemistry of Materials** v.18, p. 3808-3812, 2006.

Thanh, N. T. K.; Rosenzweig, Z. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1624-1628, 2002.

Tom, R. J.; Samal, A. K.; Sreeprasad, T. S.; Pradeep, T. **Langmuir** v. 23, p.1320-1325, 2007.

Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hiller, J. **Discussions of the Faraday Society** v. 11, p. 55-75, 1951.

Urbansky, E. T. **Bioremediation Journal** v. 2, p. 81-95, 1998.

van Doornmalen Gomez Hoyos, J.P.C.M. **Journal of Hospital Infection** v. 91, p. 87-92, 2015.

Vang, O. K; Corfitzen, C. B; Smith, C.; Albrechtsen, H. J. **Water Research** v. 64, p. 309-320, 2014.

Vaz, J. A; Takei, K.; Bueno, C. B. **Imunoensaio: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2007. 402 p.

Velten, S.; Hammes, F.; Boller, M.; Egli, T. **Water Research** v. 41, p. 1973-1983, 2007.

Vinik, A. I.; O'Dorisio T. M.; Woltering E. A.; Go V. L. W. **Neuroendocrinos tumors A Comprehensive Guide to Diagnosis and Management**. 4 ed.; InterScience Institute, 2009.

Virella, G. (Ed) **Medical Immunology**. 5 ed. New York: Taylo & Francis e-Library, 2005, 692 p.

Voet, D.; Voet, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1512 p.

Voicescu, M.; Ionescu, S.; Angelescu, D. G. **Journal of Nanoparticle Research** v. 14, p. 1174, 2012.

Wang, C.; Irudayaraj, J. **small** v. 4, p. 2204-2208, 2008.

Wang, J.; Wang, L.; Liu, X.; Liang, Z.; Song, S.; Li, W.; Li, G.; Fan, C. **Advanced Materials** v.19, p. 3943-3946, 2007.

Wang, Z. L. **Journal of the Physical Chemistry B** v.104, p. 1153-1175, 2000.

Wang, L.; Liu, X. F.; Hu, X. F.; Song, S. P.; Fan, C.H. **Chemical Communications** v. 36, p. 3780-3782, 2006.

Wang, Y.; Liu, B. **Analyst** v. 133, p.1593-1598, 2008.

Wang, Y.; Aili, D.; Selegard, R.; Tay, Y.; Baltzer, L.; Zhang, H.; Liedberg, B. **Journal of Materials Chemistry** v. 22, p. 2036-20373, 2012.

Welch, R. J.; Litwin, C. M. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** v. 24, p. 160-162, 2010.

Whicher, J. T. **La Ricerca in Clinica e in Laboratorio** v. 10, p. 189-195, 1980.

Wilcoxon, J. P.; Provencio, P. P. **Journal of Americam. Chemistry Society** v. 126, p. 6402-640, 2004.

Wilson, R. **Chemical Society Reviews** v. 37, p. 2028-2045, 2008.

Woo, J.; Floyd, M.; Longley, M. A.; Cannon, D. C. **Clinical Chemistry**, v. 25, p. 2015-2019, 1979.

Wu J.; You, L. K. H.; Gross, A.; Li, J.; Yang, H. W. **Journal of the American Chemical Society** v.134, p. 11880-11883, 2012.

Wu, W.; Zhao, S.; Mao, Y.; Fang, Z.; Lu, X.; Zeng, L. **Analytica Chimica Acta** v. 861, p. 62-68, 2015.

Xavier, R. M.; Dora, J. M.; Souza, C. F. M.; Barros, E. **Laboratório na Prática Clínica: Consulta rápida. 2ed.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

Xu, H ; Suslick, S. **Advanced Materials** v. 22, p. 1078-1082, 2010.

Xu, X.; Ying, Y.; Li, W. **Sensors and Actuators B** v. 175, p. 194–200, 2012.

Xu, X.; Liu, X.; Li, Y.; Ying, Y. **Biosensors and Bioelectronics** v. 47, p. 361-367, 2013

Yu, C; Irudayaraj, J. **Analytical Chemistry** v. 9, p. 572-579, 2007.

Yu, D.; Yam, V. W. W. **Journal of the Physical Chemistry B** v. 109, p. 5497-5503, 2005.

Yu, L.; Andriola, A. **Talanta** v. 82, p. 869-875, 2010.

Yuan, Y; Zhang, J.; Zhang, H.; Yang, X. **Biosensors and Bioelectronics** v. 26, p. 4245-4248, 2011.

Yalow, R. S.; Berson, S. A. **Nature** v.184, p. 1648-1649, 1959.

Yuan, Y.; Zhang, J., Zhang, H.; Yang, X. **Analyst** v. 137, p. 496-501, 2012.

Zanchet, D. **Nanopartículas de ouro passivadas com tióis: caracterização estrutural e formação de supercristais auto-organizados** 1999, 116 f. Tese (Doutora em Física), Instituto de Física “Gleb Wataghin” da UNICAMP. São Paulo, 1999.

Zaluzhna, O; Brightful, L.; Allison, T. C.; Tong, Y. J. **Chemical Physics Letters** v. 509, p. 148-151, 2011.

Zhang, T.; Zhang, X. Y.; Wang, L; Song Y.; Lin, M.; Wang, L.; Zhu, S.; Li, R. **Materials Transactions**, v. 54, p. 947-952, 2013.

Zhang, Y.; Liu, S.; Suna, X. **Biosensors and Bioelectronics** v. 26, p. 3876-3880.

Zhao, W.; Chiuman, W.; Lam, J.C.F; Brook, M. A.; Li Y. **Chemical Communication** v.36, p. 3729-3731, 2007.

Zhou, G.; Liu, Y.; Luo, M.; Xu, Q.; Ji, X.; He, Z. **Applied Materials & Interfaces** v. 4, p. 5010-5015, 2012.