

**Leonor Ricardo Pereira Dias Soares**

Mestre em Química

**Nanopartículas de ouro anisométricas como  
nanossondas para a identificação do polimorfismo  
de DNA associado à Intolerância à Lactose**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Química Sustentável

**Orientador:** Doutor José Ricardo Franco Tavares, Professor Auxiliar na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

**Orientador Empresarial:** Doutor Orfeu Flores, CEO da empresa STAB VIDA, Lda.

**Co-orientadora:** Doutora Eulália Carvalho Pereira, Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**Presidente:** Doutor José Paulo Barbosa Mota, Professor Catedrático da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

**Arguentes:** Doutor Jorge Pérez-Juste, Professor Associado da Faculdade de Química da Universidade de Vigo

Doutor Gonçalo Maria Reimão Pinto de França Doria, Gestor de projetos da empresa STAB VIDA, Lda.

**Vogais:** Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

Doutor Rui Alberto Garção Barreira do Nascimento Igreja, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa



**Agosto 2016**



## **Nanopartículas de ouro anisométricas como nanossondas para a identificação do polimorfismo de DNA associado à Intolerância à Lactose**

Copyright © Leonor Ricardo Pereira Dias Soares, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*Para ti, querida avó*

***Andorinha***



## AGRADECIMENTOS

*“It can be terrifying  
to be slowly dying  
also clarifying  
the end where we begin”*

**Catch and Release**

Aos **meus pais**... por serem os meus alicerces, o meu núcleo. Por acreditarem incondicionalmente em mim e me apoiarem em tudo, cada vez mais... Por me terem motivado e ensinado a seguir um caminho, a subir degraus e a saber descê-los com a mesma graça e equilíbrio. Por saber todos os dias que, onde quer que eu esteja, a minha força é a mão deles a 5 palmos de mim, mesmo que isso represente meio país de distância. Tudo o que sou é a vocês que devo. Ao meu “manão” e à minha Clarinha ;) )

Ao **João**... por ter aparecido na minha vida e desde então me ensinar a ver o mundo e a mim própria com outros olhos. Por me incentivar a combater os meus medos, a continuar a lutar em vez de desistir e por naturalmente ser capaz de me apaziguar em momentos de ansiedade, de frustração e desalento. Por tudo aquilo que fazes sem saber e eu baixinho, agradeço... obrigada, meu amor.

Ao meu orientador **professor Ricardo Franco** por me ter recebido no seu laboratório, por ter incentivado e apoiado a minha primeira experiência de trabalho fora do país. Por toda a confiança e autonomia em mim depositada, pelas oportunidades que me fizeram descobrir o enorme prazer que tenho em mostrar aos outros o quão fascinante é o mundo das nanopartículas. Agradeço também a disponibilidade e todos os úteis comentários, sugestões e correções feitas para a presente dissertação.

À minha coorientadora **professora Eulália Pereira** por desde cedo me ter feito apaixonar por Química Inorgânica, pela Nanotecnologia, pelas aulas... pela sua sabedoria e competência científica. Por ser uma pessoa muito forte e por ter tido sempre as palavras certas nos momentos que mais precisei.

Ao **Doutor Orfeu Flores** e a toda a equipa da **STAB-Vida** por me terem acolhido nos seus laboratórios, pela formação inicial e por todos os ensinamentos relacionados com a rotina de uma empresa, muito enriquecedor. Agradeço o apoio financeiro da minha bolsa e todas as restantes oportunidades que me proporcionou. Um bem-haja Doutor Orfeu!

Ao **Doutor Wolfgang Fritzsche**, à **Doutora Andrea Csaki** e ao magnífico grupo de pessoas que integram o seu grupo de investigação por me terem recebido imensamente bem, por todas as discussões científicas tanto em reuniões de grupo, no laboratório ou no corredor... sem dúvida uma das melhores experiências profissionais e pessoais que retive destes 4 anos.

Aos **GRANDES Amigos** que fiz e levarei para a minha vida, em especial para a **Inês Gomes**... um ser humano fora de série, cuja força e alcance muitos desconhecem, um exemplo para mim! À **Janina**, a melhor amiga que o mundo me deu e por quem tenho a estima que se tem a um irmão de sangue. Sem esquecer os demais conterrâneos, Kopi, Matthias, Steffen, Isabell, David... À Patrícia por falar a mesma “língua” que eu, por não julgar, cobrar e por ser alguém tão especial, a verdadeira Amiga! Miguel Peixoto, Mariana Romão, Pedro Sanguino, Conceição e Ângela, obrigada por todos os momentos memoráveis, por me terem apoiado e feito rir tanto, por me aturarem nos meus piores dias e por terem feito desta viagem uma aventura bem mais agradável e divertida.

E aos meus **Amigos de SEMPRE... Quaresma, Sofia, Si, Jô e Matos, Murtinha e Márinho...** obrigada por me aturarem os devaneios, as inseguranças e, acima de tudo pelas conversas sem fim que me fizeram crescer tanto. Acima de tudo por permanecerem na minha vida há tantos anos e nada mudar, estando longe ou perto.

A todas as pessoas que se cruzaram comigo, com quem tive a oportunidade de trabalhar, direta ou indiretamente e que de algum modo me marcaram... ao **Dr. Peter Eaton, Dra. Margarida Carvalho ☺, Penedo, Rui, Diana, Agata e Michal** e aos alunos das aulas de Bionanotecnologia obrigada por partilharem comigo o gosto pela Ciência.

À **Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Departamento de Química** e à **Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**, Departamento de Química e Bioquímica por me terem acolhido como aluna de doutoramento permitindo a realização deste trabalho nas suas instalações.

À **Fundação para a Ciência e a Tecnologia** pela bolsa de doutoramento que me foi concedida (SFRH/BDE/51100/2010) e à **European Science Foundation** pela bolsa concedida no âmbito do projeto “*New Approaches to Biochemical Sensing with Plasmonic Nanobiophotonics*” pelo trabalho desenvolvido no *Leibniz-Institut für Photonische Technologien*, Jena, Alemanha.

Ao coordenador do **Programa Doutoral em Química Sustentável (PDQS)** por me ter aceite enquanto aluna de doutoramento e por através do programa doutoral ter-me proporcionado conhecimentos com valências tão enriquecedoras.





## RESUMO

O diagnóstico da intolerância à lactose, enquanto condição genética ancestral ou predisposição representa atualmente uma das grandes preocupações da Nutrigenética em Portugal. A entrada em vigor de regulamentação ditou a proibição da venda direta ao público de testes genéticos relacionados com a saúde, passando a ser exclusiva por prescrição médica, o que acarretou um aumento dos preços. Perante esta conjuntura surge a necessidade de desenvolver metodologias alternativas de baixo custo e acesso facilitado que permitam o rastreio da intolerância à lactose. De acordo com os interesses comerciais da empresa STAB VIDA, Lda., selecionou-se como alvo de estudo, o polimorfismo de base única (SNP) C/T -13910 presente no gene *LCT*, sendo que para além da proposta de dois tipos de biossensores com base em nanopartículas de ouro (em solução e em *chip*), o protocolo de sequenciação de *Sanger* utilizado para a identificação do genótipo de amostras clínicas foi igualmente otimizado, com vista na diminuição dos custos inerentes ao atual serviço.

O biossensor desenvolvido em solução possibilitou a deteção colorimétrica do alvo em amostras clínicas de DNA (produtos PCR) com resolução ao nível de uma base, seguindo uma abordagem *non-crosslinking*. Recorreu-se a “nanossondas de ouro” resultantes da síntese e funcionalização de nanopartículas de ouro esféricas (15 nm) ou anisométricas (nanoestrelas) com oligonucleótidos tiolados, cuja sequência era específica ao alvo de interesse. O princípio de deteção consistiu na alteração das propriedades óticas através da força iónica, provocando a agregação das nanossondas. A agregação diferencial colorimétrica decorrente do deslocamento da LSPR foi detetado por espectrofotometria ultravioleta-visível e em determinados casos, a “olho nu”, dada a forte coloração das soluções.

Em *chip* (plataformas de vidro de borossilicato), a deteção de eventos de hibridação de DNA efetuou-se com base na alteração do índice de refração de nanopartículas de ouro. Foram sintetizadas nanopartículas de ouro esféricas (80 nm) ou anisométricas (nanotriângulos), tendo sido posteriormente depositadas e funcionalizadas com oligonucleótidos tiolados e com mercaptohexanol, passando a designarem-se por “*chip*-sondas”. Todas as alterações efetuadas à superfície das nanopartículas foram avaliadas de forma individual e localizada, isto é, foram selecionadas através de microscopia de campo escuro e o seu espectro ultravioleta-visível adquirido. A interação ou ligação de oligonucleótidos de DNA com diferentes sequências (complementares ou não) à sonda, provocaram alterações no índice local de refração das nanopartículas, refletindo-se em deslocamentos da LSPR. A otimização das condições experimentais inerentes à preparação dos *chips*-sonda e à reação de hibridação foi efetuada com DNA sintético, tendo-se validado o desempenho de ambos os nanobiossensores com produtos *PCR*.

**Palavras-chave:** intolerância à lactose, nanopartículas de ouro, nanopartículas anisométricas, biossensor, espectrofotometria de UV-Vis, microscopia de campo escuro



## ABSTRACT

Lactose intolerance, an ancestral human genetic condition or predisposition and its diagnosis became a major concern amongst doctors, nutritionists and society in general.

Once legislation prohibiting direct sale of health related genetic tests was put in place (prescription only), the prices considerably increased. This triggered the need for the development of low cost alternatives for lactose intolerance testing. Commercial interests of STAB VIDA, Lda., demanded the development of new biosensing approaches regarding a single nucleotide polymorphism (SNP) variant, C/T -13910 (present in *LCT* gene) as biological target and gold nanoparticles as sensing probes. As a result, two types of biosensors were assembled, one in solution and other on a *chip*; actual *Sanger* sequencing protocol was also optimized, in order to reduce costs and subsequently the price of the test.

Colorimetric detection of SNP C/T -13910 in clinical DNA samples (PCR products) was achieved with a single base resolution by the use of gold nanoprobe in solution, following a non-crosslinking methodology. These nanoprobe were produced through the synthesis and functionalization of spherical and anisometric gold nanoparticles with modified oligonucleotides, complementary to the sequence that contains the SNP. Detection principle consisted on the alteration of the optical properties through the increase of ionic strength, thus promoting nanoprobe's aggregation. The differential colorimetric aggregation was accompanied by a LSPR shift detected by UV-Vis spectrophotometry, which in some cases avoided the use of any apparatus, due to the nanoparticle's strong absorption coefficients.

According to chip approach, the detection of DNA hybridization events was performed based on the alteration of the gold nanoparticle's refractive index. Spherical and anisometric gold nanoparticles were synthesized, and subsequently deposited and functionalized with both thiolated oligonucleotides and mercaptohexanol, hence being denominated "chip-probe". All modifications were evaluated individually and on a single level by Dark Field Microscopy. The interaction or the actual binding of the different DNA targets, both complementary or non-complementary caused alterations in the local refractive index of the nanoprobe, thus being reflected in a LSPR shift. The preparation of the chip-probe and hybridization reaction was optimized using synthetic DNA targets, enabling the validation of the performance of both biosensors with PCR products.

**Keywords:** lactose intolerance, gold nanoparticles, anisometric nanoparticles, biosensor, UV-Vis spectroscopy, dark field microscopy



## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**Abs** - Absorvância

**AFM** - *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de Força Atômica)

**AgNP** - Nanopartículas de prata

**APTES** - 3-Aminopropiltriétoxissilano

**AuNP** - Nanopartículas de ouro (esféricas, se tiverem a indicação do diâmetro; ex. AuNP-15)

**AuNS** - Nanopartículas de ouro em forma de estrela

**AuNT** - Nanopartículas de ouro em forma de triângulo

**Au-seeds** – Núcleos de crescimento de ouro revestidos com PVP

**bp** - *base pair* (pares de base)

**CMC** - Concentração Micelar Crítica

**CTAB** - Brometo de Cetiltrimetilamônio

**DDA** - *Discrete Dipole Approximation* (Aproximação Dipolo Discreto)

**DFM** – *Dark Field Microscopy* (Microscopia de Campo Escuro)

**DLS** - *Dynamic Light Scattering* (Dispersão de Luz Dinâmica)

**DMF** - Dimetilformamida

**dNTPs** - *Deoxyribonucleotide Triphosphate* (desoxirribonucleotídeos trifosfatos)

**dsDNA** - *Double Strand Deoxyribonucleic Acid* (DNA de cadeia dupla)

**DTT** - Ditiotreitól

**FOM** - *Figure of Merit* (Índice de mérito)

**FWHM** - *Full-Width-Half-Maxim* (largura a meia altura)

**FWD** - *Forward* (referente ao *primer*, no sentido 5' → 3')

**HPTA** - Hipolactasia Primária do Tipo Adulta

**IL** - Intolerância à Lactose

**LSPR** - *Localized Surface Plasmon Resonance* (Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada)

**LPH** – *Lactase-Phlorizin Hydrolase* (Hidrólase da Lactase-Florizina)

**MUA** - *Mercaptoundecanoic Acid* (Ácido 11-Mercaptoundecanóico)

**MCH** - 6-Mercapto-hexanol

**NPL** - Não Persistência à Lactase

**NP** - Nanopartícula ou nanopartículas

**PL** - Persistência à Lactase

**POC** - *Point-Of-Care* (teste rápido)

**PVP** - Polivinilpirrolidona

**REV** - *Reverse* (referente ao *primer*, no sentido reverso a 5' → 3', ou seja 3' → 5')

**RI** - *Refractive Index* (Índice de Refração)

**RIU** - *Refractive Index Unit* (unidade de índice de refração)

**SAM** - *Self Assembly Monolayer* (Monocamada Auto-Montada)

**SDS** - *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecilsulfato de sódio)

**Seeds** - núcleos de crescimento

**SERS** - *Surface-enhanced Raman Spectroscopy* (Espectroscopia de Raman amplificada pela Superfície)

**SntMepyP** - Tetracloreto e tosilato de *meso*-tetra-(N-metil-4-piridil)porfirina de estanho (IV)

**SNP** - *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo num único nucleótido)

**SPR** - *Surface Plasmon Resonance* (Ressonância Plasmônica de Superfície)

**ssDNA** - *Single Stranded Deoxyribonucleic Acid* (DNA de cadeia simples)

**T<sub>amb</sub>** - Temperatura ambiente

**TEM** - *Transmission Electron Microscopy* (Microscopia de Transmissão Eletrônica)

**TEA** - Trietanolamina

# ÍNDICE DE MATÉRIAS

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	xv
<b>ÍNDICE DE MATÉRIAS</b> .....	xvii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xxi
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xxx
<b>Capítulo I. Introdução Geral</b> .....	1
<b>1.1 Intolerância à lactose e a opinião pública</b> .....	5
1.1.1 Definições de termos e conceitos .....	6
1.1.2 Origem da Intolerância à Lactose .....	6
1.1.3 Tipos de Hipolactasia.....	8
1.1.4 Hipolactasia primária do tipo adulto (HPTA).....	10
<b>1.2 Nanodiagnóstico, o uso da nanotecnologia aplicada ao diagnóstico</b> .....	15
1.2.1 Nanopartículas metálicas.....	16
1.2.2 Fenómeno de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR).....	16
1.2.3 Fatores que influenciam a LSPR .....	17
1.2.4 Nanopartículas de ouro.....	21
1.2.5 Síntese de nanopartículas de ouro .....	21
1.2.6 Funcionalização de nanopartículas de ouro .....	24
<b>1.3 Biossensores</b> .....	28
1.3.1 Biossensores de DNA .....	29
<b>1.4 Referências bibliográficas</b> .....	42

<b>Capítulo II.</b> Otimização do protocolo de sequenciação de <i>Sanger</i> para a determinação de genótipos relacionados com a Intolerância à Lactose em amostras clínicas .....	51
<b>2.1 Breve introdução ao capítulo</b> .....	53
2.1.1 Hipolactasia primária do tipo adulto (HPTA) e o polimorfismo C/T -13910 .....	53
2.1.2 Desenho de <i>primers</i> .....	54
2.1.3 Metodologia usada para a identificação do SNP C/T -13910 .....	55
<b>2.2 Metodologia Experimental</b> .....	56
2.2.1 Materiais e equipamentos .....	56
2.2.2 Procedimentos .....	59
<b>2.3 Resultados e Discussão</b> .....	66
2.3.1 Verificação da amplificação por eletroforese em gel de agarose .....	66
2.3.2 Quantificação de ácidos nucleicos por Espetroscopia de UV-Vis .....	68
2.3.3 Sequenciação pelo método de <i>Sanger</i> .....	69
2.3.4 Sequenciação de <i>Sanger</i> direta .....	73
<b>2.4 Conclusões e considerações finais</b> .....	77
<b>2.5 Referências Bibliográficas</b> .....	79
<b>Capítulo III.</b> Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com diferentes morfologias .....	81
<b>3.1 Breve introdução ao capítulo</b> .....	83
3.1.1 Síntese química de AuNP .....	83
<b>3.2 Metodologia Experimental</b> .....	89
3.2.1 Materiais .....	89
3.2.2 Procedimentos .....	90
<b>SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNP)</b> .....	90
<b>CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO</b> .....	94
<b>3.3 Resultados e Discussão</b> .....	96
3.3.1 Síntese e caracterização das AuNP sintetizadas .....	96
<b>3.4 Conclusões e considerações finais</b> .....	111
<b>3.5 Referências bibliográficas</b> .....	113

<b>Capítulo IV. Detecção do SNP C/T -13910 em amostras clínicas recorrendo a nanossensores colorimétricos em solução</b> .....	117
<b>4.1 Breve introdução ao capítulo</b> .....	119
4.1.1 Nanobiossensores colorimétricos de DNA .....	119
<b>4.2 Metodologia Experimental</b> .....	123
4.2.1 Material e equipamentos .....	123
4.2.2 Procedimentos .....	125
<b>4.3 Resultados e Discussão</b> .....	131
<b>NANOSSENSOR COLORIMÉTRICO DE DNA USANDO NANOPARTÍCULAS ESFÉRICAS DE OURO</b> .....	131
4.3.1 Síntese e caracterização das AuNP-15 .....	131
4.3.2 Avaliação da estabilidade coloidal aplicada ao sistema colorimétrico .....	131
4.3.3 Desenho das nanossondas e do ensaio colorimétrico .....	132
4.3.4 Formação e caracterização das nanossondas esféricas (nanossondas-15) .....	133
4.3.5 Estabilidade da nanossonda em função da força iónica e determinação da concentração mínima de sal para a indução da agregação .....	135
4.3.6 Eventos de hibridação e deteção do SNP (C/T -13910) com nanossondas-15 .....	136
<b>NANOBIOSSENSOR COLORIMÉTRICO DE DNA USANDO NANOPARTÍCULAS NÃO ESFÉRICAS</b> .....	142
4.3.7 Síntese e caracterização das AuNS .....	142
4.3.8 Avaliação da estabilidade coloidal aplicada ao sistema colorimétrico .....	142
4.3.9 Formação de nanossondas de nanoestrelas de ouro (nanossondas-S) .....	144
4.3.10 Estabilidade da nanossonda-S em função da força iónica e determinação da concentração mínima de sal para indução da agregação .....	148
4.3.11 Eventos de hibridação e deteção do SNP (C/T -13910) com a nanossonda-S .....	149
4.3.12 Cinética do ensaio de deteção do SNP (C/T -13910) com a nanossonda-S .....	152
<b>4.4 Conclusões e considerações finais</b> .....	155
<b>4.5 Referências bibliográficas</b> .....	157

<b>Capítulo V.</b> Desenvolvimento de um nanobiossensor LSPR para a detecção de eventos de hibridação de DNA utilizando nanotriângulos de ouro em substratos de vidro borossilicato .....	159
<b>5.1 Breve introdução ao capítulo</b> .....	161
<b>5.1.1</b> Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) .....	161
<b>5.1.2</b> Nanopartículas de ouro não esféricas .....	162
<b>5.1.3</b> Funcionalização das AuNP com oligonucleótidos .....	163
<b>5.1.4</b> Biossensores LSPR com base no índice de refração.....	165
<b>5.1.5</b> Princípio da Microscopia de campo escuro ( <i>DFM, do inglês Dark Field Microscopy</i> ).....	167
<b>5.2 Metodologia Experimental</b> .....	169
<b>5.2.1</b> Materiais e equipamentos .....	169
<b>5.2.2</b> Procedimentos .....	170
<b>5.3 Resultados e Discussão</b> .....	178
<b>5.3.1</b> Síntese e caracterização das nanopartículas .....	178
<b>5.3.2</b> Determinação da sensibilidade de cada um dos coloides através da medição dos índices de refração .....	178
<b>5.3.3</b> Aquisição e caracterização de espectros LSPR das AuNP.....	180
<b>5.3.4</b> Preparação dos <i>chips</i> -sonda .....	184
<b>5.3.5</b> Hibridação dos <i>chips</i> -sonda com alvos de DNA.....	189
<b>5.4 Conclusões e considerações finais</b> .....	195
<b>5.5 Referências bibliográficas</b> .....	197
 <b>Capítulo VI.</b> Discussão geral e perspectivas futuras .....	 199
 <b>Anexo III</b> .....	 207
<b>A.3.1 Cálculo da concentração de AuNP</b> .....	207
1. Método de Haiss <i>et al.</i> <sup>284</sup> .....	207
2. Método de Hendel <i>et al.</i> <sup>280</sup> .....	209
<b>A.3.2 Cálculo da massa de PVP</b> .....	210
<b>Anexo V</b> .....	211

# ÍNDICE DE FIGURAS

## Capítulo 1

---

<b>Figura 1. 1</b> - Fórmulas estruturais do dímero da lactose e dos seus monómeros constituintes, a D-galactose e a D-glucose. ....	7
<b>Figura 1. 2</b> - Mapa mundial representativo da prevalência da HPTA na população atual. Imagem retirada do sítio da ENSA <sup>20</sup> , acessado em Abril de 2014. ....	9
<b>Figura 1. 3 - A.</b> Mapa do cromossoma 2, em destaque na segunda região (2), da primeira banda (1) do braço longo ( <i>locus</i> 2q21), <b>B.</b> Mapa do <i>locus</i> 2q21 onde estão situados os genes <i>LCT</i> e <i>MCM6</i> , nos quais os SNP podem ser encontrados; <b>C.</b> Localização dos SNP associados à HPTA entre os intrões 9 e 13 do gene <i>MCM6</i> nas populações europeia, africana e do Médio Oriente. O SNP C/T -13910 (rs4988235) está marcado com um (*). Imagem adaptada da referência <sup>13</sup> .....	13
<b>Figura 1. 4</b> – Componentes e etapas envolvidas no desenvolvimento de um sistema equipamento POC com recurso à nanotecnologia. ....	15
<b>Figura 1. 5</b> – Representação esquemática do fenómeno de Ressonância Plasmónica de Superfície Localizada – LSPR, induzido por um campo elétrico externo numa NPM. ....	17
<b>Figura 1. 6</b> - Dependência da LSPR em função do tamanho de NP esféricas ( <b>A</b> ) e da morfologia em NP não esféricas (exemplo: <i>nanorods</i> ) ( <b>B</b> ). Como a razão de aspeto em <b>A</b> é constante e igual a 1, o espetro das NP esféricas apresenta apenas uma banda de ressonância plasmónica; como em <b>B</b> é variável, uma vez que os <i>nanorods</i> são um tipo de NP não esféricas bidimensionais (largura x altura), o espetro de um <i>nanorod</i> apresenta duas plasmónicas de ressonância, a transversal (TSPR) e a longitudinal (LSPR).....	18
<b>Figura 1. 7</b> – Modos dipolares degenerados em NP de ouro em forma de estrela (imagem de TEM e respetivo espetro UV-Vis). Contribuição do núcleo (linha a tracejado), pontas simétricas (linha a ponto-traço) e assimétricas (linha pontilhada) resultando numa banda alargada, devido à sobreposição dos diferentes modos de ressonância plasmónica (linha contínua). ....	19
<b>Figura 1. 8</b> – Imagens TEM representativas de diversas nanoestruturas de ouro: esferas (A); cubos (B); estrelas (C), <i>rods</i> (D) e triângulos (E).....	21
Figura 1. 9 – Configuração de um biossensor com os respetivos elementos funcionais. ....	28
<b>Figura 1. 10 – Fenómeno de agregação entre AuNP</b> A distância entre as NP relacionada com a estabilidade coloidal. A alteração de cores de vermelho (coloide estável) para azul (coloide agregado) resulta na alteração da banda plasmónica, de ~525 nm para cerca de ~700 nm, respetivamente. ....	30
<b>Figura 1. 11</b> – Esquema representativo de um ensaio colorimétrico usando AuNP não funcionalizadas, com base no exemplo do biossensor apresentado na referência <sup>170</sup> .....	31
<b>Figura 1. 12</b> – Esquema representativo de um ensaio colorimétrico usando AuNP funcionalizadas através do método <i>crosslinking</i> , com base no exemplo do biossensor apresentado na referência <sup>174</sup> .33	33
<b>Figura 1. 13</b> – Esquema representativo de um ensaio colorimétrico usando AuNP funcionalizadas através do método <i>non-crosslinking</i> , com base no exemplo do biossensor apresentado na referência <sup>176</sup> .....	34

<b>Figura 1. 14</b> – Esquema representativo de um ensaio colorimétrico usando AuNP funcionalizadas através do método <i>non-crosslinking</i> , com base no exemplo do biossensor apresentado na referência <sup>145, 179</sup> . Amostras de dsDNA com sequência (1) complementar, (2) não complementar e (3) com um SNP. ....	35
<b>Figura 1. 15</b> – Representação esquemática da detecção colorimétrica com nanossondas em papel. Análise dos dados por RGB (código de cores aditivas, <i>Red Green Blue</i> ). O ensaio colorimétrico consiste na agregação diferencial, ou seja, na comparação visual das cores das soluções em teste após indução da agregação das Nanossondas com sal impregnado na matriz de papel. Imagem adaptada da referência <sup>188</sup> . ....	36
<b>Figura 1. 16</b> – Esquema representativo do princípio de detecção através do método “sanduíche”. Imagem adaptada da referência <sup>194</sup> . ....	37
<b>Figura 1. 17</b> – Esquema representativo do princípio de detecção através do método SPR (A) e do método LSPR (B). Imagem adaptada da referência <sup>198</sup> . ....	38
<b>Figura 1. 18</b> – Esquema representativo do princípio de detecção por desvio da LSPR ao nível de NP individuais, por alteração do índice de refração (RI). São observadas, a cada passo, mudanças consecutivas no espectro de extinção (deslocamento do pico LSPR) à medida que diferentes tipos de moléculas de DNA interagem com a superfície da AuNP. Imagem adaptada da referência <sup>217</sup> . ....	40
<b>Figura 1. 19</b> – Esquema representativo da região de detecção de uma AuNP com geometria planar ( <i>nanorod</i> , nanotriângulo) depositada num substrato. Molécula com RI <sub>1</sub> (●), molécula com RI <sub>2</sub> (■) e plasmão representado pela mancha azul. Em função do volume do analito (V <sub>A</sub> ), dispõe-se da distância l <sub>d</sub> para que sejam detetadas alterações, sendo que essa distância corresponde ao volume de detecção V <sub>D</sub> . Imagem adaptada da referência <sup>218</sup> . ....	40

## Capítulo 2

<b>Figura 2. 1</b> – <b>Localização do SNP C/T -13910.</b> A. Localização do gene <i>LCT</i> no braço comprido do cromossoma 2, no locus 21 (seta vermelha). B. Mapa da região abrangente do cromossoma 2q21 contendo os genes <i>LCT</i> , <i>MCM6</i> e <i>DARS</i> (setas pretas indicam o sentido 5' → 3'). C. Localização da variante em estudo, o polimorfismo de base única (SNP C/T -13910) situado no intrão do gene <i>MCM6</i> (tracejado vermelho). Imagem adaptada da referência <sup>13</sup> . ....	54
<b>Figura 2. 2</b> – <b>Sequência nucleotídica de uma região específica do gene <i>MCM6</i>.</b> Fragmento de DNA resultante da amplificação - 345 bp, delimitado pelas sequências de <i>primers</i> . A cinzento estão identificados os <i>primers</i> , IL_ FWD no sentido 5'→3', (seta para a direita) e IL_ REV no sentido 5'→3', (seta para esquerda) e a [REDACTED], o SNP C/T -13910. Os <i>primers</i> selecionados apresentam as seguintes sequências, 5'-GAAGATGGGACGCTTGAATG-3' e 5'-CTGCGCTGGCAATACAGAT-3'. ....	55
<b>Figura 2. 3</b> – A. Cartões FTA® próprios para amostras de sangue (matriz branca) e saliva (matriz rosa). B. Cartões FTA® com amostra de sangue (à esquerda) e com amostra de saliva (à direita, cuja deposição se traduz na reação colorimétrica da saliva com a matriz rosa, que passa a branco na sua presença). Em baixo, uma zaragatoa, um utensílio auxiliar para a colheita de células bucais. ....	58

- Figura 2. 4 – A.** Gel de agarose após eletroforese e revelação em câmara de UVs com fragmentos de dsDNA resultantes da amplificação de amostras cujo genótipo era previamente conhecido: Poço **(a)** paciente intolerante; **(b)** paciente moderadamente intolerante; **(c)** paciente tolerante. Destaque atribuído aos possíveis *primers* não consumidos (retângulo branco) **B.** Gel de agarose com os mesmos fragmentos de dsDNA **a), b)** e **c)** após purificação com a enzima “ExoFAST”. As bandas identificadas por **M** correspondem ao marcador molecular de 100 bp e **CN** ao controlo negativo. Condições: agarose a 1,5%; 30 minutos a 12,5 V/cm em TAE 1x..... 67
- Figura 2. 5 –** Captura da imagem da quantificação de ácidos nucleicos, do *software Nanodrop* 1000 versão 3.8.1. Valores de uma medição da concentração de uma amostra de dsDNA e respetivas razões de absorvância. .... 69
- Figura 2. 6 –** Fluorogramas parciais de três amostras de produtos de *PCR* purificados, com genótipos diferentes: CC **(A)**, CT **(B)** e TT **(C)**, respetivamente. A faixa azul corresponde aos 19 nucleótidos que antecedem o SNP C/T -13910, evidenciado no retângulo..... 70
- Figura 2. 7 –** Fluorogramas parciais resultantes dos quatro ensaios com uma amostra *wild type* (CC) a diferentes concentrações de dsDNA utilizado na sequenciação: 50 ng/μL **(A)**; 20 ng/μL **(B)**; 10 ng/μL **(C)**; 5 ng/μL **(D)**. A faixa azul corresponde aos 19 nucleótidos que antecedem o SNP C/T -13910, evidenciado no retângulo. (Valores Q=19, Q=43, Q=41, Q=28 para as amostras A, B, C e D, respetivamente)..... 72
- Figura 2. 8 –** Gel de agarose com fragmentos de dsDNA não purificados com diferentes concentrações de *primer FWD*: 0,08 **(a)** 0,16 **(b)** 0, 24 **(c)** 0,32 μM **(d)** e concentração fixa de *REV* (0,4 μM), após eletroforese e revelação em câmara de UVs. *Condições*: agarose a 1,5%; 30 minutos a 12,5 V/cm em TAE 1x. O marcador **(M)** é o *GeneRuler™* 1 kb DNA Ladder..... 74
- Figura 2. 9 –** Gel de agarose com produtos *PCR* não purificados, cujo genótipo é conhecido. No 2º poço **(CC)**, no 3º **(CT)** e no 4º **(TT)**, respetivamente, dsDNA provenientes da reação de *PCR* assimétrico, após eletroforese e revelação em câmara de UVs. *Condições*: agarose a 1,5% 30 minutos a 12,5 V/cm em TAE 1x. O marcador **(M)** é o *GeneRuler™* 1 kb DNA Ladder..... 75
- Figura 2. 10 –** Fluorogramas parciais de três amostras de produtos de *PCR* não purificados, cujo volume final de *PCR* foi 10 μL e os seus genótipos diferentes: CC **(A)**, CT **(B)** e TT **(C)**, respetivamente. A barra azul corresponde ao genótipo associado ao SNP C/T -13910. (Valores Q=37, Q=28, Q=42, para amostras A, B e C, respetivamente). .... 76

### Capítulo 3

- Figura 3. 1 –** Diagrama representativo das diferentes fases de síntese de AuNP ao longo do tempo e a sua relação com a concentração atômica de precursor disponível. **Fase I** – Decomposição do precursor metálico – pré nucleação (Au(III)). **Fase II** – Formação de núcleos de cristalização/aglomerados. **Fase III** – crescimento da NP (Au(0)). Imagem adaptada da referência <sup>238</sup>.  
..... 84

<b>Figura 3. 2</b> – Diagrama representativo das duas etapas que correspondem ao método denominado por “crescimento mediado por <i>seeds</i> ” – <b>A.</b> formação de <i>seeds</i> e <b>B.</b> Crescimento mediado por <i>seeds</i> . Imagem adaptada da referência <sup>269</sup> .....	87
<b>Figura 3. 3</b> – <b>A.</b> Imagem de TEM representativa de uma amostra de AuNP-15, revestida com iões citrato (barra de escala corresponde a 100 nm); <b>B.</b> Histograma de distribuição do diâmetro das AuNP-15 presentes na amostra (N=230 partículas); valor médio do diâmetro: $14,7 \pm 1,7$ nm (desvio padrão da distribuição de tamanhos); <b>C.</b> Espectro visível de extinção da amostra de AuNP-15 em solução aquosa, com pico máximo centrado a $\lambda = 520$ nm (fator de diluição de 3); no topo à direita, fotografia do coloide de AuNP-15 depois da síntese.....	97
<b>Figura 3. 4</b> – Alterações do $\lambda_{m\acute{a}x}$ da banda plasmónica ( $\blacktriangle$ ) e do diâmetro médio ( $\odot$ ), calculado através do método de Haiss <i>et al.</i> <sup>284</sup> após cada etapa de crescimento na síntese de AuNP-80. No topo da figura representa-se esquematicamente a variação na cor da solução das AuNP com diferentes tamanhos obtidas a cada adição.....	98
<b>Figura 3. 5</b> – <b>A.</b> Imagem de TEM representativa de uma amostra de AuNP-80, revestida com citrato (barra de escala corresponde a 200 nm); <b>B.</b> Imagem de AFM ( <i>tapping mode</i> ) de uma zona selecionada da superfície de vidro onde são visíveis as AuNP-80; <b>C.</b> Histograma de distribuição do diâmetro das AuNP-80 nm obtido a partir das imagens de TEM (N=116 partículas); valor médio do diâmetro $80,7 \pm 7,1$ nm; <b>D.</b> Espectro visível de extinção da amostra de AuNP-80 em solução aquosa, com pico máximo centrado a $\lambda = 544$ nm (fator de diluição de 3); destaque do coloide de AuNP-80 depois da síntese. ....	100
<b>Figura 3. 6</b> – Espectros UV-Vis de extinção de uma amostra AuNP-15, antes (linha contínua) e depois da funcionalização com PVP K 10 (linha a tracejado). Depois de funcionalizadas passam a designar-se por Au- <i>seeds</i> . ....	101
<b>Figura 3. 7</b> – Espectros UV-Vis de extinção das amostras de AuNS dispersas em água, normalizados à unidade, para sínteses efetuadas com rácios $[HAuCl_4]/[Au-seeds]$ diferentes (R= 10; 12,5; 15; 20). No topo da figura representa-se esquematicamente a variação da cor da solução de AuNS obtidas com o aumento do rácio, desde rosa (R=10) a verde (R=20). ....	102
<b>Figura 3. 8</b> – Imagens de TEM representativas das amostras de AuNS em solução aquosa, resultantes da variação do rácio $[HAuCl_4]/[Au-seeds]$ , R= 10 ( <b>A</b> ), 12,5 ( <b>B</b> ), 15 ( <b>C</b> ) e 20 ( <b>D</b> ) e respetivos histogramas de distribuição do comprimento máximo ponta a ponta das NS. Inclui-se também a média do comprimento e o desvio padrão (número de NP analisadas <b>a1</b> = 65; <b>b1</b> = 66; <b>c1</b> = 74, <b>d1</b> = 102). Todas as barras de escala correspondem a 200 nm. ....	104

## Capítulo 4

<b>Figura 4. 1</b> – Comparação entre as AuNP usadas na preparação dos nanobiossensores. Espectros UV-Vis e respetivas imagens de TEM de nanoesferas – coloide vermelho ( <b>a</b> ) e nanoestrelas de ouro – coloide azul ( <b>b</b> ). <b>b1</b> e <b>b2</b> correspondem às duas LSPR das nanoestrelas, transversal e longitudinal, respetivamente. ....	119
---	-----

<b>Figura 4. 2 – Princípios de detecção colorimétrica envolvidos em eventos de hibridação de DNA.</b> Mecanismo, espectros UV-Vis e resultados colorimétricos em <b>(A)</b> métodos <i>crosslinking</i> <sup>153</sup> e <b>(B)</b> métodos <i>non-crosslinking</i> <sup>176</sup> . Imagem adaptada da referência <sup>305</sup> . .....	122
<b>Figura 4. 3 – Desenho das sondas e do ensaio colorimétrico aplicado às AuNP-15.</b> Representação de uma sequência incompleta do fragmento do gene <i>LCT</i> “ <i>wild-type</i> ” no sentido <i>forward</i> , com destaque para a região onde está localizado o SNP C/T na posição -13910. ....	132
<b>Figura 4. 4 – Formação das nanossondas esféricas.</b> Espectros UV-Vis das AuNP-15 após a síntese, revestidas com iões citrato (linha a vermelho) e após a funcionalização com moléculas de DNA – oligonucleótidos tiolados (linha a azul). Destaque para os máximos de absorvância, onde $\lambda_{\text{máx}}$ (LSPR vermelho) = 520 nm e $\lambda_{\text{máx}}$ (LSPR azul) = 526 nm.....	133
<b>Figura 4. 5 – Formação das nanossondas esféricas.</b> Espectros UV-Vis das nanossondas <b>(A)</b> à razão de 200, nas quais se fez variar a sonda (as sondas representadas a vermelho partilham a mesma sequência específica, bem como a azul, diferindo entre elas a presença de sequência poli-A; <b>(B)</b> nas quais se fez variar a razão [sonda]/[AuNP] usando a <i>LCT-20</i> . ....	134
<b>Figura 4. 6 – Estabilidade das AuNP-15 e das nanossondas-15 na presença de NaCl.</b> Alteração visível a “olho nu” da cor dos coloides de AuNP-15 <b>(A)</b> e das respetivas nanossondas <b>(B)</b> , ambas na presença de um gradiente crescente de NaCl. <b>(C)</b> Análise espectralométrica das nanossondas representadas em B. <b>(D)</b> Comparação da estabilidade coloidal entre AuNP e nanossondas, atendendo à razão de absorvâncias entre a absorvância da LSPR na forma estável ( $\lambda = 526$ nm) e na forma agregada ( $\lambda = 575$ nm).....	135
<b>Figura 4. 7 – Ensaio colorimétrico das nanossondas-15 na presença de um gradiente de concentrações de DNA alvo.</b> Nanossondas-15 preparadas com a sonda <i>LCT-15</i> <b>(A)</b> e <i>10A-LCT-15</i> <b>(B)</b> à razão [sonda]/[AuNP-15] de 150. Eventos de hibridação na ausência e presença de produtos de <i>PCR</i> provenientes de amostras homocigóticas, cujas sequências são complementares (CC) ou apresentam na posição -13910 o SNP (TT). Gama de valores de concentração de DNA alvo estudados compreendidos entre 1,5 e 45 ng/ $\mu$ L. Valores de R(Abs) para os ensaios com nanossonda a ~2,5 nM em TF pH=8. Indução de agregação através da adição de NaCl a 1,5 M <b>(A)</b> e 2,5 M <b>(B)</b> . Leitura das absorvâncias efetuada 15 minutos após a adição de sal. ....	138
<b>Figura 4. 8 – Ensaio colorimétrico das nanossondas-15 na presença de um gradiente de concentrações de DNA alvo.</b> Nanossondas-15 preparadas com a sonda <i>LCT-20</i> <b>(A)</b> e <i>10A-LCT-20</i> <b>(B)</b> à razão [sonda]/[AuNP-15] de 150. Eventos de hibridação na ausência e presença de produtos de <i>PCR</i> provenientes de amostras homocigóticas, cujas sequências são complementares (CC) ou apresentam na posição -13910 o SNP (TT). Gama de valores de concentração de DNA alvo estudados compreendidos entre 1,5 e 45 ng/ $\mu$ L. Valores de R(Abs) para os ensaios com nanossonda a ~2,5 nM em TF pH=8. Indução de agregação através da adição de NaCl a 2 M <b>(A)</b> e 3 M <b>(B)</b> . Leitura das absorvâncias efetuada 15 minutos após a adição de sal. ....	140
<b>Figura 4. 9 – Ensaio colorimétrico usando a nanossonda <i>LCT-20</i>.</b> Espectros UV-Vis das soluções-teste: “Branco” (linha a azul), “Complementar” (linha a vermelho) e “SNP” (linha a roxo) medidos 15 minutos após a adição de NaCl 2M. Todas as soluções-teste continham a nanossonda <i>LCT-20</i> e as	

que continham amostras de DNA alvo, estas encontravam-se à concentração de 12 ng/μL. Respetivas fotografias das soluções-teste, nas quais se verifica a diferença de cores (azul-vermelho-roxo).....	141
<b>Figura 4. 10 – Influência do aumento da concentração de NaCl na morfologia das AuNS.</b> Imagens de TEM representativas de 4 amostras de AuNS na presença de diferentes concentrações de NaCl (A) 0 M (B) 1 M (C) 2 M; (D) 3 M, nas quais é visível a alteração da morfologia das AuNS por oxidação das extremidades pontiagudas (A) até a sua transformação em esferas (D); espectros UV-Vis relativos às soluções coloidais A e D. ....	143
<b>Figura 4. 11 – Agregação das AuNS com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.</b> Espectros UV-Vis com LSPR longitudinal correspondente à forma estável, representada pela linha azul (λ <sub>máx</sub> = 746 nm) a sofrer deslocamento para comprimentos de onda superiores, correspondente à forma agregada, representada pela linha cinzenta (λ <sub>máx</sub> = 810 nm). ....	144
<b>Figura 4. 12 – Formação das nanossondas-S.</b> Espectros UV-Vis do coloide de AuNS (linha vermelha) e da nanossonda-S (linha azul), após funcionalização com (excesso) de sonda LCT-20 e seguida do processo de “salt aging”. ....	145
<b>Figura 4. 13 – Formação das nanossondas em forma de estrela.</b> Espectros UV-Vis do coloide de AuNS (A) antes da funcionalização e (B) depois da funcionalização usando diferentes razões [oligonucleótido]/[AuNP]. ....	146
<b>Figura 4. 14 –</b> Análise electroforética da mobilidade das nanossondas a diferentes razões [oligonucleótido]/[AuNS]. ....	147
<b>Figura 4. 15 – Estabilidade das AuNS e das nanossondas-S na presença de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.</b> Alteração visível a “olho nu” da cor dos coloides de AuNS (A) e das respetivas nanossondas formadas à razão [oligonucleótido]/[AuNS] de 250 (B), ambas na presença de um gradiente crescente de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . (C) Análise espectrofotométrica das nanossondas, representadas em B. (D) Comparação da estabilidade coloidal entre AuNS e nanossondas, atendendo à razão de absorvâncias entre a absorvância da LSPR na forma estável (λ= 746 nm) e na forma agregada (λ= 810 nm). ....	148
<b>Figura 4. 16 – Ensaio colorimétricos da nanossonda-S na presença de um gradiente de concentrações de DNA alvo.</b> Nanossonda-S preparadas com a sonda LCT-20 à razão [oligonucleótido]/[AuNS] de 250. Eventos de hibridação na ausência e presença de produtos de PCR provenientes de amostras homozigóticas, cujas sequências são complementares (CC) ou apresentam na posição -13910 o polimorfismo C/T (TT). Gama de valores de concentração de DNA alvo estudados estavam compreendidos entre 1,5 e 45 ng/μL. Valores de R(Abs) para os ensaios efetuados com nanossonda a ~2,5 nM em TF pH=8. Indução de agregação alcançada através da adição de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 2 M. Leitura das absorvâncias efetuada 15 minutos após a adição de sal. ....	150
<b>Figura 4. 17 – Ensaio colorimétrico usando a nanossonda LCT-20.</b> Espectros UV-Vis das soluções-teste: “Branco” (linha contínua cinzenta), “Complementar” (linha contínua azul) e “SNP” (linha ponteadada cinzenta) medidos 15 minutos após a adição de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M. Todas as soluções-teste continham a nanossonda LCT-20 (~2,5 nM em solução TF pH=8) e as que continham amostras de DNA alvo, estas encontravam-se à concentração de 9 ng/μL. Fotografias relativas às soluções-teste, nas quais se verifica a presença/ausência de cor. ....	151

**Figura 4. 18 – Cinética do ensaio colorimétrico usando a nanossonda LCT-20. Representação gráfica da R(Abs) entre a absorvância a 750 nm e a 820 nm em função do tempo. Soluções-teste:** “Branco” (linha **preta**), “Complementar” (linha **azul**) e “SNP” (linha **cinzenta**). Aquisição das absorvâncias para os dois comprimentos de onda de 90 em 90 segundos durante 15 minutos, após a adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Todas as soluções-teste continham a nanossonda LCT-20 (~2,5 nM em solução TF pH=8) e as que continham amostras de DNA alvo, estas encontravam-se à concentração de 9 ng/μL. As barras de erro referem-se a 3 repetições de cada ensaio..... 153

## Capítulo 5

**Figura 5. 1 –** Esquema representativo da Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) numa NP esférica **(A)**; LSPR numa NP não esférica, com respetivos modos longitudinal e transversal **(B)** (exemplo de um *nanorod*). Imagens adaptadas do sítio: <http://nanohybrids.net/pages/plasmonics> **(C)** Campos eletromagnéticos dipolares a evidenciar os chamados “*hotspots*” (representados a vermelho), localizados especialmente nos vértices das NP <sup>314</sup> ..... 162

**Figura 5. 2 –** Representação esquemática da formação da SAM numa superfície de ouro apenas com oligonucleótidos tiolados **(A)** e após incubação com o agente de bloqueio 6-MCH **(B)**. Esquema adaptado da referência <sup>326</sup>..... 165

**Figura 5. 3 –** Esquema representativo do princípio da microscopia de campo escuro (*DFM*). ..... 167

**Figura 5. 4 –** Esquema representativo dos equipamentos envolvidos e respetivos arranjos experimentais, na caracterização das propriedades óticas de AuNPs isoladas (p. ex. AuNP-80): Microscópio ótico **(A)** e câmara CCD **(B)** para a observação e captura de imagem em modo *darkfield* de uma zona específica do *chip* com a amostra; Espectrofotómetro UV-Vis **(C)** para aquisição do sinal LSPR de cada AuNT (luz dispersa), por intermédio do *pinhole* e da fibra ótica, e por fim, processamento do sinal para obtenção do espectro de cada NP no computador **(D)**..... 175

**Figura 5. 5 –** Exemplo de uma imagem da grelha de cobre gravada do *chip*, visto ao microscópio com uma ampliação 20x. Em destaque, outra imagem do mesmo *chip*, desta vez com uma ampliação de 50x, onde é possível visualizar os compartimentos quadrados da grelha, com letras e números no canto superior esquerdo..... 176

**Figura 5. 6 –** Representação esquemática de um AuNT nas diferentes etapas que abrangem cada experiência. **(A)** Seleção de um AuNT revestido com CTAB; **(B)** Formação da nanossonda, funcionalização desse mesmo AuNT com um oligonucleótido tiolado; **(C)** Avaliação da ocorrência de hibridação com a nanossonda, dependendo se o alvo é complementar **(C1)** ou não complementar **(C2)**, respetivamente..... 177

**Figura 5. 7 – Representação gráfica dos valores de RI medidos em função dos deslocamentos da banda LSPR.** A sensibilidade resulta do ajuste linear dos dados (**S = declive**) nos dois tipos de AuNP cujas dimensões são aproximadamente iguais. As AuNP-80 têm 80 nm de diâmetro e são representadas por ●, enquanto os AuNT são representados por ▲ e têm 80 nm de comprimento de aresta..... 178

<b>Figura 5. 8 – A.</b> Imagem de microscópio capturada pela câmara CDD de uma zona do <i>chip</i> no qual foi depositado uma amostra de coloide AuNP-80. A seleção das AuNP foi feita usando a objetiva de 100x, sendo que os pontos luminosos marcados com um círculo correspondem a AuNP esféricas com diâmetros a rondarem os 80 nm. Destaque para a AuNP-80 nº 10, onde é visível a cor verde, característica de AuNP-80. Para efeitos de obtenção de um espectro individual, atendeu-se à contribuição do <i>background</i> medido na zona interna ao círculo branco “BGD” correspondente. <b>B.</b> Espectro representativo (AuNP-80 nº 10) após o procedimento de análise, no qual o valor da intensidade de dispersão é corrigido, através da eliminação de interferências (tais como a do fundo, da fonte de luz e a <i>dark current</i> do equipamento). .....	181
<b>Figura 5. 9 –</b> Imagem de AFM (modo intermitente) de uma zona selecionada do <i>chip</i> (grelha N10), onde é possível observar inúmeros AuNT imobilizados. Alguns AuNT apresentam uma morfologia mais pontiaguda, enquanto outros apresentam vértices truncados. ....	182
<b>Figura 5. 10 – A.</b> Imagem de microscópio capturada pela câmara CDD de uma zona do <i>chip</i> no qual foi depositado uma amostra de coloide AuNT. A seleção das AuNP foi feita usando a objetiva de 100x, sendo que os pontos luminosos marcados com um círculo branco correspondem a AuNP triangulares com arestas de 90 nm. Destaque para o AuNT nº 10, onde é visível a cor vermelha, característica de AuNT com 90 nm de aresta. Para efeitos de obtenção de um espectro individual, atendeu-se à contribuição do <i>background</i> medido na zona interna ao círculo branco “BGD” correspondente. <b>B.</b> Espectro resultante após um procedimento de análise, no qual o valor da intensidade de dispersão é corrigido, através da eliminação de interferências (tais como a do fundo, da fonte de luz e a <i>dark current</i> do equipamento).....	183
<b>Figura 5. 11 – A.</b> Espectros LSPR representativos de uma AuNP-80 cujo revestimento antes da funcionalização era citrato de sódio (linha contínua) e depois da funcionalização, <b>oligonucleótido sem-SNP</b> (linha a tracejado). <b>B.</b> Espectros LSPR representativos de um AuNT cujo revestimento antes da funcionalização era <b>CTAB</b> (linha contínua) e depois da funcionalização, <b>oligonucleótido sem-SNP</b> (linha a tracejado). Condições da funcionalização das AuNP imobilizadas no <i>chip</i> : período de incubação de 15 horas à $T_{amb}$ numa solução de 1 $\mu$ M de oligonucleótido <i>sem-SNP</i> . .....	185
<b>Figura 5. 12 – Deslocamentos da plasmónica de ressonância (<math>\Delta\lambda_{m\acute{a}x}</math>) em função do tempo de incubação.</b> Os valores no gráfico correspondem a uma média de 10-12 AuNT analisados, após a funcionalização à $T_{amb}$ com uma solução de oligonucleótido <i>sem-SNP</i> 1 $\mu$ M.....	186
<b>Figura 5. 13 – Deslocamentos de ressonância plasmónica (<math>\Delta\lambda_{m\acute{a}x}</math>) em função dos elementos intervenientes na funcionalização dos AuNT.</b> Condições experimentais: 16 horas de incubação em solução de tampão fosfato 1 M <b>(A)</b> ; solução aquosa de oligonucleótido <i>sem-SNP</i> 1 $\mu$ M <b>(B)</b> ; <i>chip</i> -sonda B após incubação com solução de 6-MCH 1 mM <b>(C)</b> ; <i>chip</i> -sonda B após incubação com solução de 6-MCH 5 mM <b>(D)</b> . As restantes barras à direita correspondem aos desvios causados após a funcionalização com os oligonucleótidos alterados na posição 5 ( <i>SNP5</i> ), 10 ( <i>SNP10</i> ) e 20 ( <i>SNP20</i> ), às mesmas condições mencionadas para o <i>chip</i> -sonda B. Cada barra representa o valor médio de $\Delta\lambda_{m\acute{a}x}$ nas medições efetuadas a 10-12 AuNT. ....	188
<b>Figura 5. 14 – Representação esquemática de um ensaio de deteção e respetivos espectros LSPR.</b> Deslocamentos da ressonância plasmónica relativos ao <i>chip</i> -sonda C (oligonucleótido <i>sem-SNP</i> 1 $\mu$ M	

+ 6-MCH 1 mM) na presença de DNA alvo de sequência complementar **(A)** e não complementar **(B)**. A linha contínua a preto em ambas as figuras corresponde ao espectro dos AuNT revestidos por CTAB; a linha tracejada ao espectro LSPR do *chip*-sonda C antes da hibridação; a linha **vermelha** em A corresponde ao espectro depois da hibridação com o alvo complementar (1  $\mu$ M) e a linha **azul** em B corresponde ao espectro depois da hibridação na presença do alvo não complementar (1  $\mu$ M). A reação de hibridação ocorreu à  $T_{amb}$  durante 3 horas usando o tampão SSC (2x). ..... 190

**Figura 5. 15 – Efeito das condições de rigor durante a reação de hibridação e da concentração de MCH.** Deslocamentos de ressonância plasmónica ( $\Delta\lambda_{m\acute{a}x}$ ) calculados depois da reação de hibridação com alvos ssDNA complementares e não complementares à  $T_{amb}$ , por um período de incubação de 3 horas. **(A)** SSC 5x concentrado; **(B)** tampão SSC 2x concentrado. Cada barra corresponde à aquisição e análise de espectros UV-Vis de 12 AuNT..... 191

# ÍNDICE DE TABELAS

## Capítulo 1

---

Tabela 1. 1 – Tipos e características relativas à hipolactasia.....	8
<b>Tabela 1. 2</b> – Polimorfismos responsáveis pela HPTA, C/T -13910 e G/A -22018, genótipos e implicações quanto à atividade da lactase.....	14
<b>Tabela 1. 3</b> – Estratégias de bioconjugação usadas em NP plasmónicas.....	25
<b>Tabela 1. 4</b> – Principais tipos de interação entre AuNP conjugadas com biomoléculas e as moléculas alvo, aplicadas em sensores.....	26

## Capítulo 2

---

Tabela 2. 1 – Reagentes químicos e respetivos distribuidores.....	56
<b>Tabela 2. 2</b> – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificar a região de interesse do gene <i>MCM6</i> que contém a variante genética em estudo (SNP C/T -13910) através da técnica de <i>PCR</i> . ....	57
<b>Tabela 2. 3</b> – Reagentes utilizados nos procedimentos que envolvem biologia molecular (enzimas, kits comerciais, etc.) .....	57
<b>Tabela 2. 4</b> – Condições de temperatura e tempos de incubação para a ativação da enzima do <i>kit</i> Prep-Gem® e extração do DNA contido num disco do cartão FTA.....	60
<b>Tabela 2. 5</b> – Reagentes e respetivas concentrações (listados por ordem de adição) usados na preparação do pré- <i>mix</i> para a reação de <i>PCR</i> específica para IL.....	60
<b>Tabela 2. 6</b> – Condições de temperatura, tempos e ciclos de repetição nas diferentes etapas da reação de <i>PCR</i> específica para IL.....	61
<b>Tabela 2. 7</b> – Condições de temperatura e tempos de incubação para a ativação da enzima “ExoFAST” no âmbito da purificação dos produtos de <i>PCR</i> .....	62
<b>Tabela 2. 8</b> – Condições de temperatura, tempos e ciclos de repetição nas diferentes etapas da reação de sequenciação de <i>Sanger</i> , específica para a IL. ....	64
<b>Tabela 2. 9</b> – Reagentes e respetivas concentrações (listados por ordem de adição) usados na preparação do pré- <i>mix</i> utilizado no <i>PCR</i> assimétrico usando discos do cartão FTA, para um volume final de 10 µL. ....	65
<b>Tabela 2. 10</b> – Parâmetro de avaliação na atribuição de bases por um sequenciador, Q <sup>233</sup> . ....	71

## Capítulo 3

---

Tabela 3. 1 – Reagentes químicos utilizados e respetivos distribuidores .....	89
<b>Tabela 3. 2</b> – Séries de lavagens por centrifugação das AuNS e respetivas condições .....	92
<b>Tabela 3. 3</b> – <b>Posicionamento da banda transversal (LSPR1) e longitudinal (LSPR2).</b> Dados relativos à análise espectrofotométrica das soluções coloidais obtidas.....	103
<b>Tabela 3. 4</b> – Resumo dos dados relativos à análise das imagens de TEM.....	105

## Capítulo 4

---

<b>Tabela 4. 1</b> – Reagentes químicos utilizados e respectivos fabricantes.....	124
<b>Tabela 4. 2</b> – Sequências dos oligonucleótidos sintéticos desenhados para a funcionalização das AuNP .....	124
<b>Tabela 4. 3</b> – Reagentes e concentrações requeridas na preparação das soluções tampão de fosfato de sódio, a pH 7 e pH 8.....	125
<b>Tabela 4. 4</b> – Valores da concentração de NaCl mínima necessária para a indução de agregação de nanossondas preparadas à razão de 150.....	136

## Capítulo 5

---

Tabela 5. 1 – Reagentes químicos utilizados e respectivos fabricantes .....	169
<b>Tabela 5. 2</b> – Sequências nucleótídicas dos oligonucleótidos sintéticos envolvidos na funcionalização das AuNP e na reação de hibridação. Destaques em <i>itálico</i> correspondem a sequência poli-A e parte sublinhada à sequência complementar ao oligonucleótido " <i>sem-SNP</i> ".....	170
<b>Tabela 5. 3</b> – Condições de centrifugação para a preparação da amostra (de acordo com as características de cada AuNP).....	171
<b>Tabela 5. 4</b> – Deslocamentos de ressonância plasmônica ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ) após a reação de hibridação dos <i>chip</i> -sondas (preparados às mesmas condições do chip-sonda C para ambas as AuNP) com produtos de <i>PCR</i> , com sequência complementar (C) e não complementar (NC). Condições de hibridação previamente otimizadas (3 horas a 25 °C com SSC 2x e 1 mM de MCH). Cada valor representa a média de valores obtidos para 10-12 AuNT.....	193
<b>Tabela 5. 5</b> – Deslocamentos de ressonância plasmônica ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ) após reação de hibridação das nanossondas com alvos complementares de DNA sintético. As sequências das sondas foram alteradas num nucleótido, localizado na posição 5, 10 e 20; aplicação das condições de hibridação previamente otimizadas. Cada valor representa a média de valores obtidos para 10-12 AuNT.....	194







# **C***apítulo I.*

## Introdução Geral



## Contextualização do tema

Com a conclusão do Projeto Genoma Humano, um projeto internacional que consistiu na sequenciação do genoma humano e na identificação de todos os nucleótidos que o constituem, foi possível através do esforço de inúmeras equipas de investigação e de equipamentos dedicados, criar condições para que se pudessem compreender os diversos fatores genéticos que modulam e causam o desenvolvimento de determinadas condições médicas. Paralelamente, a quantidade de informação adquirida no âmbito de estudos epidemiológicos, nomeadamente o *genome-wide association study* (GWAS), no qual se identificaram milhões de polimorfismos de base única (SNP), possibilitaram também estabelecer correlações entre a ocorrência deste tipo de polimorfismos e os fenótipos associados a intolerâncias ou alergias a determinados alimentos, como é o caso da lactose. Dado que estes estudos decorreram à escala mundial, os dados recolhidos abrangeram informações relativas a populações de diferentes etnias, faixas etárias, etc. Este aspeto permitiu que se identificassem diferentes variantes de SNP associadas à intolerância à lactose (IL), cujas prevalências variam entre diferentes populações.

Antes de se dispor destas informações, a IL era considerada uma condição ancestral aos seres humanos em idade adulta, caracterizada pela diminuição progressiva da produção de lactase. As reações decorrentes da ingestão de lactose eram variáveis de indivíduo para indivíduo e os sintomas, exclusivamente avaliados com base em métodos de diagnóstico diretos (biópsia) ou indiretos. Entretanto, com a descodificação e estudo do genoma humano foi possível identificar o motivo pelo qual alguns indivíduos em idade adulta possuíam a capacidade de digerir o dissacarídeo da lactose. A existência de um SNP, o C/T -13910 localizado na região reguladora do gene *LCT* (gene *MCM6*) foi apontada como a principal causa para a manifestação do fenótipo oposto ao partilhado pelos nossos ancestrais. Desde então, a área da Nutrigenética começou a ganhar terreno e a procura pelos testes de DNA para o diagnóstico molecular da IL aumentou consideravelmente. Esta situação foi fruto da consciencialização generalizada da população face à importância dos fatores genéticos na manifestação e previsão de determinadas doenças / condições de saúde, dando-se assim início ao desenvolvimento de inúmeros protocolos específicos de genotipagem através de reações de sequenciação.

A STAB-Vida Lda. enquanto empresa de biotecnologia especializada em serviços genéticos (sequenciação de *Sanger*, *Next Generation Sequencing*, etc.) utilizou esta informação para disponibilizar ao público uma ampla variedade de testes genéticos (intolerância à lactose, doença celíaca, paternidade, etc.). Porém, com a recente implementação de legislação que ditou a proibição da venda direta ao público de testes de DNA relacionados com a saúde, a sua aquisição passou a ser exclusivamente através de prescrição médica. Para a empresa STAB-Vida Lda., que mantém colaborações com diversas instituições de saúde dentro e fora de Portugal (hospitais e clínicas privadas), a restrição ao público teve repercussões imediatas na venda dos seus produtos e serviços, acarretando um aumento do preço dos testes. O mais preocupante foi que estes argumentos serviram para que se voltasse novamente a recorrer aos métodos convencionais (indiretos), sendo que alguns

deles, para além de serem algo invasivos, apresentam limitações que podem resultar em diagnósticos inconclusivos, e consequentemente orientações clínicas pouco ajustadas.

Ainda que a deteção de sequências de ácidos nucleicos específicos com base em reações de sequenciação de *Sanger* continue a ser o método mais rigoroso e menos invasivo, este envolve procedimentos bastante complexos e dispendiosos, exigindo equipamento e pessoal técnico especializados. Assim e dadas estas circunstâncias, surge a necessidade de procurar alternativas aos métodos de diagnóstico molecular, nomeadamente ao teste genético da IL para uso em sistemas *POC*. O desenvolvimento destes sistemas requer que estes sejam capazes de detetar com o mesmo grau de sensibilidade e seletividade, os SNP associados às condições médicas da IL, de forma simples, barata e cujo acesso ao cliente se efetue da forma o mais direta possível.

Foi neste contexto que, em parceria com a STAB-Vida Lda. se desenvolveram durante este projeto de Doutoramento quatro abordagens distintas de sistemas nanotecnológicos em solução e em *chip* para a deteção de sequências de DNA e ácidos nucleicos especificamente relacionadas com a IL. Dentro da vasta gama de sistemas nanotecnológicos aplicados a ensaios de biologia molecular, o uso de nanopartículas de ouro (AuNP), graças às suas propriedades físico-químicas e especialmente óticas, únicas, são um dos componentes mais promissores na área do nanodiagnóstico. Os sistemas de deteção propostos visam a sua futura implementação em sistemas *POC* com base em microfluídica ou dispositivos portáteis. Ainda no âmbito de melhorar a rotina laboratorial e tornar um dos *kits* Nutrigene da STAB-Vida Lda. mais competitivo no mercado, efetuaram-se alguns ajustes ao protocolo vigente usado para a identificação dos genótipos associados à IL, tornando-o mais rápido e menos dispendioso.

## 1.1 Intolerância à lactose e a opinião pública

*“O consumo do leite tem vindo a descer.”* **Jornal de Notícias**, 17 de março de 2016 *“A intolerância à lactose é uma moda, para a qual não existe qualquer fundamento científico, e que resulta da influência da indústria de produção de soja.”* **Jornal Diário de Notícias**, 13 de janeiro de 2016 *“Devemos beber leite de vaca? Discussão faz baixar o consumo.”* **Jornal Diário de Notícias**, 4 de setembro de 2015 *“O leite já não é uma vaca sagrada.”* **Jornal Público**, 22 de fevereiro de 2015. Estes são só alguns exemplos de citações que recentemente têm surgido nos órgãos de comunicação social, que têm incontornavelmente influenciando (e, muito!), a opinião pública.

Nos últimos anos, à semelhança do glúten, a intolerância à lactose (IL) tem vindo a tornar-se num tema bastante mediatizado, sobretudo quando em causa está o bem-estar e saúde alimentar. Abordado não só por especialistas (nutricionistas, médicos endocrinologistas e geneticistas), o tema da “intolerância à lactose” tem também despertado o interesse da sociedade em geral, sobretudo numa altura em que muito se discute e opina acerca de hábitos alimentares saudáveis. É de lembrar que em discussão está um tema, que por si só é bastante polémico e que infelizmente ainda hoje, não está totalmente esclarecido. Quando a própria informação disponível não é consensual, surgem inúmeras “opiniões”, muitas delas contraditórias e altamente falaciosas, cujo impacto acaba por dividir as pessoas, levantando ainda mais dúvidas: *“Porque é que eu sou intolerante e ele, não é?”* *“Se ele não bebe leite e sente-se melhor, também vou deixar de beber!”* *“Como é que eu sei se sou intolerante?”* ... Não é por acaso que a palavra “moda” surge na primeira citação, visto que atualmente se assiste a um fenómeno de auto-aconselhamento alimentar, na grande maioria das vezes, desajustado.

Como tal, embora todo o trabalho apresentado nesta Tese se foque numa vertente mais nanotecnológica, nomeadamente no desenvolvimento de um sistema ótico capaz de detetar o polimorfismo C/T -13910 (rs4988235), responsável pela IL, utilizando nanopartículas de ouro, pareceu-me fundamental sendo que é um tema tão atual, apresentar uma introdução teórica, que seja capaz de algum modo, responder a todas as questões acima referidas.

### 1.1.1 Definições de termos e conceitos

Na pesquisa de informação relativa ao tema “intolerância à lactose” torna-se imperativo esclarecer previamente o significado de cada termo que surge associado ao tema. É comum, sobretudo quando se trata de informação não científica, encontrarem-se inúmeros termos e designações, tais como, má absorção de lactose, hipolactasia e não persistência da lactase, todos eles apresentados de forma errônea como sinónimos de IL. Ainda que pequenas, existem diferenças entre estes conceitos que devem ser esclarecidos.

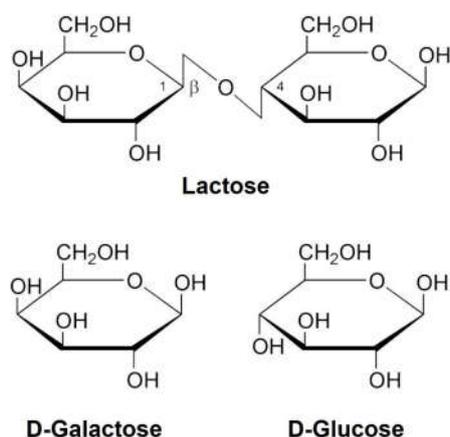
A **hipolactasia** é definida como uma condição que se traduz na diminuição ou ausência da capacidade de produzir lactase. A incapacidade de produzir lactase resulta na **má absorção** ou digestão completa da lactose e por conseguinte, na **intolerância à lactose**. O aparecimento de sintomas abdominais por má absorção de lactose caracteriza a IL, no entanto a má absorção de lactose nem sempre provoca sintomas de IL.

A **não persistência da lactase** (NPL) é por sua vez caracterizada por um declínio progressivo da atividade da lactase após os primeiros anos de vida, dando origem à hipolactasia e consequentemente à IL. Outro conceito é a **persistência da lactase** (PL) que surge como o oposto da condição se ser intolerante à lactose, refletindo o fenótipo ancestral de um indivíduo que é capaz de digerir lactose, dado que revela alta atividade de lactase ao longo de toda a vida.

Em suma, quando se refere que um indivíduo é intolerante à lactose, tal corresponde a dizer que o indivíduo manifesta sintomas de hipolactasia, mais especificamente, revela NPL no seu organismo, ao longo da vida <sup>1,2</sup>.

### 1.1.2 Origem da Intolerância à Lactose

A lactose ( $\beta$ -galactosil-1-4-glicose) é um dissacarídeo ( $\beta$ -galactosídeo) composto por glicose e galactose (**figura 1.1**). A única fonte natural deste hidrato de carbono é o leite de mamíferos que possuem placenta. A lactose é a primeira fonte de hidratos de carbono para os mamíferos sendo, nos primeiros anos de vida, o açúcar mais importante para o seu desenvolvimento.



**Figura 1. 1** - Fórmulas estruturais do dímero da lactose e dos seus monómeros constituintes, a D-galactose e a D-glucose.

A lactose é sintetizada nas células epiteliais das glândulas mamárias mediante uma reação que depende de duas proteínas, a alfa-lactalbumina e a N-acetil-galactosil-transferase <sup>3</sup>. A sua concentração no leite varia segundo a espécie, sendo cerca de 7% no leite humano e cerca de 5% no leite de vaca <sup>4</sup>.

Com a domesticação de animais, há cerca de 10 mil anos, o ser humano passou a ingerir para além do leite materno, como é característico dos mamíferos nos primeiros anos de vida, leite de animal em idade adulta. A inserção do leite na sua dieta deveu-se ao facto de, em determinadas alturas, a fauna e flora não serem capazes de suprir as suas necessidades, criando no homem a necessidade de recorrer à ingestão de leite animal como alimento que lhe garantisse a sobrevivência. O que se verificou ao longo do tempo, foi que essa necessidade conduziu a uma adaptação do homem ao meio. De tal forma que hoje, embora saibamos que ancestralmente só fosse capaz de digerir lactose durante o período lactente, o homem conservou a capacidade de a digerir também em idade adulta, representando uma evolução “anómala” <sup>2</sup>.

É em meados do século XX, na sequência de recorrentes sintomas gastrointestinais associados à ingestão de leite, nomeadamente, diarreia, náuseas e vômitos, dores e inchaço abdominal, que os primeiros casos foram clinicamente documentados. No entanto, só a partir de 1960 é que as suas bases bioquímicas começaram a ser devidamente definidas por Dahlqvist *et al* <sup>5-7</sup>.

Mais tarde, com a descoberta da importância das vitaminas para a saúde e da adição de vitamina D ao leite, as indústrias de laticínios contribuíram amplamente para a alteração da “imagem” do leite junto do público consumidor. De alimento essencial para os recém-nascidos, passou a ser visto como um dos alimentos mais completos e indicados em todas as faixas etárias. Os programas de orientação nutricional passaram a estimular o aumento do consumo de leite, enfatizando os seus benefícios a longo prazo, sobretudo na fortificação dos ossos através da fixação de cálcio <sup>8,9</sup>.

Em consequência deste crescente consumo de leite, cujo impacto se manifestou de forma bastante heterogénea, ou seja, através de sintomas de gravidade díspar, inúmeros estudos que envolviam a digestão e absorção da lactose foram aprofundados <sup>10,11</sup>.

### 1.1.3 Tipos de Hipolactasia

Para que ocorra absorção da lactose, o organismo deve possuir ou produzir uma enzima que seja capaz de hidrolisar o dissacarídeo. A enzima em questão é a hidrólase da lactase-florizina (*LPH*), normalmente designada apenas por lactase. Esta enzima é produzida nas microvilosidades da membrana dos enterócitos e tem a sua atividade máxima no intestino delgado proximal <sup>12-14</sup>.

Assim, com base na atividade da lactase, a hipolactasia (insuficiência/ausência de lactase) pode ser dividida em duas categorias, primária e secundária. Por sua vez, a hipolactasia primária subdivide-se em duas categorias, a de origem congénita e a do tipo adulto, enquanto a hipolactasia secundária pode também ser designada por adquirida.

Na **tabela 1.1** estão apresentadas categorias e subcategorias da hipolactasia, bem como as suas características que refletem a origem, a frequência, a produção de lactase e quando se manifesta esta condição.

**Tabela 1. 1** – Tipos e características relativas à hipolactasia

HIPOLACTASIA			
		CONGÉNITA	DO TIPO ADULTO
<b>PRIMÁRIA</b>	<i>Frequência</i>	Rara	Comum
	<i>Origem</i>	Hereditária (polimorfismo <i>LCT</i> )	Ancestral (polimorfismo <i>MCM6</i> )
	<i>Produção de lactase</i>	Incapacidade total ou escassa	Diminuição progressiva
	<i>Quando se manifesta?</i>	À nascença	Após período de amamentação
<b>SECUNDÁRIA</b>	<i>Frequência</i>	Transitória e reversível	
	<i>Origem</i>	Danos ao nível da mucosa intestinal	
	<i>Produção de lactase</i>	Diminuição pontual	
	<i>Quando?</i>	Variável	

A **hipolactasia primária** que deriva de uma **deficiência congénita** da lactase, é considerada uma variável relativamente rara, presumivelmente transmitida por herança genética autossómica recessiva <sup>15</sup>.

Esta condição é caracterizada por uma ausência (ou escassez) de lactase ao nascimento, sendo que nada tem a ver com deficiências ao nível da histologia da mucosa, nem com a atividade das enzimas digestivas. Nestes casos, é aconselhada a cessação por completo da ingestão do leite materno ou qualquer substituto que contenha lactose. Caso contrário, em situações extremas, pode

mesmo conduzir à morte (desidratação), uma vez que o organismo do recém-nascido não possui qualquer capacidade de digerir esta biomolécula <sup>11, 16, 17</sup>.

A **hipolactasia do tipo adulto (HPTA)** é considerada uma característica ancestral à espécie humana, isto é, uma condição autossômica recessiva comum, resultante do declínio da atividade fisiológica da lactase em células intestinais, logo após o fim do período de amamentação. A redução na expressão de lactase é geneticamente programada e irreversível, cujo mecanismo, ainda hoje, permanece desconhecido.

A atividade da lactase sofre um declínio por altura da idade do desmame, passando de intensa a residual durante a vida adulta. A diminuição da atividade desta enzima é mais pronunciada durante a infância e a adolescência (5-10 anos), chegando a atingir apenas 5 a 10% dos níveis apresentados ao nascimento, configurando um estado de hipolactasia ou não persistência da lactase <sup>18</sup>. Esta situação leva à acumulação de lactose ao nível do intestino delgado <sup>19</sup>, aquando da ingestão de leite ou seus derivados e conseqüentemente, a um aumento da flora intestinal, cujos sintomas associados variam de indivíduo para indivíduo. <sup>11, 16</sup>.

Atualmente estima-se que cerca de 75% da população mundial, na idade adulta, apresente esta característica <sup>16</sup> (**figura 1.2**), e embora cause sintomas quando se dá a ingestão de leite ou derivados, não é considerada doença, mas sim uma condição.



**Figura 1. 2** - Mapa mundial representativo da prevalência da HPTA na população atual. Imagem retirada do sítio da ENSA <sup>20</sup>, acessado em Abril de 2014.

Ao contrário da hipolactasia primária, a **hipolactasia secundária ou adquirida** não tem qualquer implicação genética e é frequentemente transitória e reversível, resultando apenas de alterações ao nível da mucosa intestinal. Estas podem ser decorrentes de um sobre crescimento bacteriano, de lesões da mucosa devido a doença celíaca <sup>21</sup>, parasitoses, ressecção do intestino delgado, fibrose cística, ou da ingestão de álcool e drogas <sup>11, 16</sup>.

## 1.1.4 Hipolactasia primária do tipo adulto (HPTA)

### 1.1.4.1 Fatores que influenciam a prevalência da HPTA

Sabe-se hoje que o fenótipo “tolerante”, decorrente da persistência da lactase no organismo, é observado com maior frequência em populações caucasianas descendentes de povos da Europa do Norte, onde, há cerca de 10 mil anos, foi introduzida a atividade pecuária, com produção e consumo de leite e derivados <sup>2, 22, 23</sup>. Em contraste, em regiões onde as populações dependiam fundamentalmente da agricultura no passado, esse fenótipo não é tão frequente <sup>16, 24</sup>.

Um exemplo de que a PL se desenvolveu de forma independente, em diferentes áreas do mundo <sup>25</sup>, são os Estados Unidos da América, cuja população apresenta 40 milhões casos de pessoas que sofrem de IL <sup>26</sup>. Embora partilhem a mesma localização geográfica, o facto de serem fruto da miscigenação, é suficiente para, que na mesma população existam prevalências da PL completamente dispares. Em indivíduos adultos nativos a percentagem ronda os 75%, à semelhança dos valores estimados para populações da Europa Central e Sul; em adultos afro-americanos o valor desce para metade, ficando-se nos 30%, sendo que o valor de prevalência mais baixo é verificado em indivíduos descendentes de asiáticos, cuja percentagem não alcança os 10%. Este exemplo vem corroborar a teoria de que o **desenvolvimento ancestral da pecuária e introdução do leite animal na dieta**, em alturas desfasadas, constituiu o principal fator para uma pressão seletiva a nível geográfico, mas sobretudo étnico <sup>26</sup>.

A mudança no padrão alimentar pode ter propiciado condições para o aparecimento e propagação dos genes dominantes, frutos das mutações, considerando que a PL constituiria uma característica vantajosa do ponto de vista evolutivo. Daí que as mutações identificadas em europeus são tão diferentes das encontradas em africanos. A PL gerou, uma vantagem seletiva de 1,5 a 19% em cada geração <sup>27, 28</sup>. Este valor indica uma forte pressão de seleção comparável a genes de resistência da malária (2-5% para a deficiência de *G6PD*, 5 a 18% para a anemia falciforme) em várias partes do mundo <sup>29</sup>.

Levantou-se também a hipótese de que elevadas prevalências de PL manifestadas em populações do norte europeu, se deviam à influência da lactose na **absorção intestinal de cálcio**. Devido à escassa exposição solar nessa região, nas populações dessa região havia uma elevada prevalência de doenças ósseas (raquitismo e osteomalacia). Por sua vez, a baixa exposição solar, determinava uma ineficiente produção da vitamina D, comprometendo, por defeito a absorção de cálcio <sup>8, 9, 30</sup>. Esta seria uma das razões que justificaria o facto dos indivíduos desta região se terem adaptado evolutivamente ao meio, através de uma maior tolerância à lactose, por adaptação da sua flora intestinal. Sendo que este argumento serviu de base para a propaganda usada no impulso ao consumo de leite e derivados do século passado.

#### 1.1.4.2 A enzima lactase e funções dos genes *LCT* e *MCM6*

A lactase, LPH é uma enzima constituída por 1927 resíduos de aminoácidos <sup>14</sup>, caracteriza-se por ser uma glicoproteína transmembranar de 160 kDa, cuja parte C-terminal é intracelular e a N-terminal encontra-se na superfície luminal da bicamada lipídica dos enterócitos.

O gene responsável pela sua codificação é o *LCT*, o qual apresenta 49,3 kb de comprimento e está localizado no braço longo do cromossoma 2, mais concretamente, no *locus* 2q21 <sup>22, 31</sup>. Este gene possui 17 exões, sendo que nas suas proximidades existe um outro, o *MCM6* (*MiniChromossome Maintenance6*), que devido à existência de uma sequência específica de DNA (região reguladora), passa a desempenhar um papel fundamental no controle da atividade e regulação do gene *LCT* <sup>32</sup>.

A localização de mutações no gene *LCT* ou nos genes adjacentes, que intervêm diretamente na expressão da lactase, como é o caso do *MCM6*, apresentam implicações distintas quanto à origem da IL. Se por um lado, a IL em bebés é causada por mutações apenas ao nível do gene *LCT*, a IL em adultos (HPTA) é causada pela alteração genética e programada da atividade (expressão) do gene *LCT*.

No entanto, é necessário esclarecer que ao contrário do que se pensou durante muitos anos, o fenótipo decorrente da não persistência da lactase (“intolerante”) que corresponde à HPTA, é o tipo ancestral, enquanto o fenótipo que resulta em persistência à lactase (“tolerante”) é decorrente de uma mutação pontual na região reguladora do *LCT*, isto é, no gene *MCM6*. Outro aspeto importante a referir é que em casos de PL, não se verificam quaisquer diferenças estruturais e funcionais entre a lactase presente num individuo adulto, da lactase correspondente em criança <sup>33</sup>.

#### 1.1.4.3 Diagnóstico da HPTA

O diagnóstico da HPTA pode ser realizado de duas formas, direta ou indireta. A quantificação direta da lactase via **biópsia do intestino delgado** é um método bastante rigoroso, porém demasiado invasivo <sup>34, 35</sup>. De modo a evitar as desconfortáveis endoscopias, diversos outros métodos indiretos foram desenvolvidos com o propósito de diagnóstico, todos envolvendo a digestão da lactose para fornecer informação sobre a expressão da enzima.

O **teste de glicose** no sangue, ainda que seja considerado invasivo, dado que o paciente tem de ingerir enormes quantidades de leite, é hoje em dia, bastante difundido no diagnóstico da IL baseado em análises clínicas <sup>36</sup>. É um método que apresenta resultados bastante satisfatórios e semelhantes aos provenientes da biopsia ao intestino delgado, tanto ao nível da sensibilidade como da especificidade, a rondarem ambos os 75-95%. Outro método comum é o **teste do hidrogénio expirado**, sendo que entre todos os mencionados, é claramente o menos invasivo e o que apresenta maior sensibilidade (60-100%) e especificidade (89-100%) <sup>36-38</sup>.

Embora os testes descritos sejam eficazes na avaliação da absorção de lactose, uma das suas desvantagens é o facto de por exemplo, não permitirem distinguir uma IL decorrente de HPTA, de uma hipolactasia secundária. Para além disso, requerem por parte do paciente, uma série de requisitos

prévios na preparação para o teste e garantias de que os cumpre na totalidade, pois só assim os resultados podem ser validados <sup>11, 16</sup>.

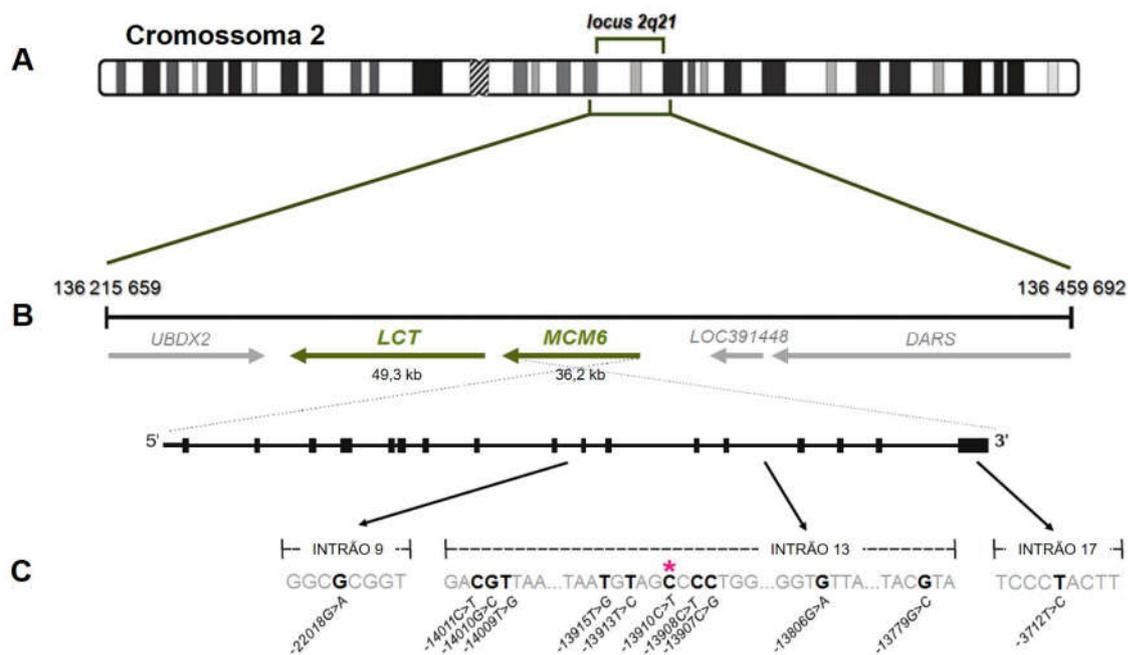
Por conseguinte, devido ao facto da hipolactasia primária (congénita ou do tipo adulto, HPTA), ser resultado da existência de mutações ao nível dos genes *LCT* e *MCM6* situados no locus *LCT* (**figura 1.3**), o diagnóstico por intermédio de um **exame genético (sequenciação)** é a forma mais rigorosa e fidedigna de diagnosticar ambos os tipos de hipolactasia primária, sobretudo a HPTA. Este tipo de teste genético para HPTA, provou ter 100% de especificidade e 93% de sensibilidade na deteção da IL em crianças com 12 anos de idade <sup>39</sup>.

Como tal, em detrimento dos métodos supracitados, a abordagem genética apresenta inúmeras vantagens, na medida em que o resultado não sofre qualquer tipo de interferência interna ou externa. A genotipagem limita-se exclusivamente a fornecer o património genético, permitindo à posteriori correlacionar a componente genética de um indivíduo com a sua expressão e regulação génica envolvidas na produção de lactase.

A sequenciação do gene *LCT* em indivíduos adultos, revela alterações na região reguladora do *LCT*, localizada no gene *MCM6*, na qual até à data foram identificadas pelo menos 43 polimorfismos de base única (SNP) e 9 deleções/inserções de polimorfismos <sup>13</sup>.

#### **1.1.4.4 Polimorfismos de base única associados à HPTA**

Em 2002, Enattah *et al.* identificou duas variantes de SNP, designadas por **C/T -13910** (rs4988235) e **G/A -22018** (rs182549), localizando-se ambos os polimorfismos a cerca de 14 e 22 Kb a montante do gene *LCT*, respetivamente, nos intrões 9 e 13 do gene *MCM6* <sup>13</sup>. Na **figura 1.3** é possível visualizar o mapa do cromossoma 2, nomeadamente a região envolvente do gene *LCT* (*MCM6*), onde estão localizadas as variantes de polimorfismos relacionadas com a HPTA.



**Figura 1.3 - A.** Mapa do cromossoma 2, em destaque na segunda região (2), da primeira banda (1) do braço longo (*locus 2q21*), **B.** Mapa do *locus 2q21* onde estão situados os genes *LCT* e *MCM6*, nos quais os SNP podem ser encontrados; **C.** Localização dos SNP associados à HPTA entre os intrões 9 e 13 do gene *MCM6* nas populações europeia, africana e do Médio Oriente. O SNP C/T -13910 (rs4988235) está marcado com um (\*). Imagem adaptada da referência <sup>13</sup>.

O estudo finlandês liderado por Enattah demonstrou que ambos os SNP estariam associados ao fenótipo decorrente da HPTA em indivíduos de quatro populações (Finlândia, Itália, Alemanha e Coreia do Sul) <sup>13</sup>. Na **tabela 1.2** são apresentados os genótipos dos dois polimorfismos C/T-13910 (rs4988235) e G/A -22018 (rs182549) e os respetivos fenótipos.

**Tabela 1. 2** – Polimorfismos responsáveis pela HPTA, C/T -13910 e G/A -22018, genótipos e implicações quanto à atividade da lactase.

<b>Genótipo</b>	<b>Atividade da lactase (fenótipo)</b>
<b>SNP C/T -13910 (rs4988235)</b>	
<b>CC</b>	Não persistência da lactase (HPTA - intolerante)
<b>CT*</b>	Persistência da lactase (tolerante)
<b>TT</b>	Persistência da lactase (tolerante)
<b>SNP G/A -22018 (rs182549)</b>	
<b>GG</b>	Não persistência da lactase (HPTA - intolerante)
<b>GA*</b>	Persistência da lactase (tolerante)
<b>AA</b>	Persistência da lactase (tolerante)

O polimorfismo C/T-13910 (rs4988235), envolve as bases C e T e resulta em HPTA quando o alelo C está em homozigotia (genótipo CC), apresentando uma frequência de 100%<sup>27, 40</sup>. Por sua vez, o SNP G/A-22018 (rs182549) confere um fenótipo compatível com a HPTA em mais de 95% dos casos quando ocorre a presença de dois alelos G em homozigotia (GG)<sup>13</sup>. Inversamente, a presença dos alelos T -13910 e A -22018 está associada com o fenótipo compatível com a “persistência da lactase” na fase adulta.

Segundo alguns autores, os heterozigotos CT do SNP-13910 e GA -22018 possuem atividade intermediária de lactase<sup>38, 41, 42</sup>. Para além do que, estes indivíduos são mais suscetíveis a desenvolver IL secundária e a eventuais eventos associados à lesão da mucosa intestinal<sup>38, 42, 43</sup>

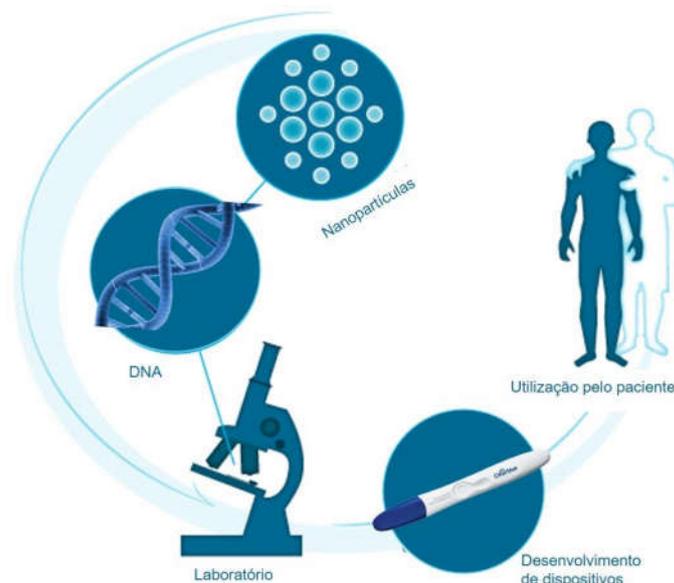
Mais tarde, Tishkoff *et al.* identificou a existência de mais três variantes de SNP relacionados com a PL em diferentes populações africanas e do Médio Oriente. Respetivamente, o SNP T/G -13915 (rs41380347) foi identificado no Sudão e Médio Oriente, o G/C -14010 (rs145946881) em populações quenianas e da Tanzânia e o C/G -13907 (rs41525747) foi descoberto na população da Etiópia, o que fez estabelecer a hipótese destas mutações poderem ser fruto de seleção natural<sup>44</sup>.

Os estudos prosseguiram no sentido de se desenvolver uma correlação da base genética com os sintomas de HPTA em diferentes regiões, tendo-se chegado à conclusão que a condição HPTA é ainda altamente prevalente em países asiáticos e africanos (>90%), ao passo que nos países do Norte da Europa a prevalência do HPTA varia entre 1-18%<sup>45-47</sup>.

## 1.2 Nanodiagnóstico, o uso da nanotecnologia aplicada ao diagnóstico

A nanomedicina baseia-se na aplicação da nanotecnologia ao serviço da saúde do homem, na medida em que consiste na concepção, produção, caracterização ou aplicação de elementos à escala nanométrica, com vista na terapia, diagnóstico e prevenção de doenças. É atualmente, um dos ramos com mais potencial da Medicina contemporânea, na medida em que retém uma grande parte dos esforços e investimentos que são feitos mundialmente, ao nível da Ciência e da Medicina <sup>48-53</sup>. Desde a investigação fundamental ao desenvolvimento tecnológico, a sua multidisciplinaridade permite-lhe avanços bastantes promissores, capazes de, a médio prazo, proporcionar ao ser humano uma vida mais saudável e duradoura.

Na área do diagnóstico, em concreto, a criação de sistemas e equipamentos *point-of-care (POC)* proporcionam inúmeras vantagens tanto aos profissionais de saúde, como aos pacientes. Fornecem informações fundamentais na tomada de decisões clínicas, de forma quase imediata, sem comprometer a robustez e rigor que é requerida em questões que envolvam a saúde humana <sup>54, 55</sup>.



**Figura 1. 4** – Componentes e etapas envolvidas no desenvolvimento de um sistema equipamento POC com recurso à nanotecnologia.

Nesta dissertação, a nanotecnologia servirá de elo de ligação no desenvolvimento de um **biossensor de DNA** para a **deteção do SNP C/T -13910 (rs4988235)**, o principal polimorfismo responsável pela IL. Esta abordagem surge no sentido de evitar o recurso a tecnologias de sequenciação, usufruindo apenas das características e propriedades de **nanopartículas de ouro (AuNP)**, tendo em vista, a criação de um equipamento POC de fácil manuseamento, barato e portátil, que seja capaz de, numa questão de minutos, responder à questão: “sou intolerante à lactose?”

### 1.2.1 Nanopartículas metálicas

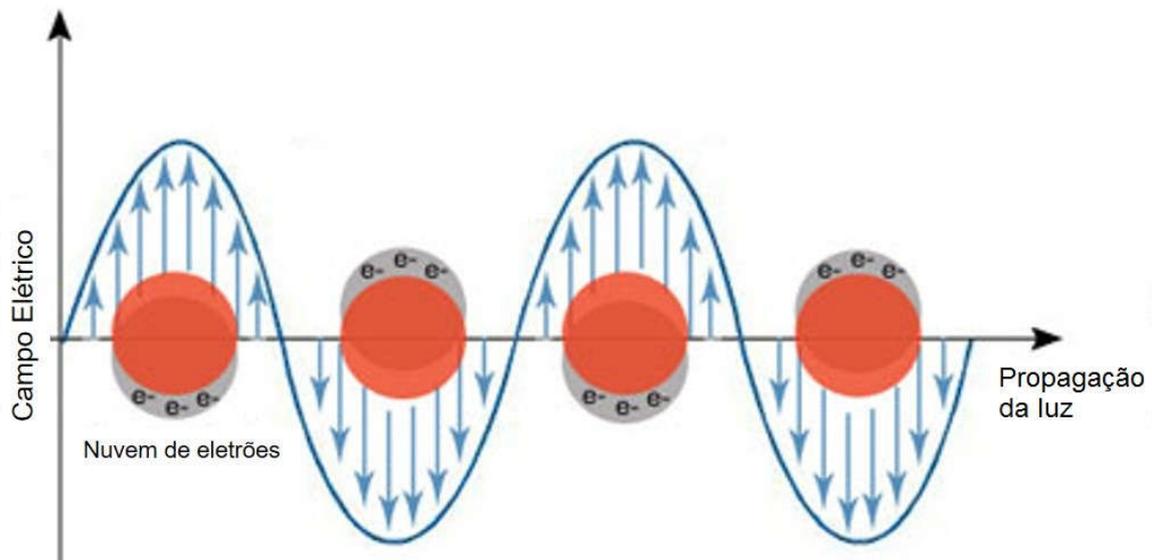
As nanopartículas metálicas (NPM) caracterizam-se por apresentarem dimensões que variam entre os 1 e 100 nm e por manifestarem propriedades totalmente distintas dos materiais que lhe deram origem à escala macroscópica, devido essencialmente a efeitos de superfície (relação volume/área superficial) e de confinamento quântico <sup>56, 57</sup>. Estes fatores afetam simultaneamente a reatividade química e as propriedades óticas, químicas e elétricas dos materiais <sup>58</sup>. As propriedades óticas em particular, fazem das NPM excelentes componentes em biossensores (óticos e eletroquímicos), em terapia fotodinâmica e para serem usadas como agentes de contraste em técnicas óticas de imagem <sup>59-62</sup>. Devido às suas excepcionais propriedades, inércia à oxidação e facilidade de síntese e funcionalização das respectivas NMP, os metais mais utilizados são metais nobres, nomeadamente o ouro e a prata.

### 1.2.2 Fenómeno de Ressonância Plasmónica de Superfície Localizada (LSPR)

As propriedades óticas das NP de ouro e prata foram desde muito cedo empregues por artesões nas suas obras, sem que estes tivessem conhecimento do que estariam a usar. O primeiro exemplo da aplicação de NP foi no Império Romano, nomeadamente no famoso cálice de Licurgo, no séc. IV a.C. A beleza desta peça reside no facto de a mesma refletir cor verde, ao passo que a cor transmitida é vermelha (efeito plasmónico). Mais tarde, na idade Média, a integração de NP em vitrais de igrejas, permitiam que estas criassem diversos efeitos de cores, devido à variação de incidência dos raios solares durante o dia, mas também à existência de NP com diferentes morfologias. No entanto, o primeiro estudo data do séc. XIX, quando Faraday realizou a síntese de uma dispersão coloidal de AuNP <sup>63</sup>.

As cores intensas apresentadas pelos coloides de NPM provêm da interação do campo eletromagnético da luz incidente (UV-Vis-IV) com os eletrões livres da banda de valência das NP, como ilustra a **figura 1.5**. Esta interação ocorre quando existe uma oscilação eletrónica em ressonância com a frequência da radiação incidente. Estas oscilações em ressonância são denominadas de plasmões de superfície que podem ser conceptualizados como sendo dipolos elétricos, cuja energia (frequência) depende sobretudo, da morfologia e dimensão da NP.

Este fenómeno designa-se assim por **ressonância plasmónica de superfície localizada – LSPR**, sendo o responsável pelos coeficientes excecionalmente elevados de absorção e dispersão das NPM na região do visível, bem como as propriedades que permitem uma maior sensibilidade em métodos de deteção óticos do que os corantes orgânicos convencionais <sup>64</sup>.



**Figura 1. 5** – Representação esquemática do fenômeno de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada – LSPR, induzido por um campo elétrico externo numa NPM.

Em 1908, o fenômeno LSPR foi formalizado e descrito por Mie <sup>65</sup> através da resolução das equações de Maxwell para explicar a absorção e dispersão da radiação eletromagnética por partículas esféricas (e homogêneas). Mais recentemente, depois de se concluir que a solução analítica de Mie não era passível de ser aplicada a geometrias mais complexas, foi necessário recorrer a outro tipo de métodos numéricos para a resolução da condição de ressonância. Visto que em partículas não esféricas ocorre um desfaseamento dos elétrons de condução e um atraso no campo dipolar, desenvolveram-se dois métodos: o de aproximação de dipolo discreto (*DDA*) e o das diferenças finitas no domínio do tempo (*FDTD*) <sup>66, 67</sup>. Estes métodos geralmente permitem prever matematicamente os espectros de extinção de coloides de NPM esféricas e não esféricas, sendo que o cálculo da frequência de ressonância dos plasmões de superfície se traduz no aparecimento de uma ou mais plasmônicas de ressonância, respetivamente.

Embora as LSPR se apresentem localizadas na região visível-IV do espectro eletromagnético, o seu posicionamento exato (comprimento de onda) está dependente de diversos fatores de índole intrínseca e extrínseca às NP.

### 1.2.3 Fatores que influenciam a LSPR

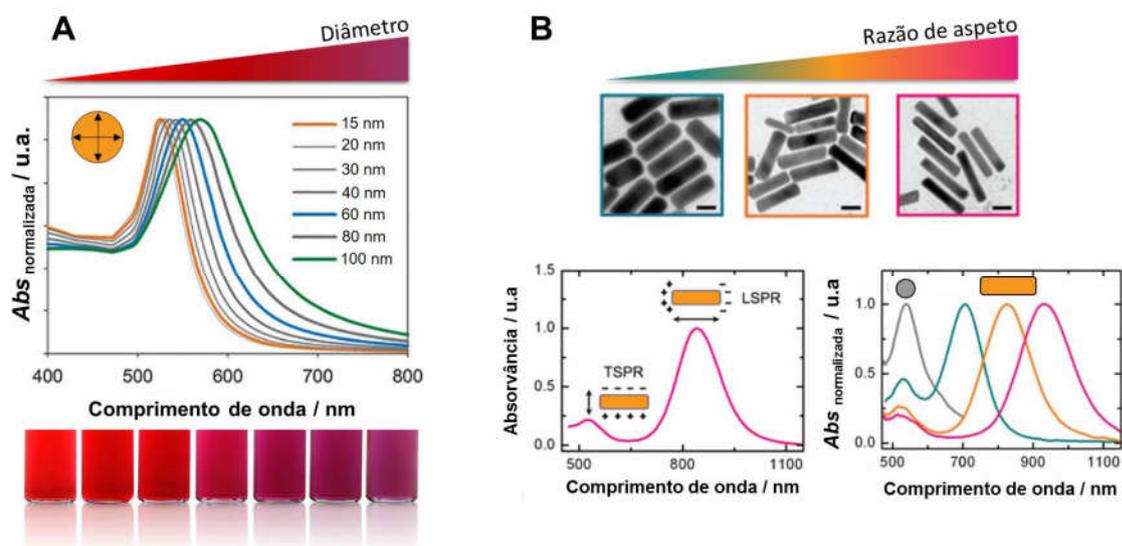
As propriedades óticas das NPM variam significativamente de acordo com a localização e intensidade da LSPR. Os fatores que influenciam estes parâmetros podem ser intrínsecos, dos quais se destacam a **composição, tamanho, forma** e cristalinidade das NP, **a distância interpartículas**; ou parâmetros extrínsecos relacionados sobretudo com a **interação das NP com o meio** <sup>68</sup>.

### 1.2.3.1 Composição

A prata, é por excelência, o metal que em termos óticos, apresenta mais vantagens relativamente a todos os restantes metais nobres. A frequência de ressonância plasmónica é tão alta, que resulta no aparecimento de um pico LSPR bastante estreito e intenso. Este aspeto faz das AgNP nanoestruturas extremamente sensíveis a qualquer interferência ao seu redor, e conseqüentemente, ótimos componentes na aplicação em sensores. Antagonicamente, a sua maior desvantagem como transdutores óticos p. ex., é precisamente a elevada reatividade que manifesta perante condições atmosféricas (oxigénio, luz e água), levando por vezes à alteração da morfologia original da NP e, subseqüentemente, à perda da sua sensibilidade. Esta é uma das razões porque se opta pelo uso de AuNP, já que o ouro é um metal quimicamente mais estável.

### 1.2.3.2 Tamanho e morfologia

Uma NP esférica que apresente elevada simetria, isto é, cuja razão de aspeto seja igual a 1, possui apenas uma ressonância plasmónica dipolar, independentemente do seu tamanho. Contudo, já as diferenças que se fazem notar em termos óticos, prendem-se com o diâmetro das mesmas (**figura 1.6A**). Quanto maior este for, mais luz a NP dispersa, o mesmo é dizer que a frequência de ressonância plasmónica é mais baixa. Para além disso, o alargamento do pico LSPR, tanto pode estar relacionado com polidispersão de tamanhos, no caso de se tratar de um coloide; ou da cristalinidade da própria NP, se for o caso da avaliação das propriedades óticas de uma só NP isolada.

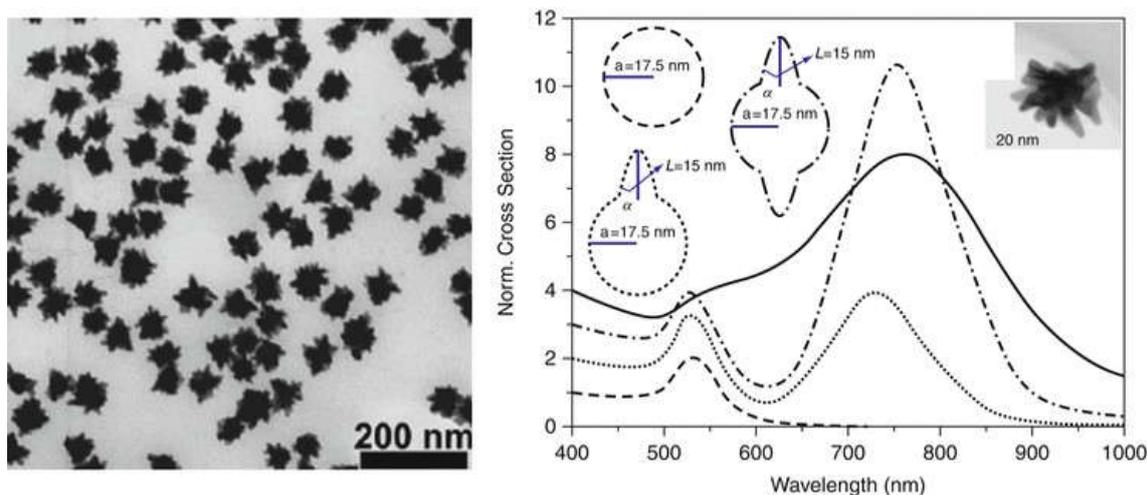


**Figura 1. 6** - Dependência da LSPR em função do tamanho de NP esféricas (**A**) e da morfologia em NP não esféricas (exemplo: *nanorods*) (**B**). Como a razão de aspeto em **A** é constante e igual a 1, o espetro das NP esféricas apresenta apenas uma banda de ressonância plasmónica; como em **B** é variável, uma vez que os *nanorods* são um tipo de NP não esféricas bidimensionais (largura x altura), o espetro de um *nanorod* apresenta duas plasmónicas de ressonância, a transversal (TSPR) e a longitudinal (LSPR).

Em oposição, as NP não esféricas (p. ex. *nanorods*<sup>69</sup>, nanotriângulos<sup>70-72</sup>) mostram mais do que um modo de ressonância plasmónica, mais precisamente, dois modos dipolares; um na direção transversal (eixo curto), outro na direção longitudinal (eixo longo), dando origem a dois picos de ressonância plasmónica distintos, em diferentes posições do espectro e com diferentes intensidades (ver **figura 1.6B**).

O comprimento de onda do máximo da LSPR relativa ao modo longitudinal em NP bidimensionais depende essencialmente da razão dimensional (largura x altura), ao passo que a LSPR transversal (ou TSPR, **figura 1.6B**) se situa geralmente em valores de máximo de comprimento de onda de ressonância compreendidos entre 515-525 nm. Outro aspeto relevante aplica-se a NP planares do tipo triangular, cuja definição e ângulo dos seus vértices também fazem variar a posição do comprimento de onda do máximo da sua LSPR longitudinal. Assim, nanotriângulos com os vértices truncados apresentam maior frequência de ressonância plasmónica (localizados a comprimentos de onda menores). O facto de a banda de LSPR longitudinal ser tão sensível a pequenas alterações do ambiente que rodeia as NP, faz com que estas sejam ótimas para utilização em biossensores.

Por outro lado, quando a geometria das NP se torna mais assimétrica, originam-se múltiplos modos dipolares degenerados, resultando em espectros mais complexos<sup>73</sup>. Esta “complexidade” deve-se na grande maioria das vezes, à sobreposição de picos LSPR, seguida do aparecimento de bandas; bandas essas que correspondem aos picos de ressonância plasmónica de todos os modos de ressonância que estão a absorver em diferentes comprimentos de onda, como está patente no espectro de UV-Vis da **figura 1.7**.



**Figura 1. 7** – Modos dipolares degenerados em NP de ouro em forma de estrela (imagem de TEM e respetivo espectro UV-Vis). Contribuição do núcleo (linha a tracejado), pontas simétricas (linha a ponto-traço) e assimétricas (linha pontilhada) resultando numa banda alargada, devido à sobreposição dos diferentes modos de ressonância plasmónica (linha contínua).

Com base no que foi dito anteriormente, as NP de ouro em forma de estrela (AuNS), constituem um excelente exemplo da existência de múltiplos modos de ressonância plasmônica degenerados. Os seus espectros de UV/Vis apresentam, regra geral, mais do que uma ressonância plasmônica (preferencialmente duas). No entanto, quando estas NP apresentam um número variável de pontas (alteração da simetria), ou estas últimas têm tamanhos distintos, é provável que todas as ressonâncias plasmônicas correspondentes, com diferentes intensidades, se sobreponham e formem uma banda extremamente alargada <sup>74</sup>.

A possibilidade de controlar os parâmetros intrínsecos das NP (neste caso o número de pontas) através da manipulação das condições experimentais durante os processos de síntese <sup>75-77</sup>, representa uma grande vantagem para este tipo de nanomateriais, já que as propriedades óticas variam bastante, bem como a sua sensibilidade na deteção de biomoléculas (biossensores).

### **1.2.3.3 Distância interpartículas/agregação de NP**

Se por um lado, a LSPR é dependente das características intrínsecas das NP, a proximidade entre elas e o fenómeno de agregação, também são fatores que a fazem variar. O fenómeno de agregação representa a situação extrema de proximidade entre NP, caracterizando-se pela anulação total ou quase total das repulsões eletrostáticas. Tanto em situações de grande proximidade entre as NP como da sua agregação, a excitação dos plasmões resultantes de interações eletromagnéticas entre NP adjacentes (interações de *Coulomb*), faz com que se gerem campos elétricos muito fortes, com frequências elevadas, que conduzem à sobreposição e intensificação das diferentes plasmônicas de ressonância. Aos locais de sobreposição plasmônica dá-se o nome de “*hotspots*”, sendo este um dos aspetos mais atrativos e explorados em biossensores colorimétricos e aplicações plasmônicas de campo reforçado, como por exemplo na espectroscopia de *Raman* aumentada pela superfície (*SERS*) <sup>78-80</sup>.

### **1.2.3.4 Índice de refração do meio**

Existem parâmetros extrínsecos às NP que também afetam as propriedades óticas, sendo que estes estão relacionados sobretudo com a interação das NP com o meio envolvente, através de mudanças ao nível do índice de refração (RI) das mesmas <sup>81, 82</sup>.

Dado que o RI varia com a temperatura, a densidade e a pressão, qualquer alteração na interface com a NP pode influenciar a LSPR, tornando as NP ferramentas altamente sensíveis na aplicação em biossensores <sup>83</sup>. As mudanças de RI podem ser provocadas pela interação ou ligação com moléculas químicas (sais, gases) ou biomoléculas (proteínas, DNA), resultando em variações mensuráveis da posição do comprimento de onda do máximo da LSPR <sup>82, 84, 85</sup>.

O comprimento de onda do máximo da LSPR sofre deslocamentos para o vermelho quando o RI aumenta, induzindo uma diminuição da velocidade da luz no meio, diminuindo assim a sua energia. Relativamente à intensidade da banda de LSPR, o confinamento da luz na região onde se situam os

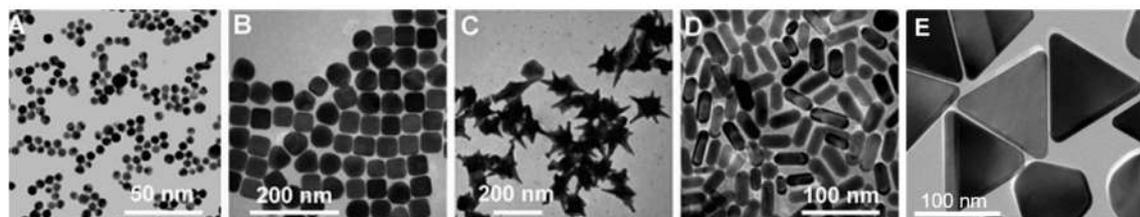
plasmões em ressonância, pode promover o aumento da dispersão quando as NP têm moléculas adsorvidas à sua superfície.

#### 1.2.4 Nanopartículas de ouro

Genericamente, quando o termo “coloide de ouro” é usado, parte-se do princípio que se esteja a fazer referência a nanopartículas de ouro esféricas em suspensão. A cor vermelha característica resulta da existência de uma banda LSPR de extinção, centrada a cerca de 520 nm. Esta banda é pouco dependente do tamanho da partícula e do RI do meio que a rodeia, mas muda drasticamente com a forma<sup>56, 57</sup> e distância interpartículas<sup>86, 87</sup>. Neste último caso em particular, quando as AuNP estão demasiado próximas, ocorre a agregação de AuNP, conduzindo a uma transição de cor pronunciada de vermelho para azul devido ao acoplamento entre as plasmónicas, resultando numa banda extremamente alargada, com máximo a rondar os 600 nm. A introdução destas AuNP é bastante vantajosa para o desenvolvimento de biossensores em solução, já que são muito fáceis de preparar, a sua superfície é facilmente funcionalizável com ligandos interessantes do ponto de vista biológico e são biocompatíveis.

Embora a forma esférica seja a mais estável termodinamicamente, existem outros tipo de coloides de ouro, nomeadamente de outras formas, que não a esférica. De entre as diversas nanoestruturas não esféricas relatadas na literatura, destacam-se os nanocubos, NP em forma de estrela, *nanorods* e nanotriângulos de ouro (ver **figura 1.8**).

Em conjunto com o elevado grau de biocompatibilidade do ouro, estas nanoestruturas apresentam um enorme potencial, sobretudo ao nível da sua utilização enquanto marcadores óticos para eventos de deteção, já que existem inúmeros estudos que comprovam que comparativamente às NP esféricas, estas apresentam uma maior sensibilidade, dado que se geram campos elétricos fortes nas suas extremidades.



**Figura 1. 8** – Imagens TEM representativas de diversas nanoestruturas de ouro: esferas (A); cubos (B); estrelas (C), *rods* (D) e triângulos (E).

#### 1.2.5 Síntese de nanopartículas de ouro

A síntese de NPM apresenta uma enorme variedade de metodologias conforme o fim pretendido, podendo recorrer-se a técnicas de ablação por laser e deposição por laser ou a métodos químicos. Em particular, a síntese de AuNP por métodos químicos tem vindo a ser aplicada de forma a

obter uma grande variedade de AuNP de diferentes tamanhos e morfologias, sendo de grande interesse uma maior compreensão do processo de formação de NP para um maior controlo da síntese.

A preparação de AuNP por métodos químicos em solução encontra-se amplamente referenciada na literatura <sup>59, 60, 77, 88-91</sup>. Geralmente envolvem o uso de um sal do respetivo metal em solução e a adição de um agente redutor (p. ex. citrato de sódio, boro-hidreto de sódio) <sup>88, 92-94</sup>. A presença de uma espécie que adsorve à superfície das AuNP ou agente de revestimento (pode ser o próprio redutor <sup>88, 93</sup>, tensioativos <sup>90, 91, 95</sup>, tióis <sup>96, 97</sup> ou polímeros <sup>98, 99</sup>) em solução, permite estabilizar e funcionalizar as NP formadas, exercendo um papel importante no controlo da agregação, do tamanho, forma e da orientação cristalográfica superficial das NP <sup>99</sup>.

Atualmente, de entre os inúmeros métodos disponíveis, continua a recorrer-se sobretudo a métodos de redução direta, redução fotoquímica e a métodos de crescimento a partir de *seeds* de pequenas dimensões, sendo que estes envolvem geralmente mais do que um passo reacional.

#### **1.2.5.1 Métodos de redução direta**

Um dos métodos de redução direta mais utilizados de sempre, habitualmente designado por “método do citrato” foi inicialmente descrito por Turkevich <sup>100</sup>, tendo sido desenvolvido e otimizado mais tarde por outros investigadores <sup>88, 93, 101, 102</sup>. Este método caracteriza-se pela redução do sal de ouro em solução acídica (geralmente, o ácido tetracloroáurico) a temperatura elevada, por ação do citrato de sódio. Desta redução resulta a formação de AuNP com tamanhos a variar entre os 13 e os 150 nm de diâmetro <sup>88, 103</sup>. Um método semelhante usa o agente redutor boro-hidreto de sódio que permite obter à temperatura ambiente, em metanol ou em solução aquosa, AuNP mais pequenas com cerca de 2-5 nm de diâmetro <sup>104, 105</sup>.

Não só AuNP esféricas são formadas por intermédio de métodos de redução direta, também podendo ser sintetizadas NP não esféricas. Lin *et al.*, descreveu um método extremamente simples de preparar e controlar a forma de diversas NP com tamanhos a rondar os 150-200 nm <sup>99</sup>. O processo de formação destas NP decorre através redução do sal de ouro em solução de dimetilformamida (DMF) e na presença de polivinilpirrolidona (PVP), sendo que por variação das condições de temperatura e pH se podem sintetizar diferentes NP com forma de dodecaedros, tetraedros truncados, cubos, octaedros e NP planares do tipo hexagonal.

#### **1.2.5.2 Métodos de redução fotoquímica/fotocatalítica**

Foram descritos vários métodos fotoquímicos para síntese de AuNP, quer por fotorredução direta do precursor metálico <sup>106, 107</sup>, quer pelo recurso a fotossensibilizadores, como espécies intermediárias, que usam a luz para ativar a transferência eletrónica para redução do metal em solução <sup>90, 91, 108</sup>. Este último método combina as vantagens de um método fotoquímico com os benefícios de uma reação catalisada, da qual advém a possibilidade de controlar as características morfológicas das NP através do uso de redutores fracos e de catalisadores.

Miranda *et. al.*, reportaram um método tem a particularidade de as etapas de nucleação e crescimento / formação da NP ocorrerem concomitantemente no mesmo recipiente, a temperatura ambiente e a pH 7. Em solução de trietanolamina (TEA) a pH neutro, na presença de brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), dá-se a redução do sal de ouro controlada fotocataliticamente por uma metaloporfirina de estanho (IV), obtendo-se NP planares em forma de triângulo com um comprimento de aresta médio compreendido entre os 50 e os 250 nm. Este método de fácil implementação proporciona rendimentos acima dos 80% e um controlo bastante rigoroso do tamanho das NP por variação da concentração da espécie fotossensível, a SNP(IV) <sup>90</sup>.

### **1.2.5.3 Métodos de crescimento mediado por seeds**

O crescimento de NP a partir de *seeds* de pequenas dimensões permite, através do controlo das condições de síntese, preparar suspensões coloidais de AuNP com tamanho, forma e estrutura cristalográfica superficial específicas <sup>109, 110</sup>.

A forma e a estrutura cristalográfica superficial das AuNP resultam de um balanço entre a tendência para a formação de facetas cristalográficas, graças às diferentes afinidades e formas de interação das espécies em solução (estabilizadores, tensoativos <sup>111</sup>) com a estrutura cristalina do metal em questão, bem como da cinética de crescimento (velocidade de redução e posterior deposição de átomos de ouro) <sup>59, 95, 112-117</sup>.

Contudo, é importante considerar que as condições necessárias para a nucleação são exatamente o oposto ao que é exigido para o crescimento seletivo das facetas. *Seeds* de ouro de pequenas dimensões são formadas sob condições de elevada sobressaturação química, o que leva a uma velocidade de nucleação (redução) mais rápida, formando invariavelmente núcleos esféricos com energias superficiais baixas e tamanhos compreendidos entre 3 e 5 nm. Como consequência, o controlo da forma é alcançado através de um processo de duas etapas designado por "crescimento mediado por *seeds*", sendo que a fase de crescimento é consideravelmente mais lenta e sob condições de redução mais fracas, do que a etapa de nucleação <sup>118</sup>. Por sua vez, foi Xia *et al.* um dos pioneiros na utilização de *seeds* na formação de estruturas com diversas geometrias.

Os agentes de revestimento têm um papel preponderante, sobretudo neste tipo de abordagem, já que são eles que ditam a morfologia da NP. Para além de fornecerem estabilidade coloidal, estes agentes facilitam o crescimento preferencial de facetas específicas para que estes adquiram forma cristalina. Os que são habitualmente empregues são os tensoativos do tipo CTAX (X= Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> ou I<sup>-</sup>) <sup>111, 119, 120</sup> e o polímero PVP estando estes envolvidos em inúmeras sínteses de NP com morfologias diferentes, incluindo *rods*, cubos, estrelas e triângulos, embora outros sejam igualmente usados <sup>121</sup>.

Determinadas espécies presentes em solução podem interferir com os reagentes, podendo alterar a afinidade destes relativamente à estrutura cristalina do ouro. Tal alteração pode ser através do bloqueio de determinadas facetas durante o processo de crescimento, e conseqüentemente a formação de NP com outras morfologias. Por exemplo, no mesmo processo de síntese (fotocatalítico) descrito anteriormente, a presença de iões cloreto na solução de síntese faz aumentar a afinidade do

CTAB para a faceta [111] da *seed* cristalina, resultando na formação de NP em forma de triângulo; por outro lado, na presença de iões brometo, estes ligam-se preferencialmente à faceta [100], formando desta forma, nanocubos de ouro<sup>91, 122</sup>.

No entanto, uma das maiores desvantagens associadas ao uso de tensioativos do tipo CTAX, como um agente de revestimento é de que este se liga fortemente às NP, tornando-se particularmente difícil quimicamente substituir o CTAX com outras moléculas mais biocompatíveis e biofuncionais. Além disso, CTAX é conhecido por ser um revestimento altamente citotóxico. Várias estratégias têm, no entanto, foram examinados a fim de trocar o CTAX com diferentes ligandos para aumentar a biocompatibilidade e reduzir a citotoxicidade.

### 1.2.6 Funcionalização de nanopartículas de ouro

No âmbito da conversão das NPM em materiais híbridos, a sua superfície requer modificações através do uso de material orgânico que lhe proporcione a funcionalidade pretendida. A superfície das AuNP é particularmente fácil de alterar, sobretudo quando estas estão estabilizadas por agentes de revestimento lábeis (p. ex. citrato), podendo ser substituídos por moléculas com funcionalidades que aumentem a compatibilidade biológica, sem que a sua estabilidade coloidal fique comprometida.

A funcionalização de AuNP implica a troca efetiva do agente de revestimento por uma nova molécula, cuja ligação tende a ser mais forte. Para o efeito pode recorrer-se a diversos tipos de moléculas ou biomoléculas, desde que estas possam ser modificadas através da inserção de grupos funcionais. Nestes grupos funcionais, o enxofre dos tióis e sulfonatos, o azoto das aminas e o fósforo dos fosfatos são preferencialmente os responsáveis pela ligação. O método mais comum para a funcionalização de AuNP é, indiscutivelmente, o que recorre à química do tiol, sendo que na grande maioria das vezes conduz à formação de uma monocamada auto-montada (SAM) na superfície da NP. Este processo decorre geralmente sem necessidade de condições experimentais específicas, caracterizando-se por ser um processo termodinamicamente espontâneo. Ainda assim, independentemente do carácter do ligando, é um processo que se divide em duas etapas. Numa primeira fase, as biomoléculas carregadas electrostaticamente vão sendo adsorvidas à superfície da NP, acabando por formar ligação S-Au, até que num segundo passo, as biomoléculas auto-organizam-se, acabando por formar a SAM.

Por exemplo, para reforçar a estabilidade de AuNP esféricas revestidas com iões citrato, é comum substituir-se o revestimento com moléculas de ácido 11- mercaptoundecanóico (11-MUA). O 11-MUA apresenta uma afinidade para com o ouro bastante mais elevada por causa de grupo tiol (R-SH) presente na sua estrutura, que se liga a superfícies metálicas por quimissorção. No entanto, devido à elevada energia envolvida na ligação (cerca de 200 kJ / mol) é, por vezes, designada de ligação covalente do tipo dativa<sup>123</sup>.

Em determinados casos, esta abordagem de substituição de agentes de revestimento não é inteiramente possível; existem moléculas tensioativas e poliméricas, como o CTAB e o PVP, que formam camadas bastante densas à volta das NP e cujas interações são consideradas fortes, tornando-

se extremamente difícil a sua remoção. Assim, em vez da troca, procede-se à conjugação das novas moléculas às NP. Em suma, as biomoléculas podem ser conjugadas com NP através de adsorção física (fisissorção), através de interações eletrostáticas ou por quimissorção, cujas ligações apresentam natureza covalentes ou covalente-dativas, sendo estas bastante mais fortes do que as presentes nos fenómenos de fisissorção<sup>124, 125</sup>. A **tabela 1.3** inclui as principais estratégias para o bioconjugação de NP plasmónicas.

**Tabela 1.3** – Estratégias de bioconjugação usadas em NP plasmónicas.

Tipo de interação	Origem da interação	Exemplos	Referências
<b>Interação eletrostática</b>	carga, processos <i>layer by layer</i>	DNA, proteínas, enzimas, anticorpos, biopolímeros polieletrólitos	126-129
<b>Interação covalente (dativa)</b>	tióis (primários e ditiol) tiol seguidas de reações <i>click chemistry</i> ou NHS/EDC	DNA (oligonucleótidos modificados), péptidos e proteínas	130-135
	tióis alquilo com grupos hidroxilo (SAM)		
	aminas	DNA, péptidos, proteínas e anticorpos	136, 137
<b>Interações van der Waals</b>	triptofano	proteínas e “coroas de proteínas”	138-140

A bioconjugação pode ser efetuada diretamente na superfície da NP ou por recurso a um agente de reticulação bifuncional. Em biossensores, o grande desafio associado à alteração da superfície metálica das NP, é controlar a quantidade de material que fica efetivamente ligado à mesma, bem como a orientação que as biomoléculas adquirem, de modo a que seja possível alcançar uma química de superfície acessível, com alta especificidade para a ligação de analitos<sup>141-143</sup>.

As estratégias e tipos de interações envolvidas na bioconjugação de AuNP dependem do objetivo-alvo de deteção. Na **tabela 1.4** são referidos os principais tipos de interações presentes em sistemas de deteção, nomeadamente entre o transdutor bioconjugado com o elemento de reconhecimento e o alvo. Estas interações baseiam-se, sobretudo no princípio “chave-fechadura” entre a biomolécula conjugada e a respetiva biomolécula complementar, interações essas que, apresentam um carácter altamente específico.

**Tabela 1. 4** – Principais tipos de interação entre AuNP conjugadas com biomoléculas e as moléculas alvo, aplicadas em sensores.

<b>Elemento de reconhecimento</b>	<b>Interação</b>	<b>Analito (alvo)</b>	<b>Referências</b>
<b>DNA/RNA</b>			87, 144, 145
<b>Ácidos nucleicos - péptidos</b>	Hibridação	DNA/RNA	146
<b>Aptâmeros</b>	Ligando-recetor	Proteínas, aminoácidos, açucares, pesticidas	147
<b>Anticorpos</b>	Antigénio-anticorpo	Antigénios, células, microrganismos, proteínas	148, 149
<b>Estreptavidina</b>	Biotina-estreptavidina	DNA modificado com biotina	136

Relativamente às restantes biomoléculas mencionadas na tabela a utilização de oligonucleótidos, enquanto elemento de reconhecimento, destacam-se pela sua versatilidade, uma vez que ao serem sintetizados em laboratório, não só é possível definir a sequência de acordo com o alvo, como o número de nucleótidos e ainda modificar estruturalmente os oligonucleótidos. Assim, para ativar a ligação específica à superfície das NP, é necessária a modificação de uma das suas extremidades, através da inserção de um grupo tiol ou dissulfeto.

Geralmente os oligonucleótidos tiolados, à semelhança do que acontece com os alcanotióis em filmes de ouro, revelem uma elevada tendência para a formação de camadas SAM à temperatura ambiente. Em contrapartida, em superfícies curvas, como é o caso das AuNP esféricas, ocorre uma maior desorganização, isto é, o empacotamento não é tão denso devido ao facto de haver menos pontos de interação entre os ligandos. Como tal, na funcionalização de AuNP com oligonucleótidos é algo comum usarem-se moléculas (sais, tensoativos, alcanotióis, etc.) que ajudem a criar camadas mais ou menos densas, ao mesmo tempo que, promovem um empacotamento mais rápido e eficiente, fazendo com que as suas sequências se tornem mais acessíveis em eventos de hibridação<sup>150-152</sup>. Depois de formados os bioconjugados do tipo AuNP-DNA, estes passam a designar-se por “nanossondas”.

Para além da quantidade (número) de oligonucleótidos que são adicionados, o comprimento e sequência dos mesmos são fatores que podem influenciar a estabilidade da nanossonda. Para uma funcionalização eficiente, deve assegurar-se que toda a superfície é devidamente preenchida, ou seja, definir a quantidade de moléculas de DNA mínima (razão [oligonucleótido]/[AuNP]) para que sejam garantidas repulsões eletrostáticas capazes de prevenir a agregação das AuNP, já que estes

bioconjugados revelam instabilidade coloidal a altas temperaturas e na presença de soluções de força iônica elevada.

O método mais utilizado para a preparação de nanossondas estáveis em solução é conhecido como "*salt aging*"<sup>153</sup>. O nome deriva do facto de, depois de após ocorrer a troca do agente de revestimento original pelo oligonucleótido, se efetuarem várias adições consecutivas de sal (p. ex. NaCl), resultando num aumento gradual da sua concentração até cerca de 0,5 M. Este aspeto irá assegurar a adsorção e a organização ordenada dos oligonucleótidos à superfície da AuNP, maximizando a sua densidade em torno de cada partícula. Embora este método exigisse um longo período de tempo até se alcançar um eficiente empacotamento dos oligonucleótidos, este pode ser encurtado através da utilização de ultrassons e/ou da adição de tensoativos (p. ex., SDS ou Tween-20), que impedem que as moléculas de DNA se liguem inespecificamente à AuNP e/ou levando à agregação destas<sup>152</sup>. Para além destes, já se encontram na literatura diversos outros métodos de funcionalização de AuNP com oligonucleótidos, sem requererem do uso de sais; com tempos de preparação da nanossonda e empacotamentos quase imediatos<sup>154</sup>, só que na grande maioria das vezes, a sua estabilidade coloidal é posta em causa.

A adsorção dos oligonucleótidos tiolados em AuNP que possuam faces planas, como é o caso dos AuNT, demonstra uma tendência semelhante ao que se sucede em superfícies de ouro. A formação destas nanossondas envolve um tipo de empacotamento característico de SAM, ou seja, altamente organizado e denso, que leva a que os oligonucleótidos estejam tão próximos uns dos outros, tornando-se necessário garantir que as suas sequências se mantêm acessíveis para que possam hibridar com alvos complementares. A excessiva densidade pode causar impedimento estérico e repulsão eletrostática entre eles, interferindo na reação de hibridação. Este aspeto não é tão relevante nas AuNP esféricas porque a própria curvatura impede esse tipo de interação. Uma das formas de contornar esta situação, é introduzindo um "espaçador" não complementar entre a AuNP e o oligonucleótido, p. ex. uma sequência de 10 adeninas (espaçador poli-A). Outra solução passa pela adição de alcanotóis de cadeia curta, intercalados com os oligonucleótidos, formando uma espécie de "SAM mista"<sup>150</sup>.

### 1.3 Biossensores

De um modo geral, um biossensor (**figura 1.9**) é definido como um dispositivo analítico integrado com dois tipos de componentes, nomeadamente uma sonda contendo o elemento de reconhecimento biológico e um transdutor de sinal, onde este último converte a ação (reação ou interação) do material de reconhecimento com o analito, em dados passíveis de serem processados e analisados.



**Figura 1.9** – Configuração de um biossensor com os respetivos elementos funcionais.

Se for necessária a quantificação, o sinal de saída do transdutor deve ser correlacionado com a concentração do analito de interesse, onde o intervalo de concentração depende da gama dinâmica do sistema de deteção <sup>155</sup>. Muitos sistemas de deteção também fornecem informações sobre a afinidade de ligação e cinética para a interação <sup>156</sup>.

A seletividade e a sensibilidade do biossensor são aspetos determinados pelo componente de reconhecimento e o transdutor, respetivamente. O reconhecimento de material biológico pode ser efetuado biocataliticamente, através do uso de enzimas, microrganismos ou tecidos; ou em termos de afinidade, como acontece com anticorpos e ácidos nucleicos/DNA <sup>157</sup>.

Os biossensores podem ser divididos em diferentes classes dependendo do tipo de evento bioanalítico, do mecanismo de transdução ou da área de aplicação. No entanto, habitualmente são divididos em dois grupos, sendo que a condição que os distingue, é o facto de requererem ou não o uso de marcadores <sup>158, 159</sup>.

Embora os métodos de deteção que recorrem à marcação (sondas ou moléculas alvo) sejam, frequentemente, mais sensíveis, a sua preparação é bastante dispendiosa e possuem a desvantagem de, ao efetuar-se marcação molecular com, p. ex. um marcador fluorescente, quimioluminescente, enzimático ou sonda radioativa, estes podem afetar a funcionalidade/ atividade da molécula e induzir a agregação. Por outro lado, os biossensores não marcados, caracterizam-se por serem mais versáteis e permitirem uma análise direta, quantitativa e em tempo real de eventos de ligação biomolecular <sup>158</sup>.

<sup>160</sup>.

### 1.3.1 Biossensores de DNA

O DNA é especialmente adequado para aplicação em biossensores devido ao seu grande potencial de reconhecimento molecular. Ao contrário das enzimas e anticorpos, as moléculas de DNA formam ligações muito facilmente, ligações de hidrogênio que são extremamente estáveis e reversíveis quando se procede à desnaturação da cadeia dupla (dsDNA), sendo que a maioria dos métodos convencionais para a detecção de sequências específicas de DNA baseia-se no fenómeno de hibridação. Assim, em biossensores de DNA, o reconhecimento molecular é efetuado através da hibridação de uma sequência previamente conhecida de ssDNA, designada por sonda, com a sua sequência complementar – DNA alvo. A formação da dupla hélice é passível de ser detetada através de um indicador de hibridação.

Geralmente a sonda é acoplada a um transdutor ótico que, em tempo real, reage de acordo com o resultado da reação de hibridação. As alterações registadas podem ser convertidas em sinais de fluorescência ou quimioluminescência, se o transdutor for respetivamente marcado com um corante fluorescente (*quantum-dots*) ou com luminol e luciferina ou podem simplesmente ser expressas através da absorvância ou da de ressonância plasmónica de superfície (LSPR), no caso de se usarem superfícies metálicas ou NPM <sup>161</sup>. De entre os transdutores que não recorrem a marcação molecular, as NPM são as mais promissoras; apresentam características que as tornam altamente eficazes não só ao nível da detecção ótica, como eletroquímica ou térmica aplicada à detecção de ácidos nucleicos <sup>144, 162, 163</sup>.

As AuNP, nomeadamente, podem ser usadas como parte integrante dos biossensores ou podem não estar diretamente integradas nestes, sendo neste último caso introduzidas no sistema apenas no momento do reconhecimento, enquanto na abordagem integrada, as AuNP estão presentes ao longo da análise e podem atuar como transdutores de sinal e/ou suporte.

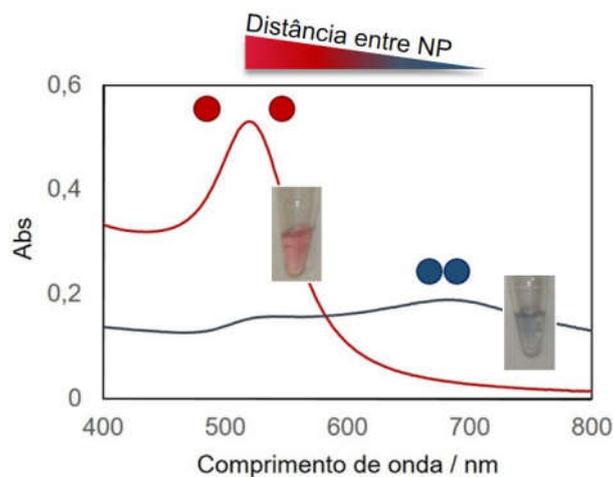
Enquanto transdutores de sinal ótico, as AuNP oferecem uma vasta gama de parâmetros que facilitam a interpretação do sinal, sendo que este pode ser avaliado através da amplitude, frequência (comprimento de onda), modo de polarização ou intensidade da radiação visível. As AuNP têm a particularidade de elas próprias, apresentarem uma “marcação intrínseca”; as suas propriedades óticas e cores intensas são usadas como fatores indicadores de biorreconhecimento, que, por conseguinte, podem ser implementadas em vários sistemas de detecção de hibridação. Para além disso, existe a possibilidade de, por recurso a métodos de amplificação, nomeadamente *PCR*, *RT-PCR* (reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase) ou *PCR* em tempo real, se aumentar a intensidade do sinal na presença de AuNP.

De entre os métodos de detecção ótica que permitem a identificação específica da formação da dupla hélice (hibridação), os mais comuns são os colorimétricos e os que se baseiam na alteração das propriedades dielétricas do ambiente químico que envolve a AuNP, isto é, do RI.

### 1.3.1.1 Detecção colorimétrica através da agregação coloidal

A detecção colorimétrica de DNA (integrada nos métodos baseados na absorvância) tem surgido em alternativa à detecção de fluorescência. A “marcação” de sequências de DNA é feita com AuNP, que apresentam maior estabilidade e menor ruído de fundo face aos métodos que recorrem a marcação fluorescente. Para além disso, as abordagens colorimétricas têm sido bastante exploradas devido à sua simplicidade, portabilidade e baixo custo, tornando os métodos de diagnóstico que recorram a este método, altamente promissores para integração em sistemas POC <sup>164, 165</sup>.

O fenómeno de agregação coloidal é o principal foco em ensaios colorimétricos e terá sido usado pela primeira vez, precisamente na detecção da interação entre cadeias de DNA, através da mudança de cor de coloides de ouro <sup>160, 164, 166, 167</sup>. A agregação é induzida pela adição de sais, provocando uma diminuição das repulsões eletrostáticas, o que conduz à destabilização do coloide. Esta destabilização é acompanhada pela alteração da cor da solução coloidal, de vermelho para azul, sendo resulta do acoplamento das plasmónicas das NP, que estão demasiado aproximadas (sob a forma de agregados), como ilustra a **figura 1.10**. A detecção colorimétrica revela elevada sensibilidade, ao ponto de o resultado, poder inclusivamente ser visualizado a “olho nu” <sup>81, 166</sup>.



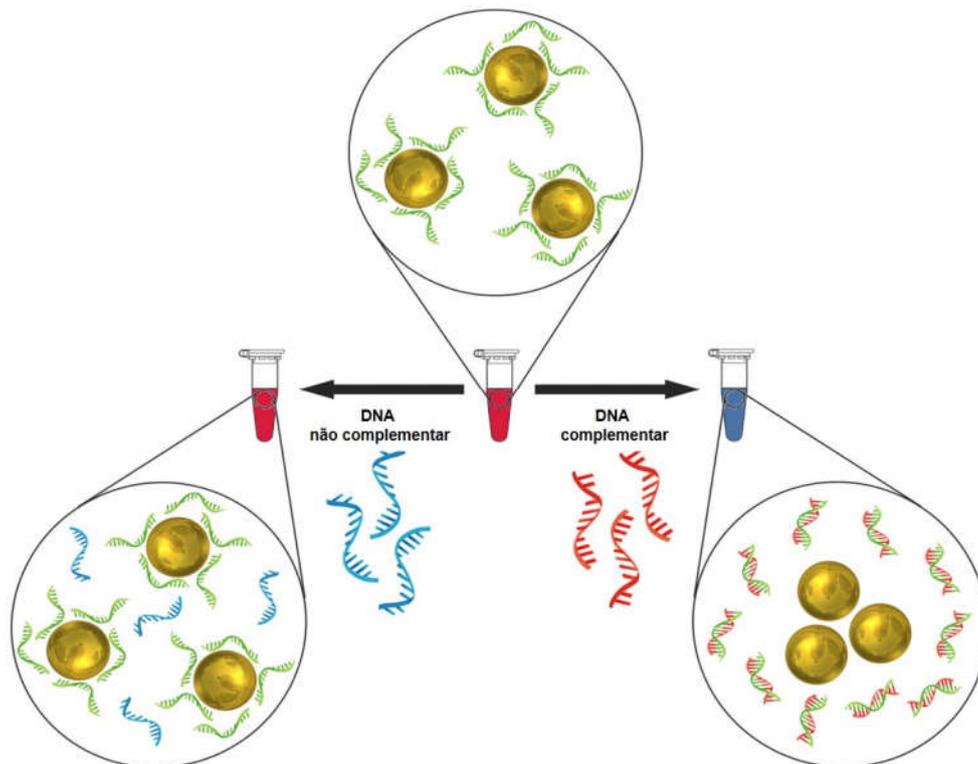
**Figura 1. 10 – Fenómeno de agregação entre AuNP** A distância entre as NP relacionada com a estabilidade coloidal. A alteração de cores de vermelho (coloide estável) para azul (coloide agregado) resulta na alteração da banda plasmónica, de ~525 nm para cerca de ~700 nm, respetivamente.

#### 1.3.1.1.1 Métodos que usam AuNP estabilizadas por adsorção eletrostática

Os oligonucleótidos (não modificados) adsorvem às AuNP através de interações eletrostáticas, que por si só as estabilizam, aumentando a repulsão electrostática entre elas, e consequentemente prevenindo a sua agregação. A detecção de DNA não funcionalizado através do uso de AuNP baseia-se essencialmente na maior afinidade das moléculas ssDNA relativamente às de dsDNA <sup>168-171</sup>, tal como no ensaio esquematizado na **figura 1.11** de exemplo.

Na presença de amostras com dsDNA e ssDNA, a sequência complementar (depois da desnaturação) hibrida com o ssDNA que preferencialmente é adsorvido às AuNP, acabando por anular

as repulsões eletrostáticas e agregando quando, p. ex. a concentração de sal é aumentada. Por outro lado, a sequência não complementar, não interfere com a solução coloidal, sendo que esta permanece estável. A anulação da carga leva as NP a aproximarem-se e a formarem agregados. No entanto, por vezes este processo é passível de ser revertido, transformando de novo a solução num coloide estável; por alteração da força iónica da solução ou aumento da temperatura acima da temperatura de fusão do DNA <sup>170</sup>. Estas mudanças de cor permitem assim distinguir amostras com sequências complementares (cor da solução mantém-se vermelha), de amostras cuja sequência apresenta determinado grau de não complementaridade (cor da solução altera-se para azul).



**Figura 1. 11** – Esquema representativo de um ensaio colorimétrico usando AuNP não funcionalizadas, com base no exemplo do biossensor apresentado na referência <sup>170</sup>.

Através da mesma abordagem, isto é, adição de AuNP não funcionalizadas a uma amostra contendo sequências conhecidas de DNA e amplificadas, por exemplo, por *PCR*, demonstrou-se que é possível a deteção de sequências nucleotídicas não apenas utilizando as AuNP carregadas negativamente com moléculas de citrato convencionais, mas também utilizando AuNP não esféricas revestidas por moléculas catiónicas <sup>172</sup>. A maior vantagem destes métodos é sem dúvida a rapidez no tempo de resposta. No entanto, no que diz respeito às limitações, a otimização da concentração de sal a usar para induzir agregação é difícil de definir, dada a possível existência de artefactos/reagentes excedentários da reação *PCR*, que podem interferir e induzir eles próprios a agregação das AuNP.

#### 1.3.1.1.2 Métodos que usam AuNP funcionalizadas (através do tiol)

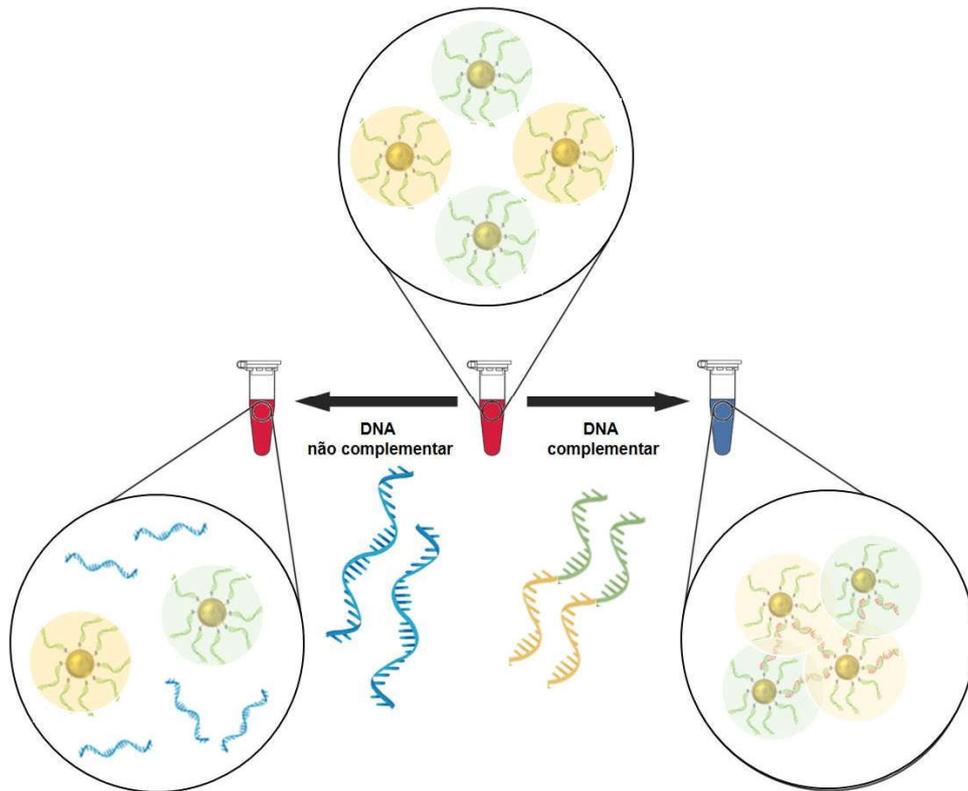
Os métodos que envolvem AuNP funcionalizadas (nanossondas) são decorrentes da reação de troca do agente de revestimento por oligonucleótidos modificados com tióis ( $R-OH$ ), cuja estabilidade é mais elevada devido à formação de uma ligação mais forte entre o DNA e a superfície do ouro <sup>81</sup>.

O que distingue estes métodos de AuNP funcionalizadas dos anteriores é que as AuNP estão funcionalizadas antes da reação de hibridação. No entanto, recorrendo-se a mistura de sondas, modificadas (tiol) e não modificadas é igualmente possível o diagnóstico de doenças patogénicas por deteção direta e colorimétrica <sup>127, 173</sup>.

Todavia, de acordo com o número de nanossondas usadas em ensaios colorimétricos, podem distinguir-se duas abordagens envolvendo o uso de uma ou duas sondas diferentes, designada por ligação não cruzada (“*non-crosslinking*”) e ligação cruzada (“*crosslinking*”), respetivamente.

#### 1.3.1.1.3 Métodos “*Crosslinking*”

A primeira abordagem que recorreu à agregação coloidal de NPM foi originalmente descrita por Mirkin *et al.* como uma técnica que envolvia a formação reversível de aglomerados de AuNP <sup>153, 162, 174, 175</sup>. De acordo com a **figura 1.12**, em cada ensaio usaram-se duas nanossondas, funcionalizadas com oligonucleótidos (ssDNA) tiolados, diferentes e não complementares entre si, porém com sequências contíguas. Uma amostra de dsDNA é adicionada e desnaturada na presença da nanossonda, sendo que o terceiro oligonucleótido, complementar de uma extremidade à outra, a ambas as nanossondas, faz com que estas se aproximassem ao ponto de formarem um agregado (uma espécie de rede polimérica). Esta “rede” é revertida a coloide estável novamente por desnaturação térmica da dupla hélice, graças à transição brusca (58-59 °C) junto da temperatura de fusão. Por fim, quando o resultado da desnaturação da amostra são cadeias não complementares, a hibridação não ocorre, mantendo a nanossonda a sua estabilidade coloidal inalterada <sup>174</sup>.

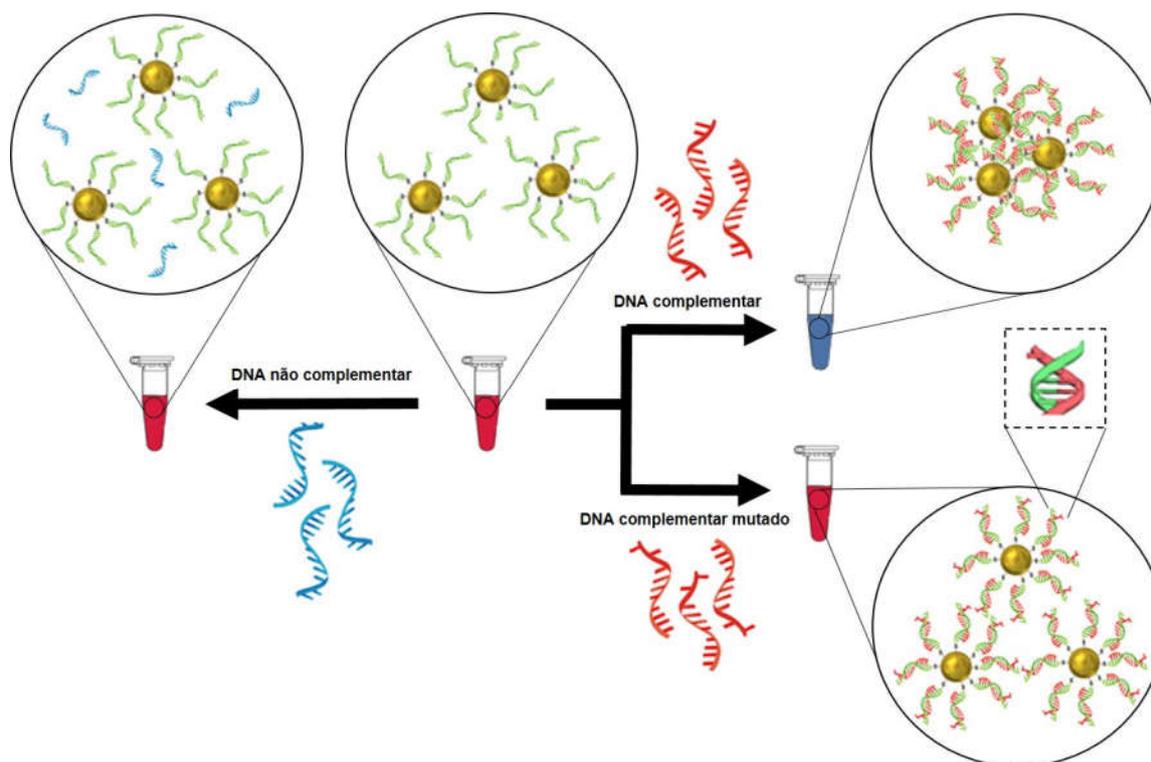


**Figura 1. 12** – Esquema representativo de um ensaio colorimétrico usando AuNP funcionalizadas através do método *crosslinking*, com base no exemplo do biossensor apresentado na referência <sup>174</sup>.

A ausência de interação do DNA alvo não complementar com a nanossonda, faz com que as AuNP permaneçam estáveis, sendo que em contrapartida, na presença de DNA complementar ocorre a hibridação das cadeias, formando-se a dupla hélice; situação que desencadeia a agregação das AuNP, devido à diminuição drástica de repulsões eletrostáticas.

#### 1.3.1.1.4 Métodos “non-crosslinking”

Sato *et al.* introduziu uma nova abordagem, na qual sugeriu que em vez de se recorrer a dois tipos de nanossondas, com apenas uma era possível detectar diferentes alvos sintéticos de DNA, porém do mesmo tamanho das sondas (15 nucleótidos) <sup>176</sup>. O principal objetivo dos autores foi interpretar o fenômeno de agregação diferencial induzido pela adição de um eletrólito, conforme o tipo de amostra de dsDNA alvo que intervém na reação de hibridação. Consideraram três tipos de DNA alvo sintético com sequência complementar, não complementar (em toda a sua extensão) e por fim uma que apresentava uma base azotada não complementar à posição terminal da sonda (3'), como demonstra a **figura 1.13**.



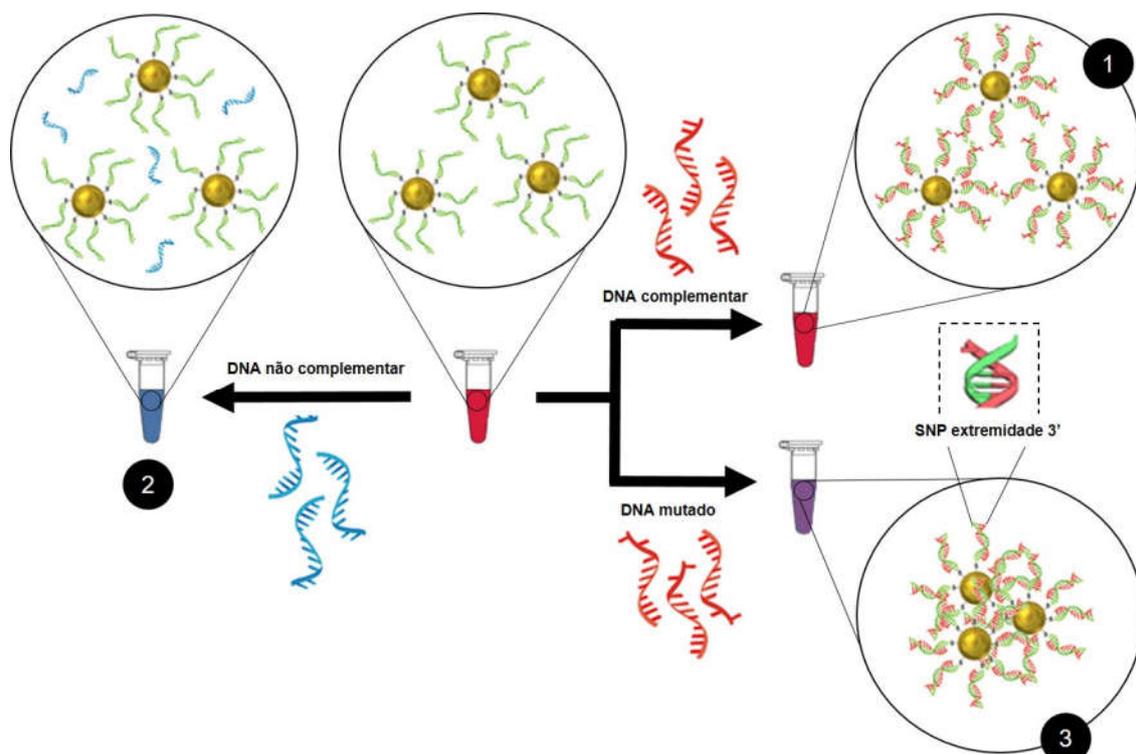
**Figura 1. 13** – Esquema representativo de um ensaio colorimétrico usando AuNP funcionalizadas através do método *non-crosslinking*, com base no exemplo do biossensor apresentado na referência <sup>176</sup>.

Embora o mecanismo de detecção parecesse bastante promissor, a tentativa de implementação com amostras reais (produtos *PCR*), cujos tamanhos eram significativamente superiores ao da sonda, o resultado não foi conclusivo. Esta limitação foi então colmatada pelos mesmos autores, com o desenvolvimento de um método baseado no mesmo princípio, só que em vez de alvos de DNA sintético, a nanossonda passa a hibridar com o *primer* resultante da extensão de uma única base, depois do *PCR* (*SBE*, do inglês *single-base extension*) <sup>177</sup>.

Entretanto inúmeros grupos exploraram o conceito e ainda baseada na metodologia “*non crosslinking*”, uma nova abordagem foi desenvolvida por Baptista *et al.* Inicialmente concebida para detectar eventos de hibridação com RNA <sup>167</sup>, foi progressivamente melhorada de modo a detectar a mutação de resistência à rifampicina da *Mycobacterium tuberculosis* <sup>145</sup> e por fim, SNPs presentes no genoma da *Mycobacterium tuberculosis* em amostras específicas de DNA <sup>178</sup>.

À semelhança do estudo pioneiro de Sato *et al.*, esta abordagem colorimétrica caracteriza-se pela agregação diferencial entre amostras cujo seu tamanho é idêntico ao da sonda, porém, após hibridação e posterior adição de sal, embora o mecanismo envolvido seja igualmente semelhante, os resultados são diametralmente opostos. A concentração de sal utilizada corresponde ao valor que provoca agregação total da nanossonda isolada, ou seja, na ausência de amostra. Assim, na presença da amostra de DNA, cuja sequência é totalmente complementar numa determinada região do alvo, ao hibridar com a nanossonda faz aumentar a sua estabilidade coloidal, sendo que após a adição de sal,

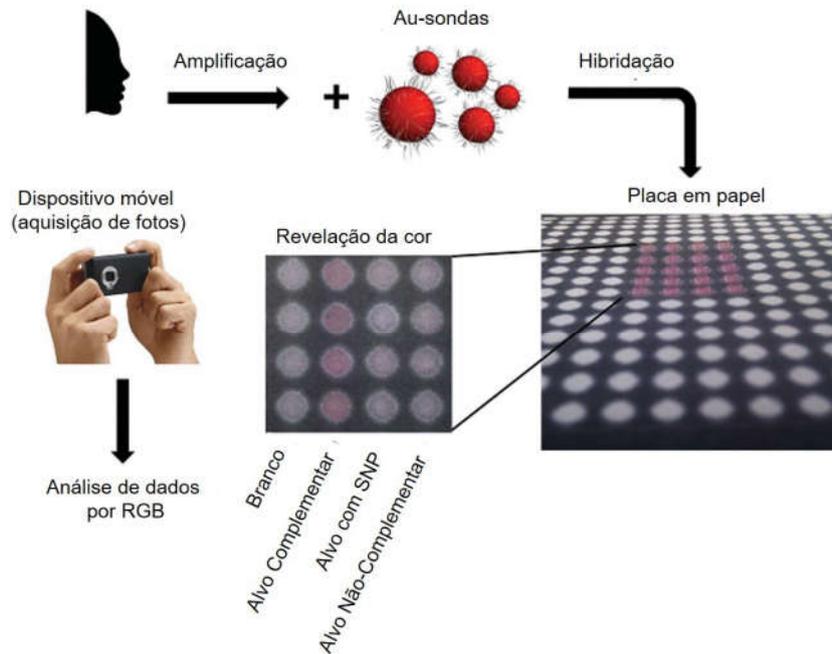
a cor da solução permanece inalterada (vermelha). Em oposição, na presença de amostras não complementares, a hibridação não ocorre, sendo que as nanossondas acabam expostas ao “ataque” do sal, acabando por agregar (azul). Uma terceira possibilidade corresponde à hibridação da nanossonda com DNA cuja sequência é igual à complementar, à exceção da posição onde está localizada o polimorfismo. Neste caso, a hibridação ocorre parcialmente e a posição do SNP na sonda influencia bastante a eficácia de discriminação do alvo mutado, sendo que se estiver localizado na extremidade 3', o resultado é visivelmente mais diferenciável <sup>179</sup>. Da hibridação parcial resulta uma espécie de “bifurcação” da amostra relativamente à nanossonda, gerando assim uma zona de desestabilização. De certa forma, esta situação permite que a estabilidade coloidal se mantenha, embora a adição de sal faça diminuir as repulsões eletrostáticas e faça com que a distância entre nanossondas seja menor. O resultado final manifestar-se-á através de uma ligeira alteração de cor (violeta) validada por espectroscopia UV-Vis, num deslocamento da banda LSPR para maiores comprimentos de onda <sup>180</sup>. Este ensaio *non-crosslinking*, que corresponde à abordagem utilizada nesta dissertação, está esquematizado na **figura 1.14**.



**Figura 1. 14** – Esquema representativo de um ensaio colorimétrico usando AuNP funcionalizadas através do método *non-crosslinking*, com base no exemplo do biossensor apresentado na referência <sup>145, 179</sup>. Amostras de dsDNA com sequência (1) complementar, (2) não complementar e (3) com um SNP.

O desenvolvimento e robustez da metodologia “*non-crosslinking*” permitiu diversos avanços, nomeadamente na sua transferência de ensaio colorimétrico em solução para a sua aplicação em

dispositivos ou plataformas POC. A implementação do método em sistemas de microfluídica e sobretudo, o uso de papel enquanto plataforma/suporte (**figura 1.15**) permitem que este tipo de biossensor se torne mais acessível, abrangente e conseqüentemente proporcione respostas rápidas, cujo resultado possa ser interpretado de forma simples, por parte do utilizador <sup>181-187</sup>.



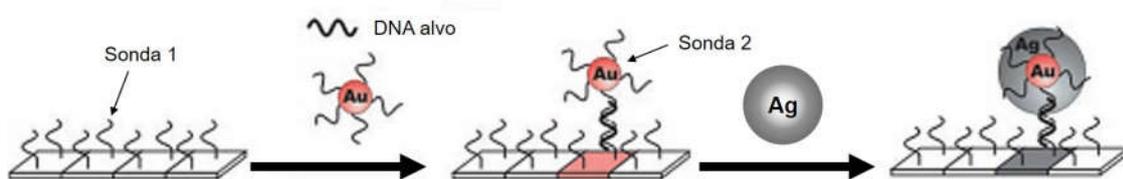
**Figura 1. 15** – Representação esquemática da detecção colorimétrica com nanossondas em papel. Análise dos dados por RGB (código de cores aditivas, **Red Green Blue**). O ensaio colorimétrico consiste na agregação diferencial, ou seja, na comparação visual das cores das soluções em teste após indução da agregação das Nanossondas com sal impregnado na matriz de papel. Imagem adaptada da referência <sup>188</sup>.

Apesar das evidências demonstradas quanto a eficácia deste método através do uso de AuNP esféricas, uma das grandes limitações é ainda a sensibilidade e sobretudo a ambigüidade associada às cores relacionadas com a agregação diferencial. Na grande maioria das vezes, os ensaios são realizados a baixas concentrações, tornando-se bastante difícil distinguir os resultados, especialmente a “olho nu”. Teoricamente as cores que resultam da detecção colorimétrica são o vermelho, o roxo e o azul, no entanto na prática (dadas as concentrações usadas) estas oscilam entre o rosa, o lilás e o roxo, sendo necessário o recurso a equipamentos de espectroscopia ótica para validar a detecção. O uso da tecnologia RGB e de um *software* que detete e converta a cor associada ao resultado, em percentagens de vermelho/verde e azul, vieram de facto, contrariar essa tendência, tornando possível a análise dos dados a partir de um dispositivo móvel. Ainda assim, neste tipo de biossensor, no qual se verifica a presença/ausência de SNP, os sistemas de resposta “sim/não” suscitam menos ambigüidades. Neste contexto seria muito interessante se a detecção se baseasse num sistema de ausência/presença de cor.

### 1.3.1.1.5 Métodos que usam AuNP funcionalizadas em ensaios “sanduíche”

Os métodos de DNA “em sanduíche” são muito comuns em vários sistemas de POC. Desde *microarrays* para múltiplos alvos, às tiras de streptavidina-biotina, passando pelos sistemas de fluxo lateral, são tudo técnicas que geralmente tem por base este método <sup>189-191</sup>.

Embora as plataformas de suporte variem de método para método, o princípio de detecção é partilhado por todos (ver **figura 1.16**). Regra geral, a sonda de ssDNA (sonda 1) é fixa num suporte sob a forma de tiras ou manchas circulares, sendo que de seguida, uma amostra de DNA alvo é colocada em contacto com a sonda 1, ocorrendo hibridação de acordo com a complementaridade entre ambas as sequências <sup>192-195</sup>. De seguida recorre-se a uma segunda sonda (sonda 2), nomeadamente a uma AuNP funcionalizada com oligonucleótidos modificados com tiol, as nanossonda. A introdução da sonda 2 pressupõe que esta hibride com a molécula da DNA alvo, que se encontra ligada à sonda 1, numa outra região em que ambas são complementares.



**Figura 1. 16** – Esquema representativo do princípio de detecção através do método “sanduíche”. Imagem adaptada da referência <sup>194</sup>.

A detecção é apenas validada depois de se efetuarem dois tipos de procedimentos; um de “limpeza” através do uso de soluções tampão, indicando após a sua passagem, que se a nanossonda não for removida, que esta hibridou corretamente, e por fim, um de “aumento de sinal”, sendo que para esse efeito é comum proceder-se à deposição de prata, nos locais onde estes processos decorrem <sup>194, 195</sup>. Os ensaios com base em “sistemas sanduíche”, adquirem esta designação precisamente pelo facto de os intervenientes, estarem confinados entre uma matriz e uma camada de prata.

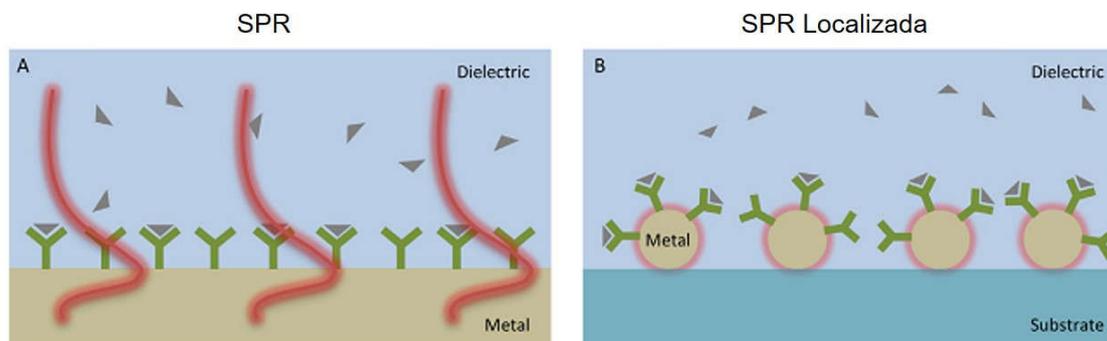
Os ensaios “em sanduíche” têm vindo a ser bastante desenvolvidos em tiras de fluxo lateral com boas percentagens de sensibilidade, sendo que atualmente surgem como alternativas apropriadas à detecção de produtos de PCR <sup>196</sup>.

### 1.3.1.2 Detecção através do desvio da LSPR por alteração do índice de refração

A detecção de DNA através do desvio da LSPR por alteração do RI está inserida nos métodos refratométricos. No entanto, antes de se falar propriamente na aplicação da LSPR em biossensores, deve mencionar-se qual a técnica que lhe deu origem.

À semelhança do que acontece em filmes metálicos como o da **figura 1.17A**, a excitação dos elétrons livres (plasmões) existentes na interface entre o metal e o seu ambiente dielétrico, conduz à

sua propagação e, conseqüentemente, ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Pequenas mudanças no RI do ambiente dielétrico, através da introdução de biomoléculas provocam desvios na SPR, medidos através da luz que é refratada. Em nanoestruturas, como indica a **figura 1.17B** acontece exatamente o mesmo, só que neste caso, como é confinado à NP, o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície adquire a designação “localizada” (L-SPR) e as alterações de RI vão induzir desvios que resultam da medição da luz dispersa <sup>197</sup>.



**Figura 1. 17** – Esquema representativo do princípio de detecção através do método SPR (A) e do método LSPR (B). Imagem adaptada da referência <sup>198</sup>.

As primeiras experiências de detecção que utilizaram propagação através da SPR foram conduzidas em 1983 por Liedberg *et al.* <sup>199</sup>, mas foram necessários cerca de 15 anos para que Englebienne *et al.* demonstrasse experimentalmente que os plasmões de superfície localizados (região vermelha da **figura 1.17B**) também poderiam ser utilizados como “sensores” na detecção de interações entre proteínas utilizando AuNP imobilizadas a um substrato <sup>200</sup>. Desde então vários biossensores baseados na LSPR foram desenvolvidos; através dos quais foi possível detetar interações biomoleculares do tipo: biotina-estreptavidina <sup>83, 201-203</sup>, DNA-DNA <sup>204-207</sup> e anticorpo-antígeno <sup>202, 208-210</sup>.

O princípio de detecção nestes biossensores refratométricos (normalmente de AgNP ou de AuNP) baseia-se na monitorização de diferenças espectrais causadas após a interação/ligação das biomoléculas às NPM, das quais se destacam as variações de intensidade, quer seja no comprimento de onda máximo <sup>203, 211</sup>, na alteração da curvatura <sup>212</sup> ou na posição do pico de ressonância plasmônica <sup>204, 209, 210</sup>.

Atualmente os eventos biomoleculares supracitados têm vindo a ser estudados a um nível individual, ou seja, considerando apenas uma NP isolada do coloide. O grupo de investigação de Van Duyne foi aquele que mais impulsionou esta abordagem ao demonstrar diversas interações através do uso de nanotriângulos de prata <sup>157, 205, 213, 214</sup>. A espectroscopia de “uma única NP” oferece muitas vantagens no que diz respeito à possibilidade de explorar as propriedades óticas de uma nanoestrutura e entender de que forma estas são afetadas pela sua geometria e pelo meio dielétrico que a envolve.

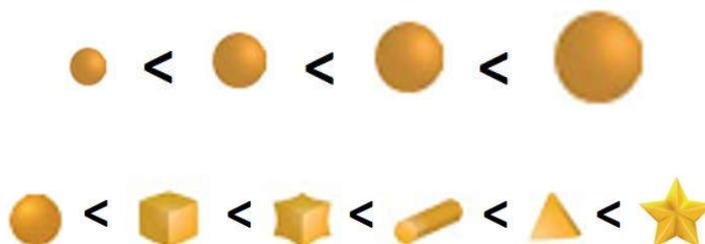
Para além das técnicas espectroscópicas baseadas na medição da luz absorvida, as interações podem ser avaliadas através do acoplamento de técnicas de microscopia ao espectrofotómetro. Destaca-se a microscopia de campo escuro (*darkfield*) <sup>204, 205, 213-215</sup>, a partir da qual é medida a luz

dispersa e a de reflexão interna total (*TIR*), que como o próprio nome indica, mede a luz refletida <sup>198</sup>. Estas duas técnicas de microscopia permitem a análise individualizada das propriedades óticas em tempo real, através de uma camera CCD ligada ao microscópio. Desta forma, a análise das NP individualmente permite a deteção de múltiplos alvos, em sistemas de *microarrays*, ao mesmo tempo que há uma redução significativa do limite de deteção (LOD), já que o principal desafio no uso destes biossensores é a sensibilidade e resolução, que se pretende que seja a nível molecular <sup>216</sup>.

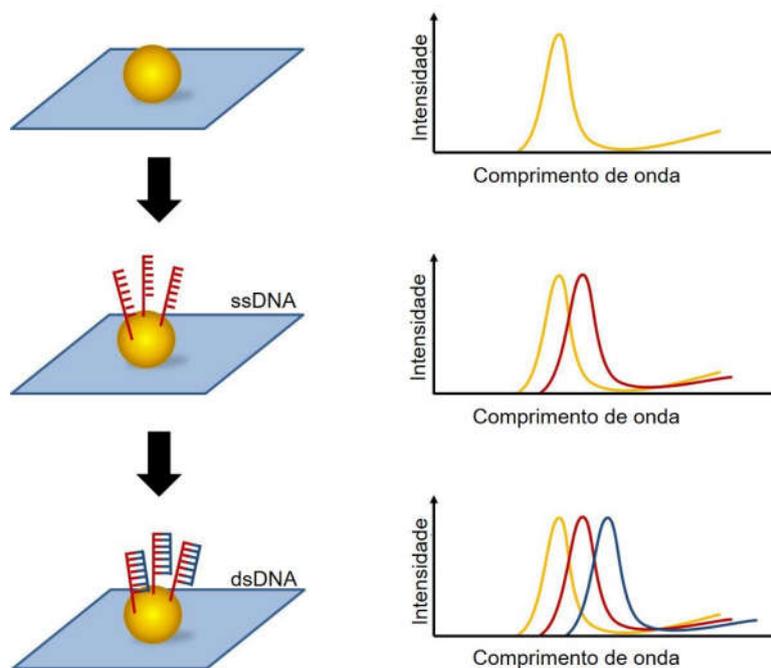
### 1.3.1.3 Fatores que afetam a sensibilidade ao índice de refração

Este tipo de biossensor tem a capacidade de detetar RI com valores extremamente próximos, visto que os campos eletromagnéticos gerados em torno das NPM são bastante elevados e o comprimento de onda de ressonância é extremamente sensível à variação do meio dielétrico local. Qualquer variação no RI por muito pequena que seja, pode provocar o deslocamento da banda de ressonância plasmónica. Para cada biossensor (transdutor) estabelecem-se parâmetros que dão conta do seu desempenho. A sensibilidade ao RI (*S*) é um deles e está relacionada, de forma aproximadamente linear, com a alteração de RI ( $\Delta n$ ) e o deslocamento provocado na LSPR da NPM ( $\Delta \lambda_{\text{máx}}$ ). Todavia é necessário atender que esta correlação só é válida para NPM dispersas em solução. A sua imobilização num suporte ou a funcionalização da superfície vai afetar significativamente a sensibilidade ao RI. A sua comparação só pode ser efetuada para NPM do mesmo material, neste caso do mesmo metal nobre.

De entre os vários tipos de AuNP: esferas, discos, triângulos, *rods*, estrelas, etc., os que apresentem razões dimensionais diferentes vão beneficiar de uma maior sensibilidade a mudanças de RI. Nestas circunstâncias, se considerarmos apenas AuNP, a sensibilidade RI varia com o tamanho e com a geometria, da seguinte forma:

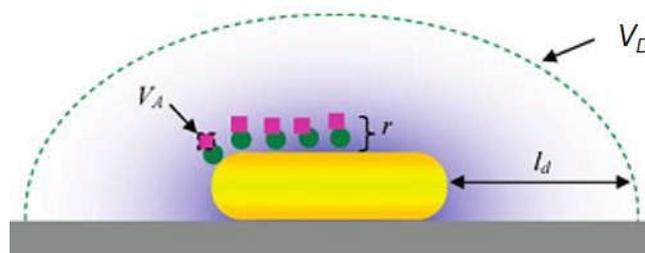


As moléculas de DNA, sejam elas ssDNA ou dsDNA apresentam RI diferentes, por conseguinte, a sua introdução no ambiente químico de uma AuNP vai induzir deslocamentos com  $\lambda_{\text{máx}}$  distintos, mas de forma linear, como ilustra a **figura 1.18**. O deslocamento não é causado exclusivamente pela natureza da molécula, a quantidade de material que efetivamente fica adsorvida, também faz deslocar a banda para maiores comprimentos de onda, podendo esse valor ser estimado através de isotérmicas de *Langmuir*.



**Figura 1. 18** – Esquema representativo do princípio de detecção por desvio da LSPR ao nível de NP individuais, por alteração do índice de refração (RI). São observadas, a cada passo, mudanças consecutivas no espectro de extinção (deslocamento do pico LSPR) à medida que diferentes tipos de moléculas de DNA interagem com a superfície da AuNP. Imagem adaptada da referência <sup>217</sup>.

Contudo, a partir de uma certa quantidade de biomolécula ou número de camadas, a superfície da NPM chega a um ponto de saturação, situação essa que leva a uma estagnação do sinal. A detecção de sinal ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ) é limitada a uma determinada região ao redor da AuNP (distância em nm), representada na **figura 1.19**.



**Figura 1. 19** – Esquema representativo da região de detecção de uma AuNP com geometria planar (*nanorod*, nanotriângulo) depositada num substrato. Molécula com RI<sub>1</sub> (●), molécula com RI<sub>2</sub> (■) e plasmão representado pela mancha azul. Em função do volume do analito ( $V_A$ ), dispõe-se da distância  $l_d$  para que sejam detetadas alterações, sendo que essa distância corresponde ao volume de detecção  $V_D$ . Imagem adaptada da referência <sup>218</sup>.

Geralmente a primeira camada de moléculas de DNA é introduzida na superfície das NPM gera, em valor absoluto, um deslocamento consideravelmente superior aos subsequentes, já que com a

formação de novas camadas, os deslocamentos da LSPR decaem com a distância à superfície da NP ( $I_d$ ). Esta perda gradual de sensibilidade por parte da NPM, alcança um patamar no qual se deixa de verificar deslocamentos adicionais. Este patamar é atingido para valores compreendidos entre  $10 < I_d < 20$  nm <sup>219, 220</sup>. Isto deve-se ao facto da energia da radiação que incide na NP já não ser capaz de penetrar tão eficientemente na interface e promover a excitação dos plasmões <sup>221</sup>.

Um processo que demonstra que este tipo de abordagem é claramente influenciado pelo volume de deteção ( $V_D$ ) localizado é a formação de SAM. À semelhança do que acontece com os alcanotióis <sup>219, 222, 223</sup>, os oligonucleótidos tiolados, manifestam igual tendência a formar uma densa camada molecular <sup>224</sup>, promovendo um deslocamento de algumas dezenas de nanómetros da LSPR, devido ao seu RI. No entanto, esse deslocamento será simultaneamente afetado pelo tamanho da molécula ou biomolécula, e conseqüentemente pelo número de camadas que se pretenda sobrepor. Independentemente da geometria das NP é detetado gradualmente um decréscimo da sensibilidade, e por fim uma total estagnação dos deslocamentos. Assim, duas NP que apresentem LSPR semelhantes, podem advir de NP geometrias diferentes, mas vão demonstrar uma sensibilidade RI muito semelhante <sup>225, 226</sup>.

## 1.4 Referências bibliográficas

1. Sahi, T. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **1994**, 29, (sup202), 1-6.
2. Misselwitz, B.; Pohl, D.; Frühauf, H.; Fried, M.; Vavricka, S. R.; Fox, M. *United European Gastroenterology Journal* **2013**.
3. Ebner, K. E.; Denton, W. L.; Brodbeck, U. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1966**, 24, (2), 232-236.
4. Bayless, T. M.; Christopher, N. L. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1969**, 22, (2), 181-190.
5. Dahlqvist, A.; Borgström, B. *Biochemical Journal* **1961**, 81, (2), 411-418.
6. Borgström, B.; Dahlqvist, A.; Lundh, G.; Sjövall, J. *Journal of Clinical Investigation* **1957**, 36, (10), 1521-1536.
7. Dahlqvist, A. *Journal of Clinical Investigation* **1962**, 41, (3), 463-470.
8. Wasserman, R. H. *Nature* **1964**, 201, (4923), 997-999.
9. Armbrecht, H. J.; Wasserman, R. H. *The Journal of Nutrition* **1976**, 106, (9), 1265-1271.
10. Suarez, F. L.; Savaiano, D. A.; Levitt, M. D. *New England Journal of Medicine* **1995**, 333, (1), 1-4.
11. Vandenplas, Y. *Asia Pac J Clin Nutr.* **2015**, 24, (Suppl 1), S9-S13.
12. Boll, W.; Wagner, P.; Mantei, N. *Am J Hum Genet* **1991**, 48, (5), 889-902.
13. Enattah, N. S.; Sahi, T.; Savilahti, E.; Terwilliger, J. D.; Peltonen, L.; Jarvela, I. *Nat Genet* **2002**, 30.
14. Mantei, N.; Villa, M.; Enzler, T.; Wacker, H.; Boll, W.; James, P.; Hunziker, W.; Semenza, G. *EMBO J* **1988**, 7, (9), 2705-2713.
15. Kuokkanen, M.; Kokkonen, J.; Enattah, N. S.; Ylisaukko-oja, T.; Komu, H.; Varilo, T.; Peltonen, L.; Savilahti, E.; Järvelä, I. *The American Journal of Human Genetics* **2006**, 78, (2), 339-344.
16. Mattar, R.; de Campos Mazo, D. F.; Carrilho, F. J. *Clinical and Experimental Gastroenterology* **2012**, 5, 113-121.
17. Järvelä, I.; Sabri Enattah, N.; Kokkonen, J.; Varilo, T.; Savilahti, E.; Peltonen, L. *The American Journal of Human Genetics* **1998**, 63, (4), 1078-1085.
18. Wang, Y.; Harvey, C. B.; Hollox, E. J.; Phillips, A. D.; Poulter, M.; Clay, P.; Walker-Smith, J. A.; Swallow, D. M. *Gastroenterology* **1988**, 114, 1230-1236.
19. He, T.; Priebe, M. G.; Harmsen, H. J. M.; Stellaard, F.; Sun, X.; Welling, G. W.; Vonk, R. J. *The Journal of Nutrition* **2006**, 136, (1), 58-63.
20. Samasca, G.; Bruchental, M.; Butnariu, A.; Pirvan, A.; Andreica, M.; Cristea, V.; Dejica, D. *Mædica* **2011**, 6, (1), 32-35.
21. Harvey, C. B.; Fox, M. F.; Jeggo, P. A.; Mantei, N.; Povey, S.; Swallow, D. M. *Annals of Human Genetics* **1993**, 57, (3), 179-185.
22. Harvey, C. B.; Hollox, E. J.; Poulter, M.; Wang, Y.; Rossi, M.; Auricchio, S.; Iqbal, T. H.; Cooper, B. T.; Barton, R.; Samer, M.; Korpela, R.; Swallow, D. M. *Annals of Human Genetics* **1998**, 62, (3), 215-223.
23. Sahi, T. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **1994**, 29, (sup202), 7-20.
24. Ingram, C. J. E.; Mulcare, C. A.; Itan, Y.; Thomas, M. G.; Swallow, D. M. *Human Genetics* **2008**, 124, (6), 579-591.
25. (NIDDK), N. I. o. D. a. D. K. D. Lactose Intolerance Statistics. <http://www.statisticbrain.com/lactose-intolerance-statistics/> (19/01/2016),
26. Tishkoff, S. A.; Reed, F. A.; Ranciaro, A.; Voight, B. F.; Babbitt, C. C.; Silverman, J. S.; Powell, K.; Mortensen, H. M.; Hirbo, J. B.; Osman, M.; Ibrahim, M.; Omar, S. A.; Lema, G.; Nyambo, T. B.; Gori, J.; Bumpstead, S.; Pritchard, J. K.; Wray, G. A.; Deloukas, P. *Nat Genet* **2007**, 39, (1), 31-40.
27. Bersaglieri, T.; Sabeti, P. C.; Patterson, N.; Vanderploeg, T.; Schaffner, S. F.; Drake, J. A.; Rhodes, M.; Reich, D. E.; Hirschhorn, J. N. *The American Journal of Human Genetics* **2004**, 74, (6), 1111-1120.
28. Misselwitz, B.; Pohl, D.; Frühauf, H.; Fried, M.; Vavricka, S. R.; Fox, M. *United European Gastroenterology Journal* **2013**, 1, (3), 151-159.
29. Kwak, H.-S.; Lee, W.-J.; Lee, M.-R. *International Dairy Journal* **2012**, 22, (2), 147-151.

30. Kruse, T. A.; Bolund, L.; Grzeschik, K. H.; Ropers, H. H.; Sjöström, H.; Norén, O.; Mantei, N.; Semenza, G. *FEBS Letters* **1988**, 240, (1–2), 123-126.
31. Harvey, C. B.; Yangxi, W.; Darmoul, D.; Phillips, A.; Mantei, N.; Swallow, D. M. *FEBS Letters* **1996**, 398, (2–3), 135-140.
32. Potter, J.; Ho, M.-W.; Bolton, H.; Furth, A. J.; Swallow, D. M.; Griffiths, B. *Biochemical Genetics* **1985**, 23, (5), 423-439.
33. Asp, N. G.; Dahlqvist, A.; Kuitunen, P.; Launiala, K.; Visakorpi, J. K. *The Lancet* **1973**, 302, (7824), 329-330.
34. Freiburghaus, A. U.; Schmitz, J.; Schindler, M.; Rotthauwe, H. W.; Kuitunen, P.; Launiala, K.; Hadorn, B. *New England Journal of Medicine* **1976**, 294, (19), 1030-1032.
35. Hovde, Ø.; Farup, P. G. *BMC Gastroenterology* **2009**, 9, (1), 1-7.
36. King, C. E.; Toskes, P. P.; Watkins, J. B. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **1984**, 21, (3), 269-281.
37. Di Stefano, M.; Terulla, V.; Tana, P.; Mazzocchi, S.; Romero, E.; Corazza, G. R. *Digestive and Liver Disease* **2009**, 41, (7), 474-479.
38. Rasinperä, H.; Savilahti, E.; Enattah, N. S.; Kuokkanen, M.; Tötterman, N.; Lindahl, H.; Järvelä, I.; Kolho, K. L. *Gut* **2004**, 53, (11), 1571-1576.
39. Enattah, N. S.; Sahi, T.; Savilahti, E.; Terwilliger, J. D.; Peltonen, L.; Jarvela, I. *Nat Genet* **2002**, 30, (2), 233-237.
40. Enattah, N. S.; Kuokkanen, M.; Forsblom, C.; Natah, S.; Oksanen, A.; Järvelä, I.; Peltonen, L.; Savilahti, E. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **2007**, 13, (25), 3508-3512.
41. Matthews, S. B.; Waud, J. P.; Roberts, A. G.; Campbell, A. K. *Postgraduate Medical Journal* **2005**, 81, (953), 167-173.
42. Swallow, D. M. *Annual Review of Genetics* **2003**, 37, (1), 197-219.
43. Tishkoff, S. A.; Reed, F. A.; Ranciaro, A.; Voight, B. F.; Babbitt, C. C.; Silverman, J. S. *Nat Genet* **2007**, 39.
44. Enattah, N. S.; Jensen, T. G. K.; Nielsen, M.; Lewinski, R.; Kuokkanen, M.; Rasinpera, H.; El-Shanti, H.; Seo, J. K.; Alifrangis, M.; Khalil, I. F.; Natah, A.; Ali, A.; Natah, S.; Comas, D.; Mehdi, S. Q.; Groop, L.; Vestergaard, E. M.; Imtiaz, F.; Rashed, M. S.; Meyer, B.; Troelsen, J.; Peltonen, L. *The American Journal of Human Genetics* **2008**, 82, (1), 57-72.
45. Ingram, C. J. E.; Raga, T. O.; Tarekegn, A.; Browning, S. L.; Elamin, M. F.; Bekele, E.; Thomas, M. G.; Weale, M. E.; Bradman, N.; Swallow, D. M. *Journal of Molecular Evolution* **2009**, 69, (6), 579-588.
46. Hassan, H. Y.; Erp, A.; Jaeger, M.; Tahir, H.; Oosting, M.; Joosten, L. A. B.; Netea, M. G. *BMC Research Notes* **2016**, 9, (1), 1-7.
47. Boisselier, E.; Astruc, D. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, (6), 1759-1782.
48. Chen, P. C.; Mwakwari, S. C.; Oyelere, A. K. *Nanotechnology, Science and Applications* **2008**, 1, 45-65.
49. Huang, X.; El-Sayed, M. A. *Journal of Advanced Research* **2010**, 1, (1), 13-28.
50. Conde, J.; Doria, G.; Baptista, P. *Journal of Drug Delivery* **2012**, 2012, 12.
51. Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P. N. *Chemical Reviews* **2016**, 116, (5), 2826-2885.
52. Arvizo, R.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. *Expert opinion on drug delivery* **2010**, 7, (6), 753-763.
53. Jain, K. K. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2003**, 3, (2), 153-161.
54. Alharbi, K. K.; Al-sheikh, Y. A. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2014**, 21, (2), 109-117.
55. Eustis, S.; El-Sayed, M. A. *Chemical Society Reviews* **2006**, 35, (3), 209-217.
56. Roduner, E. *Chemical Society Reviews* **2006**, 35, (7), 583-592.
57. Buzea, C.; Pacheco, I.; Robbie, K. *Biointerphases* **2007**, 2, (4), MR17-MR71.
58. Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chemical Reviews* **2004**, 104, (1), 293-346.
59. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Advanced Materials* **2001**, 13, (18), 1389-1393.
60. Lucky, S. S.; Soo, K. C.; Zhang, Y. *Chemical Reviews* **2015**, 115, (4), 1990-2042.

61. Cole, L. E.; Ross, R. D.; Tilley, J. M. R.; Vargo-Gogola, T.; Roeder, R. K. *Nanomedicine* **2015**, 10, (2), 321-341.
62. Faraday, M. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, 147, 145-181.
63. Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (14), 7238-7248.
64. Mie, G. *Ann Phys* **1908**, 330, (3), 377-445.
65. Draine, B. T.; Flatau, P. J. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994**, 11, (4), 1491-1499.
66. Yurkin, M. A.; Hoekstra, A. G. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **2007**, 106, (1), 558-589.
67. Fong, K. E.; Yung, L.-Y. L. *Nanoscale* **2013**, 5, (24), 12043-12071.
68. Gou, L.; Murphy, C. J. *Chemistry of Materials* **2005**, 17, (14), 3668-3672.
69. Scarabelli, L.; Coronado-Puchau, M.; Giner-Casares, J. J.; Langer, J.; Liz-Marzán, L. M. *ACS Nano* **2014**, 8, (6), 5833-5842.
70. Millstone, J. E.; Hurst, S. J.; Métraux, G. S.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. *Small* **2009**, 5, (6), 646-664.
71. Sajanalal, P. R.; Sreeprasad, T. S.; Samal, A. K.; Pradeep, T. *Nano Reviews* **2011**, 2, 10.3402/nano.v2i0.5883.
72. Zhang, J. Z.; Noguez, C. *Plasmonics* **2008**, 3, (4), 127-150.
73. Shao, L.; Susha, A. S.; Cheung, L. S.; Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Wang, J. *Langmuir* **2012**, 28, (24), 8979-8984.
74. Liz-Marzán, L. M. *Langmuir* **2006**, 22, (1), 32-41.
75. Grzelczak, M.; Perez-Juste, J.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L. M. *Chemical Society Reviews* **2008**, 37, (9), 1783-1791.
76. Barbosa, S.; Agrawal, A.; Rodríguez-Lorenzo, L.; Pastoriza-Santos, I.; Alvarez-Puebla, R. A.; Kornowski, A.; Weller, H.; Liz-Marzán, L. M. *Langmuir* **2010**, 26, (18), 14943-14950.
77. Thuy, N. T. B.; Yokogawa, R.; Yoshimura, Y.; Fujimoto, K.; Koyano, M.; Maenosono, S. *Analyst* **2010**, 135, (3), 595-602.
78. Keum, J.-W.; Kim, M.; Park, J.-M.; Yoo, C.; Huh, N.; Park, S. C. *Sensing and Bio-Sensing Research* **2014**, 1, 21-25.
79. Liu, M.; Wang, Z.; Zong, S.; Zhang, R.; Zhu, D.; Xu, S.; Wang, C.; Cui, Y. *Anal Bioanal Chem* **2013**, 405, (18), 6131-6136.
80. Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. *Anal Bioanal Chem* **2008**, 391, (3), 943-950.
81. Unser, S.; Bruzas, I.; He, J.; Sagle, L. *Sensors* **2015**, 15, (7), 15684.
82. Guo, L.; Jackman, J. A.; Yang, H.-H.; Chen, P.; Cho, N.-J.; Kim, D.-H. *Nano Today* **2015**, 10, (2), 213-239.
83. Li, D.; Zheng, G.; Ding, X.; Wang, J.; Liu, J.; Kong, L. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, 110, 485-488.
84. Park, J.-H.; Byun, J.-Y.; Yim, S.-Y.; Kim, M.-G. *Journal of Hazardous Materials* **2016**, 307, 137-144.
85. Tanaka, K.; Naka, K.; Miyoshi, E.; Narita, A.; Chujo, Y. *Polym J* **2015**, 47, (11), 747-752.
86. Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. *Anal Bioanal Chem* **2007**, 391, (3), 943-950.
87. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (32), 15700-15707.
88. Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. *Coordination Chemistry Reviews* **2005**, 249, (17-18), 1870-1901.
89. Miranda, A.; Malheiro, E.; Skiba, E.; Quaresma, P.; Carvalho, P. A.; Eaton, P.; de Castro, B.; Shelnutt, J. A.; Pereira, E. *Nanoscale* **2010**, 2, (10), 2209-2216.
90. Miranda, A.; Malheiro, E.; Eaton, P.; Carvalho, P. A.; de Castro, B.; Pereira, E. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2011**, 15, (05n06), 441-448.
91. Brown, K. R.; Walter, D. G.; Natan, M. J. *Chemistry of Materials* **2000**, 12, (2), 306-313.

92. Schulz, F.; Homolka, T.; Bastús, N. G.; Puentes, V.; Weller, H.; Vossmeier, T. *Langmuir* **2014**, 30, (35), 10779-10784.
93. Ansar, S. M.; Ameer, F. S.; Hu, W.; Zou, S.; Pittman, C. U.; Zhang, D. *Nano Letters* **2013**, 13, (3), 1226-1229.
94. Thiele, M.; Soh, J. Z. E.; Knauer, A.; Malsch, D.; Stranik, O.; Müller, R.; Csáki, A.; Henkel, T.; Köhler, J. M.; Fritzsche, W. *Chemical Engineering Journal* **2016**, 288, 432-440.
95. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, (7), 801-802.
96. Cheng, H.-W.; Schadt, M. J.; Zhong, C.-J. *Chemistry – An Asian Journal* **2016**, 11, (1), 120-127.
97. Kedia, A.; Kumar, P. S. *RSC Advances* **2014**, 4, (9), 4782-4790.
98. Chen, Y.; Gu, X.; Nie, C.-G.; Jiang, Z.-Y.; Xie, Z.-X.; Lin, C.-J. *Chemical Communications* **2005**, (33), 4181-4183.
99. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, 11, (0), 55-75.
100. Kumar, S.; Gandhi, K. S.; Kumar, R. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2007**, 46, (10), 3128-3136.
101. Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, (45), 13939-13948.
102. Frens, G. *Nature Physical Science* **1973**, 241, (105), 20-22.
103. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, (19), 4065-4067.
104. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Langmuir* **2001**, 17, (22), 6782-6786.
105. Harada, M.; Kizaki, S. *Crystal Growth & Design* **2016**, 16, (3), 1200-1212.
106. Torigoe, K.; Esumi, K. *Langmuir* **1992**, 8, (1), 59-63.
107. Quaresma, P.; Soares, L.; Contar, L.; Miranda, A.; Osorio, I.; Carvalho, P. A.; Franco, R.; Pereira, E. *Green Chemistry* **2009**, 11, (11), 1889-1893.
108. Gole, A.; Murphy, C. J. *Chemistry of Materials* **2004**, 16, (19), 3633-3640.
109. Langille, M. R.; Personick, M. L.; Zhang, J.; Mirkin, C. A. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, (35), 14542-14554.
110. Bakshi, M. S. *Crystal Growth & Design* **2016**, 16, (2), 1104-1133.
111. Johnson, C. J.; Dujardin, E.; Davis, S. A.; Murphy, C. J.; Mann, S. *Journal of materials chemistry* **2002**, 12, (6), 1765-1770.
112. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. *Chemistry of Materials* **2003**, 15, (10), 1957-1962.
113. Niu, W.; Zhang, L.; Xu, G. *Nanoscale* **2013**, 5, (8), 3172-3181.
114. Thiele, M.; Knauer, A.; Csáki, A.; Malsch, D.; Henkel, T.; Köhler, J. M.; Fritzsche, W. *Chemical Engineering & Technology* **2015**, 38, (7), 1131-1137.
115. Sau, T. K.; Murphy, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (28), 8648-8649.
116. Pandian Senthil, K.; Isabel, P.-S.; Benito, R.-G.; Abajo, F. J. G. d.; Luis, M. L.-M. *Nanotechnology* **2008**, 19, (1), 015606.
117. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Chemistry of Materials* **2001**, 13, (7), 2313-2322.
118. Martinsson, E.; Shahjamali, M. M.; Large, N.; Zaree, N.; Zhou, Y.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A.; Aili, D. *Small* **2016**, 12, (3), 330-342.
119. Meena, S. K.; Sulpizi, M. *Langmuir* **2013**, 29, (48), 14954-14961.
120. Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M.; Carnie, S.; Chan, D. Y. C.; Mulvaney, P. *Advanced Functional Materials* **2004**, 14, (6), 571-579.
121. Lohse, S. E.; Burrows, N. D.; Scarabelli, L.; Liz-Marzán, L. M.; Murphy, C. J. *Chemistry of Materials* **2014**, 26, (1), 34-43.
122. Sperling, R. A.; Parak, W. J. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2010**, 368, (1915), 1333-1383.
123. Tallury, P.; Malhotra, A.; Byrne, L. M.; Santra, S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, (4-5), 424-437.

124. Nimse, S.; Song, K.; Sonawane, M.; Sayyed, D.; Kim, T. *Sensors* **2014**, *14*, (12), 22208.
125. Xia, F.; Zuo, X.; Yang, R.; Xiao, Y.; Kang, D.; Vallée-Bélisle, A.; Gong, X.; Yuen, J. D.; Hsu, B. B. Y.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, (24), 10837-10841.
126. Jung, Y. L.; Jung, C.; Parab, H.; Li, T.; Park, H. G. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25*, (8), 1941-1946.
127. Gole, A.; Murphy, C. J. *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, (6), 1325-1330.
128. Lemeshko, S. V.; Powdrill, T.; Belosludtsev, Y. Y.; Hogan, M. *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, (14), 3051-3058.
129. Gole, A.; Murphy, C. J. *Langmuir* **2008**, *24*, (1), 266-272.
130. Zhu, K.; Zhang, Y.; He, S.; Chen, W.; Shen, J.; Wang, Z.; Jiang, X. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, (10), 4267-4270.
131. Li, N.; Zhao, P.; Liu, N.; Echeverria, M.; Moya, S.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, (27), 8363-8369.
132. Ueno, R.; Yao, H. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2013**, *426*, 39-46.
133. Li, F.; Zhang, H.; Dever, B.; Li, X.-F.; Le, X. C. *Bioconjugate chemistry* **2013**, *24*, (11), 1790-1797.
134. Gao, J.; Huang, X.; Liu, H.; Zan, F.; Ren, J. *Langmuir* **2012**, *28*, (9), 4464-4471.
135. Gole, A.; Murphy, C. J. *Langmuir* **2005**, *21*, (23), 10756-10762.
136. DeLong, R. K.; Reynolds, C. M.; Malcolm, Y.; Schaeffer, A.; Severs, T.; Wanekaya, A. *Nanotechnology, Science and Applications* **2010**, *3*, 53-63.
137. Jain, S.; Hirst, D. G.; O'Sullivan, J. M. *The British Journal of Radiology* **2012**, *85*, (1010), 101-113.
138. Welsch, N.; Lu, Y.; Dzubiella, J.; Ballauff, M. *Polymer* **2013**, *54*, (12), 2835-2849.
139. Sotnikov, D. V.; Zherdev, A. V.; Dzantiev, B. B. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, (1), 907-923.
140. Couto, C.; Vitorino, R.; Daniel-da-Silva, A. L. *Critical Reviews in Biotechnology* **2016**, 1-13.
141. Biju, V. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, (3), 744-764.
142. Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. *Chemical Reviews* **2012**, *112*, (5), 2739-2779.
143. Doria, G.; Conde, J.; Veigas, B.; Giestas, L.; Almeida, C.; Assunção, M.; Rosa, J.; Baptista, P. V. *Sensors* **2012**, *12*, (2), 1657.
144. Baptista, P. V.; Koziol-Montewka, M.; Paluch-Oles, J.; Doria, G.; Franco, R. *Clinical Chemistry* **2006**, *52*, (7), 1433-1434.
145. Endo, T.; Kerman, K.; Nagatani, N.; Takamura, Y.; Tamiya, E. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, (21), 6976-6984.
146. Zhang, J.; Liu, B.; Liu, H.; Zhang, X.; Tan, W. *Nanomedicine* **2013**, *8*, (6), 983-993.
147. Huang, Y.; Kannan, P.; Zhang, L.; Chen, T.; Kim, D.-H. *RSC Advances* **2015**, *5*, (72), 58478-58484.
148. Yin, L.; Yang, Y.; Wang, S.; Wang, W.; Zhang, S.; Tao, N. *Small* **2015**, *11*, (31), 3782-3788.
149. Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, (38), 8916-8920.
150. Gębala, M.; Schuhmann, W. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, (13), 2887-2895.
151. Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, (24), 8313-8318.
152. Zhang, X.; Servos, M. R.; Liu, J. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, (17), 7266-7269.
153. Schuck, P. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1997**, *26*, (1), 541-566.
154. Duan, X.; Li, Y.; Rajan, N. K.; Routenberg, D. A.; Modis, Y.; Reed, M. A. *Nat Nano* **2012**, *7*, (6), 401-407.
155. Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, (35), 10596-10604.
156. Singh, P. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *229*, 110-130.
157. Borisov, S. M.; Wolfbeis, O. S. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, (2), 423-461.
158. Peixoto de Almeida, M.; Pereira, E.; Baptista, P.; Gomes, I.; Figueiredo, S.; Soares, L.; Franco, R., Chapter 13 - Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Miguel, V.; Ângela, I. L.-L., Eds. Elsevier: 2014; Vol. Volume 66, pp 529-567.

159. Bosch, M. E.; Sánchez, A. J. R.; Rojas, F. S.; Ojeda, C. B. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2007**, 7, (6), 797-859.
160. Thaxton, C. S.; Georganopoulou, D. G.; Mirkin, C. A. *Clinica Chimica Acta* **2006**, 363, (1–2), 120-126.
161. Chen, X.-J.; Sanchez-Gaytan, B. L.; Qian, Z.; Park, S.-J. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2012**, 4, (3), 273-290.
162. Verma, M. S.; Rogowski, J. L.; Jones, L.; Gu, F. X. *Biotechnology Advances* **2015**, 33, (6, Part 1), 666-680.
163. Doria, G.; Conde, J.; Veigas, B.; Giestas, L.; Almeida, C.; Assunção, M.; Rosa, J.; Baptista, P. V. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2012**, 12, (2), 1657-1687.
164. Valentini, P.; Pompa, P. P. *RSC Advances* **2013**, 3, (42), 19181-19190.
165. Baptista, P.; Doria, G.; Henriques, D.; Pereira, E.; Franco, R. *Journal of Biotechnology* **2005**, 119, (2), 111-117.
166. Prasad, D.; Shankaracharya; Vidyarthi, A. S. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2011**, 27, (9), 2227-2230.
167. Deng, H.; Zhang, X.; Kumar, A.; Zou, G.; Zhang, X.; Liang, X.-J. *Chemical Communications* **2013**, 49, (1), 51-53.
168. Li; Rothberg, L. J. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (35), 10958-10961.
169. Liu, M.; Yuan, M.; Lou, X.; Mao, H.; Zheng, D.; Zou, R.; Zou, N.; Tang, X.; Zhao, J. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26, (11), 4294-4300.
170. He, W.; Huang, C. Z.; Li, Y. F.; Xie, J. P.; Yang, R. G.; Zhou, P. F.; Wang, J. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (22), 8424-8430.
171. Fu, Z.; Zhou, X.; Xing, D. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, 182, 633-641.
172. Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (9), 1959-1964.
173. Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* **1996**, 382, (6592), 607-609.
174. Reynolds, R. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (15), 3795-3796.
175. Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (27), 8102-8103.
176. Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *Nucleic Acids Research* **2005**, 33, (1), e4.
177. Doria, G.; Franco, R.; Baptista, P. *Nanobiotechnology, IET* **2007**, 1, (4), 53-57.
178. Doria, G.; Baumgartner, B. G.; Franco, R.; Baptista, P. V. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 77, (1), 122-124.
179. Bruno, V.; Diana, M.; João, P.; Isabel, P.; Isabel, C.; Miguel, V.; Pedro, V. B. *Nanotechnology* **2010**, 21, (41), 415101.
180. Wang, S.; Inci, F.; De Libero, G.; Singhal, A.; Demirci, U. *Biotechnology Advances* **2013**, 31, (4), 438-449.
181. Ngo, Y. H.; Li, D.; Simon, G. P.; Garnier, G. *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, 163, (1), 23-38.
182. He, Y.; Zeng, K.; Gurung, A. S.; Baloda, M.; Xu, H.; Zhang, X.; Liu, G. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, (17), 7169-7177.
183. Veigas, B.; Fortunato, E.; Baptista, P. V., Mobile Based Gold Nanoprobe TB Diagnostics for Point-of-Need. In *Mobile Health Technologies: Methods and Protocols*, Rasooly, A.; Herold, E. K., Eds. Springer New York: New York, NY, 2015; pp 41-56.
184. Bernacka-Wojcik, I.; Águas, H.; Carlos, F. F.; Lopes, P.; Wojcik, P. J.; Costa, M. N.; Veigas, B.; Igreja, R.; Fortunato, E.; Baptista, P. V.; Martins, R. *Biotechnology and Bioengineering* **2015**, 112, (6), 1210-1219.
185. Bernacka-Wojcik, I.; Lopes, P.; Catarina Vaz, A.; Veigas, B.; Jerzy Wojcik, P.; Simões, P.; Barata, D.; Fortunato, E.; Viana Baptista, P.; Águas, H.; Martins, R. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, 48, 87-93.
186. Sun, J.; Xianyu, Y.; Jiang, X. *Chemical Society Reviews* **2014**, 43, (17), 6239-6253.
187. Veigas, B.; Jacob, J. M.; Costa, M. N.; Santos, D. S.; Viveiros, M.; Inacio, J.; Martins, R.; Barquinha, P.; Fortunato, E.; Baptista, P. V. *Lab on a Chip* **2012**, 12, (22), 4802-4808.
188. Shen, J.; Li, Y.; Gu, H.; Xia, F.; Zuo, X. *Chemical Reviews* **2014**, 114, (15), 7631-7677.

189. Gubala, V.; Harris, L. F.; Ricco, A. J.; Tan, M. X.; Williams, D. E. *Analytical Chemistry* **2012**, 84, (2), 487-515.
190. Posthuma-Trumpie, G. A.; Korf, J.; Amerongen, A. *Anal Bioanal Chem* **2008**, 393, (2), 569-582.
191. Cao, X.; Wang, Y.-F.; Zhang, C.-F.; Gao, W.-J. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 22, (3), 393-398.
192. Zhao, J.; Tang, S.; Storhoff, J.; Marla, S.; Bao, Y. P.; Wang, X.; Wong, E. Y.; Ragupathy, V.; Ye, Z.; Hewlett, I. K. *BMC Biotechnology* **2010**, 10, (1), 1-9.
193. Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science* **2000**, 289.
194. Storhoff, J. J.; Marla, S. S.; Bao, P.; Hagenow, S.; Mehta, H.; Lucas, A.; Garimella, V.; Patno, T.; Buckingham, W.; Cork, W.; Müller, U. R. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, 19, (8), 875-883.
195. Baeumner, A. J.; Jones, C.; Wong, C. Y.; Price, A. *Anal Bioanal Chem* **2004**, 378, (6), 1587-1593.
196. Li, M.; Cushing, S. K.; Wu, N. *Analyst* **2015**, 140, (2), 386-406.
197. Estevez, M. C.; Otte, M. A.; Sepulveda, B.; Lechuga, L. M. *Analytica Chimica Acta* **2014**, 806, 55-73.
198. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299-304.
199. Englebienne, P. *Analyst* **1998**, 123, (7), 1599-1603.
200. Raschke, G.; Kowarik, S.; Franzl, T.; Sönnichsen, C.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Nichtl, A.; Kürzinger, K. *Nano Letters* **2003**, 3, (7), 935-938.
201. Hall, W. P.; Ngatia, S. N.; Van Duyne, R. P. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* **2011**, 115, (5), 1410-1414.
202. Nath, N.; Chilkoti, A. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (18), 5370-5378.
203. Soares, L.; Csáki, A.; Jatschka, J.; Fritzsche, W.; Flores, O.; Franco, R.; Pereira, E. *Analyst* **2014**, 139, (19), 4964-4973.
204. Schneider, T.; Jahr, N.; Jatschka, J.; Csaki, A.; Stranik, O.; Fritzsche, W. *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, 15, (4), 1-10.
205. Olofsson, L.; Rindzevicius, T.; Pfeiffer, I.; Käll, M.; Höök, F. *Langmuir* **2003**, 19, (24), 10414-10419.
206. Otte, M. A.; Estévez, M. C.; Carrascosa, L. G.; González-Guerrero, A. B.; Lechuga, L. M.; Sepúlveda, B. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115, (13), 5344-5351.
207. Fujiwara, K.; Watarai, H.; Itoh, H.; Nakahama, E.; Ogawa, N. *Anal Bioanal Chem* **2006**, 386, (3), 639-644.
208. Haes, A. J.; Hall, W. P.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P. *Nano Letters* **2004**, 4, (6), 1029-1034.
209. Haes, A. J.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (7), 2264-2271.
210. Dahlin, A. B.; Tegenfeldt, J. O.; Höök, F. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (13), 4416-4423.
211. Chen, P.; Liedberg, B. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, (15), 7399-7405.
212. McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P. *Nano Letters* **2003**, 3, (8), 1057-1062.
213. Sherry, L. J.; Jin, R.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Nano Letters* **2006**, 6, (9), 2060-2065.
214. Hu, M.; Novo, C.; Funston, A.; Wang, H.; Staleva, H.; Zou, S.; Mulvaney, P.; Xia, Y.; Hartland, G. V. *Journal of materials chemistry* **2008**, 18, (17), 1949-1960.
215. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P. *Nat Mater* **2008**, 7, (6), 442-453.
216. Schneider, T.; Stranik, O.; Jahr, N.; Csaki, A.; Fritzsche, W.
217. Mayer, K. M.; Hafner, J. H. *Chemical Reviews* **2011**, 111, (6), 3828-3857.
218. Haes, A. J.; Zou, S.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, (1), 109-116.
219. Brolo, A. G. *Nat Photon* **2012**, 6, (11), 709-713.
220. Otte, M. A.; Sepúlveda, B.; Ni, W.; Juste, J. P.; Liz-Marzán, L. M.; Lechuga, L. M. *ACS Nano* **2010**, 4, (1), 349-357.
221. Malinsky, M. D.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, (7), 1471-1482.

222. Haes, A. J.; Zou, S.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, (22), 6961-6968.
223. Sakao, Y.; Nakamura, F.; Ueno, N.; Hara, M. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, 40, (3–4), 149-152.
224. Charles, D. E.; Aherne, D.; Gara, M.; Ledwith, D. M.; Gun'ko, Y. K.; Kelly, J. M.; Blau, W. J.; Brennan-Fournet, M. E. *ACS Nano* **2010**, 4, (1), 55-64.
225. Sannomiya, T.; Sahoo, P. K.; Mahcicek, D. I.; Solak, H. H.; Hafner, C.; Grieshaber, D.; Vörös, J. *Small* **2009**, 5, (16), 1889-1896.



## **C**apítulo II.

Otimização do protocolo de sequenciação de *Sanger* para a determinação de genótipos relacionados com a Intolerância à Lactose em amostras clínicas



## 2.1 Breve introdução ao capítulo

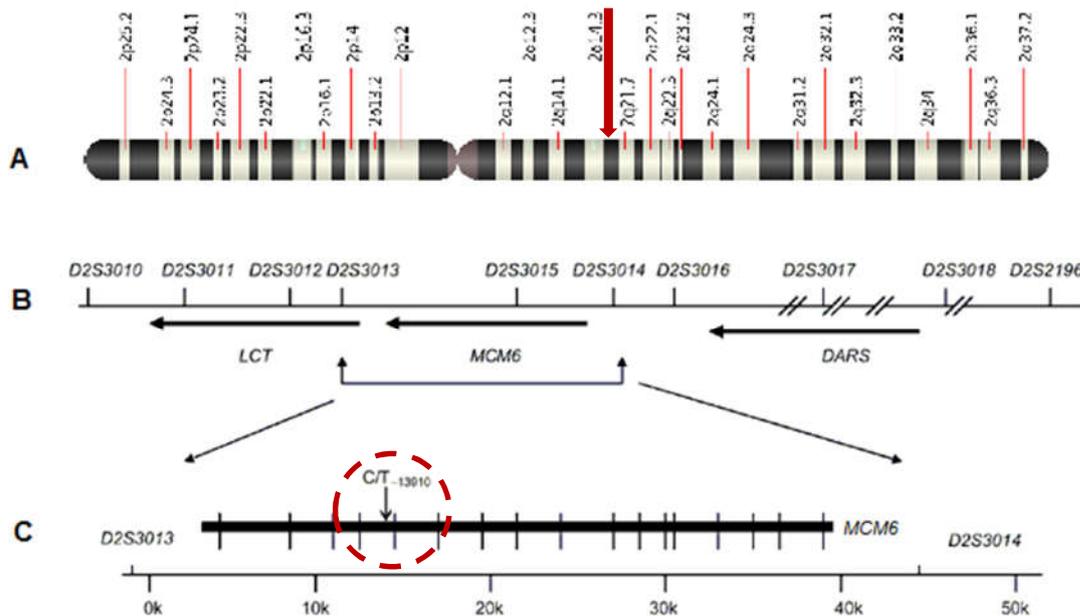
### 2.1.1 Hipolactasia primária do tipo adulto (HPTA) e o polimorfismo C/T -13910

A hipolactasia primária do tipo adulto (HPTA) traduz-se num decréscimo progressivo de expressão da enzima lactase, após o período de amamentação. Assim, um indivíduo ao manifestar dificuldades na degradação/absorção da lactose, através de sintomas relacionados com a intolerância à lactose (IL), pode apresentar o fenótipo “intolerante”. Em contrapartida, o facto de um indivíduo manifestar o fenótipo oposto, “tolerante”, pode sugerir que o seu genoma possa ter sido alvo de uma variação genética, já que em idade adulta, somos ancestralmente desprovidos da capacidade de produzir lactase <sup>1-4</sup>. No entanto, a situação é apresentada como uma hipótese, já que há ainda a possibilidade de o indivíduo produzir uma quantidade de lactase moderada, que lhe permite digerir lactose, embora com menor eficácia e em menores quantidades <sup>5-7</sup>.

Os polimorfismos de base única (SNP) surgem ao nível do gene *LCT*, responsável pela codificação e expressão da enzima lactase, localizado no cromossoma 2q21 <sup>8,9</sup>, como representado na **figura 2.1A**. A regulação do gene *LCT* é da responsabilidade do gene *MCM6*, sendo precisamente na região promotora deste gene, localizado nas proximidades do *LCT* que se encontram mutações que justificam a persistência da lactase (PL) no organismo, em idade adulta <sup>10</sup>.

A vertente genética da IL será o principal foco neste capítulo, e ainda que existam mais variantes associadas a esta condição, apenas serão processadas e analisadas amostras cuja área de interesse contenha o polimorfismo de base única SNP C/T -13910 (rs4988235) <sup>11</sup>.

Este SNP está localizado a aproximadamente 14 Kb do local de início da transcrição do *LCT*, dentro do intrão 13 do gene *MCM6*, e resulta numa troca de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição -13910 (ver **figura 2.1C**). Enattah *et al.* em 2002 conclui que o alelo T-13910 está relacionado com a produção e PL no organismo em indivíduos da Europa do Norte <sup>1</sup>. A sua frequência em termos percentuais é suficientemente alta para ser considerada uma variação responsável pelo fenótipo da “tolerante” decorrente de PL, enquanto o alelo C-13910 apresenta uma percentagem de 100% associada à HPTA.



**Figura 2. 1 – Localização do SNP C/T -13910. A.** Localização do gene *LCT* no braço comprido do cromossoma 2, no locus 21 (seta vermelha). **B.** Mapa da região abrangente do cromossoma 2q21 contendo os genes *LCT*, *MCM6* e *DARS* (setas pretas indicam o sentido 5' → 3'). **C.** Localização da variante em estudo, o polimorfismo de base única (SNP C/T -13910) situado no intrão do gene *MCM6* (tracejado vermelho). Imagem adaptada da referência <sup>1</sup>.

Com base nesta premissa recorreram-se a processos e procedimentos que integram o diagnóstico da IL vigentes na empresa STAB-Vida Lda., nomeadamente a reações de amplificação por *PCR* e sequenciação. Todavia, para que a amplificação seja específica ao alvo do estudo, procedeu-se previamente ao desenho dos *primers*.

### 2.1.2 Desenho de *primers*

Os *primers* têm um papel de destaque em ambas as reações de *PCR* e sequenciação, uma vez que serão estes os responsáveis pela delimitação da área a ser amplificada ou sequenciada (**figura 2.2**), respetivamente. O facto de os *primers* serem sintetizados em laboratório permite a criação de um par de *primers*, o *forward* (*FWD*) e o *reverse* (*REV*) customizado, que obedecendo a determinados fatores irão tornar a reação de *PCR* muito mais específica e de alto rendimento.

Embora não sejam os únicos, os principais aspetos a considerar são nomeadamente, o tamanho destes oligonucleótidos que deve rondar os 15-30 nucleótidos; o seu conteúdo GC deve ser de aproximadamente 40-60%, assim como devem conter 2 a 3 nucleótidos G e/ou C nas extremidades 3' e uma temperatura de fusão semelhante entre si, situada no intervalo de temperaturas de 52-65 °C. Deve atender-se também que não devem existir conjuntos de bases que conduzam a situações de *self-annealing* e/ou formação de dímeros. Para isso, a estrutura secundária dos *primers* deverá ser

estudada através do cálculo do  $\Delta G$  dos *primers in silico* no software *OligoAnalyzer*<sup>®</sup> e o seu valor mínimo não deverá ser inferior a -9 kcal/mol<sup>13</sup>.

```
TGGTTGAAGCCGAAGATGGGACGCTTGAATGCCCTTTCGTACTACTCCCCTTTTACCTCGTTAATACCCAC
TGACCTATCCTCGTGGAATGCAGGGCTCAAAGAACAATCTAAAAATCAAACATTATACAAATGCAACCTA
AGGAGGAGAGTTCCCTTGAGGCCAGGGCTTACATTATCTTATCTGTATTGCCAGCGCAGAGGCCCTACTAG
TACATTGTAGGGTCTAAGTACATTTTTCTGAATGAAAGGTATTAATGGTAACTTAC GTCTTTATGCA
CTCTATAAACTATGACGTGATCGTCTCCGTCTAACAACCTACCACATCTGTATTGCCAGCGCAGTTA
```

**Figura 2. 2 – Sequência nucleotídica de uma região específica do gene *MCM6*.** Fragmento de DNA resultante da amplificação - 345 bp, delimitado pelas sequências de *primers*. A **cinzento** estão identificados os *primers*, IL\_FWD no sentido 5'→3', (seta para a direita) e IL\_REV no sentido 5'→3', (seta para esquerda) e a **preto**, o SNP C/T -13910. Os *primers* selecionados apresentam as seguintes sequências, 5'-GAAGATGGGACGCTTGAATG-3' e 5'-CTGCGCTGGCAATACAGAT-3'.

### 2.1.3 Metodologia usada para a identificação do SNP C/T -13910

Embora a empresa STAB-Vida disponha de tecnologia altamente avançada no que diz respeito à sequenciação massiva de DNA, para este estudo em concreto, o método de *Sanger*, continua a ser a opção mais simples, económica e fiável, já que se trata da determinação de uma sequência de nucleótidos em produtos de *PCR* com tamanhos inferiores a 500 nucleótidos.

A reação de *PCR* e de sequenciação pelo método de *Sanger* são técnicas que, de acordo com o alvo, podem ser otimizadas através do ajuste das condições experimentais com vista à melhoria dos seus resultados e relação qualidade/custo. Estes ajustes de condições experimentais traduzem-se por exemplo, na eliminação de passos e reações secundárias, diminuição do volume de reagentes e tempo, que por sua vez, podendo conduzir à obtenção de resultados igualmente fidedignos e com menores custos associados.

Como tal, no presente capítulo serão descritos no âmbito dos ensaios genéticos para determinação de IL, os procedimentos envolvidos na identificação do genótipo de amostras clínicas e discutidos os resultados obtidos na sua otimização. As melhorias implementadas ao método vigente em rotina laboratorial serão introduzidas na preparação de amostras que irão ser utilizadas nas alternativas de diagnóstico (sem recurso à sequenciação), que serão apresentadas nos próximos capítulos.

## 2.2 Metodologia Experimental

### 2.2.1 Materiais e equipamentos

- Termociclador *MyCycler*<sup>TM</sup> (Bio-Rad, EUA)
- Espectrofotômetro UV-Vis Microvolume *Nanodrop* ND-1000 (*Nanodrop* Technologies, EUA)
- Termociclador *Tgradient* (Biometra, Alemanha)
- GelDoc XR (Bio-Rad, EUA)
- Sequenciador 3730XL *DNA Analyser* (Applied Biosystems, EUA)
- Câmara de fluxo laminar *SPACE* (VWR International PBI, Itália)
- Sistema de água Ultrapura *Smart2Pure* (TKA, Alemanha)
- Fonte de Energia *Series 90 Mid-Range* (Thermo Scientific, EUA)
- Centrífuga *Galaxy 16DH* (VWR, EUA)
- Vortex *IKA*<sup>®</sup> *MS 3 digital* (IKA, Alemanha)

#### 2.2.1.1 Reagentes químicos usados na preparação de soluções

Tabela 2. 1 – Reagentes químicos e respectivos distribuidores

Reagente	Distribuidor
Agarose	Lonza
FTA <i>Purification Reagent</i>	Whatman
<i>GelRed</i> <sup>TM</sup> Gel corante de ácidos nucleótidos	Biotium
Água sem nucleases	Cleaver Scientific Ltd
EDTA (ácido etilenodiaminico tetra-acético)	VWR
Ácido acético glacial	Panreac
TRIS (Tris(hidroximetil)aminometano)	AppliChem

### 2.2.1.2 Material biológico usado nos ensaios

**Tabela 2. 2** – Sequências dos *primers* utilizados para amplificar a região de interesse do gene *MCM6* que contém a variante genética em estudo (SNP C/T -13910) através da técnica de *PCR*.

Nome	Tamanho do produto <i>PCR</i>	Sequência Nucleotídica (5'→3')	Distribuidor
IL_FWD	345 bp	GAAGATGGGACGCTTGAATG	STAB-Vida, Portugal
IL_REV		TAGACATAACGGTTCGCGTC	

**Tabela 2. 3** – Reagentes utilizados nos procedimentos que envolvem biologia molecular (enzimas, kits comerciais, etc.)

Enzimas	Distribuidor
Surf Hot-Taq	STAB-Vida, Portugal
Exonuclease I	Fermentas, Canadá
Fosfatase alcalina FastAP™ Thermo sensitive	Fermentas, Canadá
<b>Marcadores de DNA</b>	Distribuidor
Marcador de DNA <i>GeneRuler</i> ™ 100 bp, 100-1000 bp	Fermentas, Canadá
Marcador de DNA <i>GeneRuler</i> ™ 1 kb, 250-10 000 bp	
<b>Kit de Extração de DNA</b>	Distribuidor
<i>Prep-Gem</i> ®	ZyGem, VWR Internacional
<i>Sky Blue</i> 10x buffer	
<b>Kit de Sequenciação de DNA</b>	Distribuidor
<i>BigDye Terminator v3.1</i>	Applied Biosystems

#### - Solução de TAE 50x (1 L)

Pesou-se 242 g de TRIS e juntou-se 57,1 mL ácido acético glacial. À mistura adicionou-se 18,6 g EDTA e perfez-se o volume com água destilada.

#### - Solução de “ExoFast” (1000 µL)

Esta solução enzimática é o resultado de junção de duas enzimas; pipetou-se 2,5 µL de exonuclease I (20 U/µL) e 25 µL fosfatase alcalina, a FastAP (1 U/µL), perfazendo-se com 972,5 µL de água destilada.

### 2.2.1.3 Amostras clínicas de DNA

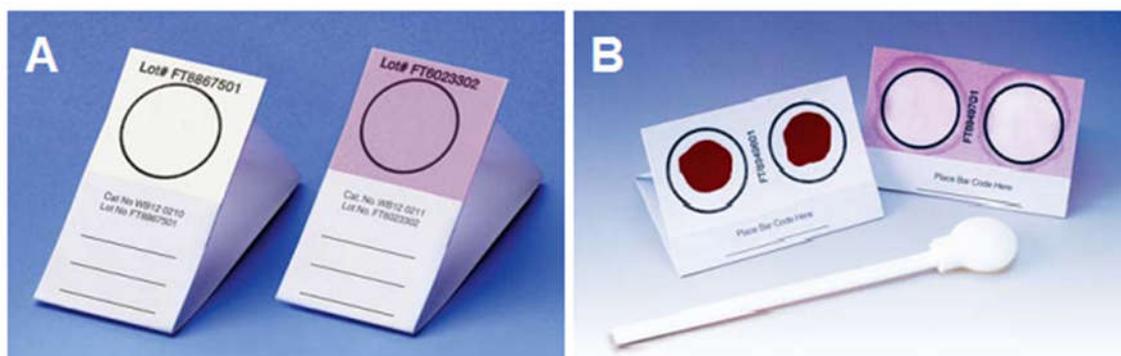
O DNA utilizado para este tipo de teste genético foi na sua grande maioria proveniente de amostras de sangue ou de saliva de indivíduos que requisitaram o *kit* Nutrigene – produto e serviço

disponibilizados pela STAB-Vida (atualmente apenas acessível por prescrição de um médico). Para este estudo foram utilizadas amostras cuja manipulação foi previamente autorizada pelo requerente do teste através do termo de confidencialidade.

O *kit* Nutrigene contém um cartão com uma zona circular específica de acordo com a tecnologia da *Whatman* FTA. Esta tecnologia permite a deposição e armazenamento de DNA num cartão micro FTA®, mais propriamente numa matriz de celulose, cujos componentes químicos nela impregnados irão atuar tanto na lise celular e desnaturação de proteínas, como irão possibilitar o armazenamento do DNA à temperatura ambiente por longos períodos de tempo, sem o degradar, evitando assim comprometer o sucesso da reação de *PCR*. Após a lavagem da matriz com os reagentes recomendados pela *Whatman* (FTA *Purification Reagent* e água isenta de nucleases) o DNA permanece retido, enquanto as proteínas e inibidores são removidos.

A colheita de amostras de sangue é realizada recorrendo-se a uma lanceta, que irá perfurar de forma pouco profunda o dedo, sendo o sangue depositado no cartão FTA® de cor branca (ver colocação da amostra no cartão – antes e depois, **na figura 2.3A e 2.3B**, respetivamente)

A colheita de amostras de saliva é realizada com o recurso a uma zaragatoa (**figura 2.3B**), a qual é inserida na cavidade bucal e friccionada na língua e zonas circundantes. Após este procedimento, a zaragatoa já com amostra (células bocais) será colocada em contacto com um cartão FTA® cuja matriz é rosa (**figura 2.3A**). Esta coloração do cartão na zona circular é bastante importante, já que é através da reação colorimétrica da saliva com determinados produtos químicos patenteados presentes na matriz, que é possível identificar as zonas onde a amostra foi depositada. No processamento da amostra para a extração do DNA, a única diferença entre a amostra de saliva e a de sangue, é que a última necessitará de mais um passo de lavagem com água sem nucleases.



**Figura 2.3** – **A.** Cartões FTA® próprios para amostras de sangue (matriz branca) e saliva (matriz rosa). **B.** Cartões FTA® com amostra de sangue (à esquerda) e com amostra de saliva (à direita, cuja deposição se traduz na reação colorimétrica da saliva com a matriz rosa, que passa a branco na sua presença). Em baixo, uma zaragatoa, um utensílio auxiliar para a colheita de células bucais.

## 2.2.2 Procedimentos

### NOTA INTRODUTÓRIA

Os procedimentos aqui descritos constam nas instruções operacionais I-02.03-00 (extração de DNA e reação de *PCR*) e I-02.09-00 (reação de sequenciação) da empresa STAB-Vida Lda. À data, os seus conteúdos estavam certificados pela norma ISO 9001:2008.

O manuseamento de DNA, antes da sua amplificação (extração e/ou *PCR*) deverá ser executado obedecendo às condições de esterilidade e normas de segurança estabelecidas pelo laboratório de Genética Humana da empresa STAB-Vida Lda.

#### **2.2.2.1 Purificação de DNA de amostras de sangue ou de saliva em cartões Whatman FTA® (uso direto do disco)**

De acordo com as recomendações protocolares inerentes ao sistema de cartões FTA perfurou-se o mesmo com auxílio de um *Micro-Punch*™ de forma a obter um disco de 3 mm, depositando-o num tubo de *PCR* de 0,2 mL. Para amostras de saliva/sangue procedeu-se respetivamente, a duas/três lavagens com *FTA Purification Reagent*; adicionou-se 150 µL a cada tubo com o disco; incubou-se durante 5 minutos à  $T_{amb}$ , tendo-se descartado o *FTA Purification Reagent* no final da incubação. Para garantir uma eficiente lavagem do disco, usou-se o mesmo volume de água isenta de nucleases; incubou-se durante mais 5 minutos à  $T_{amb}$  e removeu-se todo o volume. O disco após a lavagem, estará livre de contaminantes e o DNA retido na sua matriz, purificado. Secou-se o disco durante 10 minutos a 56 °C no termociclador *MyCycler* - deixou-se o tubo aberto para facilitar a secagem. Aplicou-se diretamente a mistura reacional da reação de *PCR* no frasco, contendo o disco com o DNA purificado.

#### **2.2.2.2 Extração de DNA de amostras de sangue ou de saliva em cartões Whatman FTA® com Prep-Gem®**

O procedimento é aplicado a discos provenientes de cartões FTA, normalmente para extrair maiores quantidades de DNA (2-3 discos). O processo contempla dois passos, o primeiro de limpeza – três lavagens com água sem nucleases e o segundo, extração propriamente dita, recorrendo a um *kit* de extração enzimática, *Prep-Gem*® (ZyGem, VWR International).

Num tubo de *PCR*, aos discos depois de lavados adicionaram-se 57,2 µL de água isenta de nucleases, 6,5 µL do tampão *Sky Blue* 10x e 1,3 µL de *Prep-Gem*®. Finalmente, procedeu-se à incubação num termociclador, num programa indicado pelo Distribuidor (**tabela 2.4**). Terminado o programa *Prep-Gem*®, transferiu-se a solução contendo o DNA, para um tubo de *PCR* novo, descartando-se o tubo com o disco.

**Tabela 2. 4** – Condições de temperatura e tempos de incubação para a ativação da enzima do *kit* Prep-Gem® e extração do DNA contido num disco do cartão FTA

Temperatura / °C	Tempo / min
75	15
95	5

### 2.2.2.3 Reação de amplificação da região de interesse através da técnica de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

A técnica de reação em cadeia da polimerase (*PCR*), baseia-se na amplificação exponencial de ácidos nucleicos recorrendo a vários ciclos de temperatura que resultam na replicação de uma sequência alvo com tamanho definido, contendo a região de interesse <sup>14,15</sup>. Para tal, utilizaram-se oligonucleótidos iniciadores (*primers*) previamente desenhados, representados na **tabela 2.2**.

No pré-*mix* (designação dada à mistura de reagentes intervenientes na reação de *PCR*) constavam, para além dos *primers*, a enzima responsável pela polimerização, a Surf HOT Taq DNA *polimerase*, uma solução tampão e a solução salina de MgCl<sub>2</sub> (recomendadas pelo distribuidor do *kit* da Surf HOT Taq DNA, às concentrações requeridas para o ensaio) e os dNTPs. Seguiu-se o protocolo para preparação do pré-*mix* a usar na *PCR*.

#### 2.2.2.3.1 Procedimento Pré-PCR

Descongelaram-se todos os reagentes (alíquotas com volumes reduzidos) e à exceção da enzima Surf HOT Taq, agitaram-se em vortex seguido de uma rotação dos tubos na centrífuga Galaxy 16DH. De seguida adicionaram-se cada um dos reagentes mencionados nas **tabelas 2.5**, segundo a ordem e concentrações abaixo indicadas. No caso do pré-*mix* que usou Prep-Gem®, pipetaram-se 5 µL da solução resultante da extração, a qual contém o DNA.

**Tabela 2. 5** – Reagentes e respetivas concentrações (listados por ordem de adição) usados na preparação do pré-*mix* para a reação de *PCR* específica para IL.

Reagente (concentração <i>stock</i> )	Concentração final
H <sub>2</sub> O sem DNA/RNase	-
Tampão <i>PCR</i> (10x)	1,5 x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 mM
Surf HOT Taq <i>polymerase</i> (10 U/µL)	0,08 U
dNTPs (5 mM)	0,2 mM
<i>Primer FWD</i> (10 µM)	0,4 µM
<i>Primer REV</i> (10 µM)	0,4 µM

Uma vez que se preparam, no mínimo, duas reações – controlo positivo e negativo – com e sem DNA, respetivamente, o volume final de pré-*mix* deverá ser 25 µL, multiplicado pelo número de reações (N). O valor N é calculado através da soma do número total de amostras, do controlo negativo e de um valor estabelecido de “meia” reação, para compensar eventuais perdas de volume na passagem do tubo do pré-*mix* (1,5 mL) para o tubo de *PCR*. Terminada a mistura, agitou-se em vortex e submeteu-se o tubo da pré-*mix* a uma rotação, de forma a homogeneizá-la e daí retiraram-se 25 µL da mistura reacional para o tubo de *PCR* que continha o disco com o DNA previamente purificado. Este foi colocado no termociclador e deixado a incubar nas condições apresentadas na **tabela 2.6**.

**Tabela 2. 6** – Condições de temperatura, tempos e ciclos de repetição nas diferentes etapas da reação de *PCR* específica para IL.

Fase	Temperatura / °C	Tempo	Ciclos
<b><i>Desnaturação Inicial</i></b>	96	15 min	1X
<b><i>Desnaturação</i></b>	94	1 min	
<b><i>Annealing</i></b>	60	1 min	35X
<b><i>Extensão</i></b>	70	30 s	
<b><i>Extensão Final</i></b>	70	6 min	
<b><i>Arrefecimento Final</i></b>	4	Pausa	∞

#### 2.2.2.3.2 Procedimento Pós-*PCR*

Findo o programa de amplificação retiraram-se os tubos do termociclador, com os produtos de *PCR* (dsDNA) no seu interior. Antes de avançar para a validação da amplificação através da eletroforese em gel de agarose e, uma vez que os produtos *PCR* serão sequenciados, foi necessário efetuar-se uma purificação prévia. Este passo é essencial na medida em que se pretende que não haja contaminações à reação de sequenciação, em função da presença de primers e dNTPs não consumidos na reação de *PCR*. Recorreu-se a um *kit* manipulado de limpeza pós-*PCR* – a ExoFAST (STAB-Vida Lda.), que fundamentalmente consiste na mistura individual da enzima exonuclease I, responsável pela degradação de ssDNA com a fosfatase alcalina, que hidrolisa os grupos fosfatos dos dNTPs, garantindo num só passo, uma limpeza eficiente sem que haja qualquer perda de material de partida, nomeadamente, de produto de *PCR*.

#### 2.2.2.4 Purificação do produto final pós-*PCR*

Para tubos de *PCR*, pipetou-se um determinado volume de produto de *PCR* e de “ExoFast”, na proporção de 2:1. Colocaram-se os tubos no termociclador, num programa com especificações adotadas e otimizadas pela empresa STAB-Vida Lda. (**tabela 2.7**):

**Tabela 2. 7** – Condições de temperatura e tempos de incubação para a ativação da enzima “ExoFAST” no âmbito da purificação dos produtos de *PCR*.

Temperatura / °C	Tempo / minutos
35	30
95	5
12	∞

#### **2.2.2.5 Controlo da amplificação por eletroforese em gel de agarose**

Preparou-se um gel de agarose 1,5% em tampão TAE (para gel de pequena dimensão: 0,75 g de agarose em 50 mL de TAE 1x), o qual foi aquecido no micro-ondas durante cerca de 2 minutos, de forma a garantir que toda a agarose é dissolvida. De seguida, deixou-se arrefecer um pouco (antes de se iniciar a solidificação) e adicionou-se 2% do volume total do gel de agente intercalante *GelRed* (à concentração de 10X). Montou-se o suporte para o gel, colocou-se o pente e verteu-se a solução de agarose e esperou-se à temperatura ambiente até que o gel estivesse totalmente solidificado.

Para visualizar o produto de *PCR*, transferiu-se para cada tubo de *PCR*, 1 µL de produto *PCR* e 3 µL de *Loading Dye* (1X), o qual confere densidade ao DNA. Esta mistura foi agitada em vortex, submetida a uma rotação para homogeneização para de seguida ser inserida nos poços do gel; assim como uma alíquota (1 µL) do marcador padrão de DNA *GeneRuler*<sup>TM</sup> 100 bp, usado como referência para o tamanho dos fragmentos amplificados obtidos. Correram-se os 4 µL de mistura no gel de agarose durante 30 minutos submetidos a um campo elétrico de 12,5 V/cm.

Após a corrida, o gel foi levado à câmara de luz ultravioleta para revelação das bandas e fotografia, estimando-se de forma aproximada o peso molecular do fragmento, por comparação com a também corada, marcador de peso molecular.

#### **2.2.2.6 Quantificação de ácidos nucleicos**

A concentração de dsDNA foi numa fase inicial estimada através do gel de agarose por interpolação dos dados respetivos do marcador de peso molecular *GeneRuler*<sup>TM</sup> 100 bp (em ng/µL) auxiliado pelo *software* gratuito *GelAnalyzer*. O *GelAnalyzer* carrega a imagem do gel e de seguida, compara a intensidade dos pixéis que deteta em cada banda com o marcador de DNA. Este marcador apresenta uma quantidade de ácidos nucleicos definida para cada banda, de acordo com a concentração usada. Por recurso a uma curva de calibração com a intensidade de pixel de cada banda foi então possível determinar a concentração de dsDNA em cada amostra.

Embora mais tarde, a concentração de dsDNA passou apenas a ser estimada de forma mais rigorosa, através da espectroscopia de UV-Vis. Assim, para a quantificação de ácidos nucleicos recorreu-se especificamente a um espetrofotómetro UV-Visível de microvolumes da tecnologia *Nanodrop*<sup>TM</sup>. O instrumento usado foi o modelo ND-1000 e para a sua utilização atenderam-se a alguns

aspectos gerais, entre os quais, o volume de amostra a usar, entre 1 – 2 µL; o limite de detecção de 2 e máximo de 3700 ng/µL e a alguns mais específicos, que se prendem com a natureza da amostra, nomeadamente o coeficiente de extinção do que se pretende quantificar.

Este instrumento quantifica o dsDNA (entre outros) de acordo com a lei de *Lambert-Beer*:

$$Abs = c l \varepsilon$$

onde *C* é a concentração de DNA em ng/µL, *Abs* a absorvância (neste caso a 260 nm, que corresponde ao máximo de absorção de UV do DNA),  $\varepsilon$  ao coeficiente de extinção (que para o dsDNA tem o valor de 50 ng/µL.cm<sup>-1</sup>) e *l* a altura da coluna criada no espectrofotómetro (que neste caso corresponde a 1 cm).

É importante atender aos valores de absorvância a 280 nm que correspondem ao pico de absorção de UV de proteínas, e a 230 nm, ao pico de absorção de UV de contaminantes orgânicos, respetivamente. Assim, a determinação do grau de pureza do DNA foi estimada através do coeficiente de absorvâncias 260/280 e 260/230 pode-se inferir quanto à pureza da amostra. Geralmente, utiliza-se como valor de referência de pureza de dsDNA 1,8, ou seja, considera-se que a amostra é pura quando  $Abs_{260} / Abs_{280} \sim 1,8$  e  $1,8 \geq Abs_{260} / Abs_{230} \geq 2,2$ .

Assim sendo, antes da medição propriamente dita procedeu-se à limpeza do local onde é colocada a amostra com água sem nucleases. Colocou-se 1,5 µL de água sem nucleases e considerou-se a mesma como o branco. Por fim, o mesmo volume de amostra foi pipetado para a superfície do sensor do espectrofotómetro e mediu-se a absorvância a 260 nm, efetuando-se a medição em triplicado.

### **2.2.2.7 Sequenciação de Sanger**

#### **2.2.2.7.1 Reação de sequenciação**

Para cada tubo, aliquotaram-se 1,5 µL de *Big Dye Terminator v3.1* diluído com tampão de sequenciação do *kit Cycle Sequencing* na razão de 1:16), 1 µL de *primer* (*FWD* ou *REV*, com sequência e concentração stock igual à usada no *PCR*), um determinado volume de DNA previamente purificado e água sem nucleases, para se obter as concentrações pretendidas, perfazendo um volume total de 10 µL. Após a adição de todos os intervenientes, submeteu-se cada tubo a uma agitação em vortex e uma rotação, colocando-se por fim, os tubos no termociclador no programa com características específicas para a reação de sequenciação de *Sanger*, de acordo com a **tabela 2.8**.

**Tabela 2. 8** – Condições de temperatura, tempos e ciclos de repetição nas diferentes etapas da reação de sequenciação de *Sanger*, especifica para a IL.

Temperatura / °C	Tempo	Ciclos
96	75 s	1X
96	10 s	
50	6 s	30X
60	4 min	
4	Pausa	∞

Depois da incubação, os tubos foram identificados e o seu conteúdo purificado em colunas de Sephadex. Recolheu-se o volume purificado e colocou-se no sequenciador *Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer*. Os resultados foram analisados recorrendo ao *software* gratuito *Finch-TV*. Este *software* não só permite visualizar o fluorograma correspondente à sequência completa ou segmentada, permite localizar a zona de interesse que contém o SNP e o seu genótipo, por introdução da sequência do *primer* (ou sequência complementar), como ainda estima um valor de fiabilidade (valor Q) para cada atribuição.

#### 2.2.2.7.2 Influência da concentração de dsDNA na sequenciação

Para a mesma amostra, cujo genótipo era previamente conhecido, testaram-se três concentrações, nomeadamente 50, 20, 10 e 5 ng/μL e para cada amostra procedeu-se à sequenciação na direção direta e em reverso, utilizando para isso os respetivos *primers*.

#### 2.2.2.8 Sequenciação de *Sanger* direta (aplicação de produtos *PCR* sem purificação)

Pretendeu-se otimizar todo o processo de genotipagem das amostras, reduzindo a quantidade de reagentes usados, tanto na reação de *PCR* assimétrico, como na de sequenciação, dispensando o passo de purificação do pós-*PCR*. Para o efeito, foram utilizados discos de cartões FTA cujo genótipo era conhecido, os quais continham apenas DNA, que foi purificado por intermédio de lavagens com o *FTA Purification Reagent* e água sem nucleases (procedimento descrito na **seção 2.2.2.1**)

##### 2.2.2.8.1 Otimização da concentração de cada *primer* na reação de *PCR* assimétrico

O procedimento é semelhante ao descrito na **seção 2.2.2.3.1**, à exceção da concentração de um dos *primers*; fez-se variar a concentração do *primer FWD* (0,08; 0,16; 0,24 e 0,32 μM), mantendo a concentração de *primer REV* constante. Em todos os ensaios, procedeu-se à reação de *PCR* assimétrico e à sua verificação por eletroforese em gel de agarose.

#### 2.2.2.8.2 Diminuição do volume final na reação de *PCR* assimétrico

Uma vez otimizada a concentração de *primers* usadas na reação de *PCR* pretendeu-se reduzir o volume final de reação, passando de 25  $\mu\text{L}$  para 10  $\mu\text{L}$ . O procedimento foi semelhante ao descrito na **seção 2.2.2.3.1**, à exceção, obviamente do volume final e da concentração de um dos *primers*, de acordo com a **tabela 2.9**. Para todos os ensaios, procedeu-se à reação de *PCR* assimétrico e à sua confirmação por eletroforese em gel de agarose.

**Tabela 2.9** – Reagentes e respetivas concentrações (listados por ordem de adição) usados na preparação do pré-*mix* utilizado no *PCR* assimétrico usando discos do cartão FTA, para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ .

Reagente (Concentração <i>stock</i> )	Concentração final
H <sub>2</sub> O sem DNA/RNase	-
Tampão <i>PCR</i> (10x)	1,5 x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 mM
HotTaq (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0,08 U
dNTPs (5 mM)	0,2 mM
Primer <i>FWD</i> (10 $\mu\text{M}$ )	0,24 $\mu\text{M}$
Primer <i>REV</i> (10 $\mu\text{M}$ )	0,4 $\mu\text{M}$

#### 2.2.2.8.3 Sequenciação de *Sanger*

Após a amplificação ser validada através do gel de agarose, os produtos de *PCR* resultantes da reação de *PCR* numa escala mais reduzida, foram então usados na reação de sequenciação, sem serem purificados e sem ser necessária a adição de *primers*. Assim, seguiu-se o procedimento descrito na **seção 2.2.2.7.1**, sendo os únicos intervenientes na reação, os produtos de *PCR* e o *BigDye Terminator v3.1* e água sem nucleases.

## 2.3 Resultados e Discussão

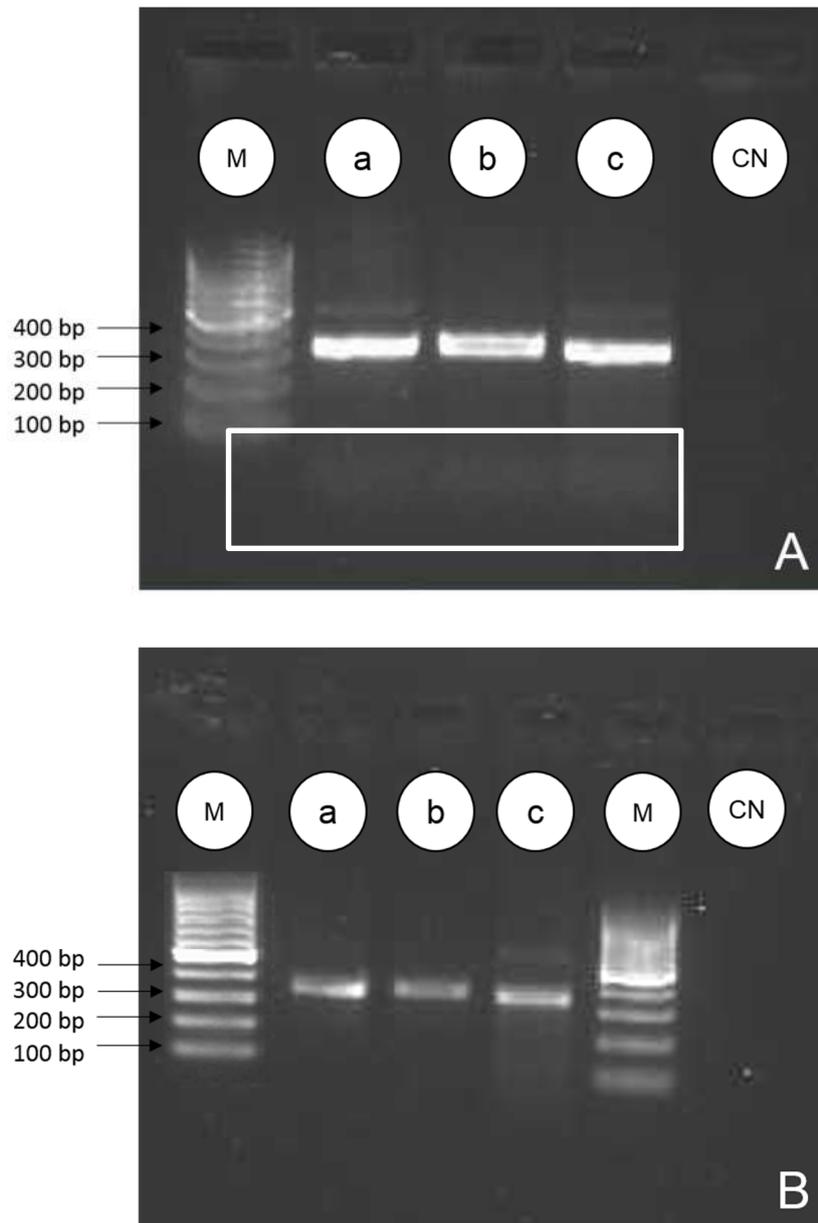
O principal objetivo neste capítulo foi otimizar-se as condições experimentais de alguns procedimentos envolvidos na genotipagem de amostras clínicas associadas à IL (SNP C/T -13910). Utilizaram-se amostras cujos genótipos eram previamente conhecidos e identificou-se através da sequenciação pelo método de *Sanger*, se um indivíduo é tolerante (TT), intolerante (CC) ou moderadamente intolerante à lactose (CT). Os procedimentos presentemente em vigor na empresa STAB-Vida Lda., envolvem mais do que um passo, nomeadamente, a extração do DNA da amostra, a amplificação da região de DNA do gene *MCM6* (**figura 2.1C**) que contém a variante genética em estudo, o SNP C/T -13910 (rs4988235) e sua purificação e só por fim a sequenciação de *Sanger*.

### 2.3.1 Verificação da amplificação por eletroforese em gel de agarose

Com o objetivo de verificar se a reação de *PCR* ocorreu com sucesso e se os produtos formados se encontravam puros para a reação de sequenciação, procederam-se a duas eletroforeses em gel de agarose. Teoricamente, através do gel de agarose em combinação com o desenho dos *primers* também é possível avaliar a especificidade do *PCR*, quanto ao peso molecular do produto de *PCR*.

Após a eletroforese os géis são revelados numa câmara de UVs, já que na sua preparação é adicionado um agente intercalante que atribui fluorescência aos fragmentos de DNA (302-312 nm), o *GelRed*, como se pode verificar através das bandas brancas de intensidade variável (marcador e produtos de *PCR*) da **figura 2.4**. As bandas unitárias que se observam em ambos os géis dizem respeito aos fragmentos de dsDNA formados (a, b e c na **figura 2.4A** e **2.4B**) e o seu tamanho será estimado por comparação com o tamanho das bandas de referência do marcador. Em ambas as figuras se constata que efetivamente a amplificação ocorreu sem contaminações para as três amostras, confirmada pelo controlo negativo, que na ausência de DNA não amplifica. Os fragmentos apresentam sensivelmente o mesmo peso molecular, uma vez que surgem todos posicionados na mesma região; e quando comparados com o marcador é possível prever que os mesmos rondarão aproximadamente os 350 bp (encontram-se entre a 3<sup>a</sup> e a 4<sup>a</sup> banda do marcador, entre 300 e 400 bp, respetivamente). Esta análise predominantemente qualitativa é também algo empírica, o que torna este valor pouco preciso. Para além da determinação rigorosa do seu número de pares de base ser insuficiente, a atribuição do genótipo não é possível, daí que se recorra à sequenciação.

Como mencionado anteriormente, ainda que todo o processo de amplificação decorra em condições otimizadas, pontualmente pôde observar-se na extremidade oposta ao poço, o aparecimento de bandas, ainda que ténues, de intensidade e pesos moleculares baixos (ver bandas assinaladas dentro dos retângulos da **figura 2.4A**). Essas bandas podem estar relacionadas com a formação de dímeros de *primers*. Esta situação pode ter ocorrido devido à presença de *primers* que finda a reação de amplificação, não foram consumidos na reação.



**Figura 2. 4 – A.** Gel de agarose após eletroforese e revelação em câmara de UVs com fragmentos de dsDNA resultantes da amplificação de amostras cujo genótipo era previamente conhecido: Poço **(a)** paciente intolerante; **(b)** paciente moderadamente intolerante; **(c)** paciente tolerante. Destaque atribuído aos possíveis *primers* não consumidos (retângulo branco) **B.** Gel de agarose com os mesmos fragmentos de dsDNA **a)**, **b)** e **c)** após purificação com a enzima “ExoFAST”. As bandas identificadas por **M** correspondem ao marcador molecular de 100 bp e **CN** ao controlo negativo. Condições: agarose a 1,5%; 30 minutos a 12,5 V/cm em TAE 1x.

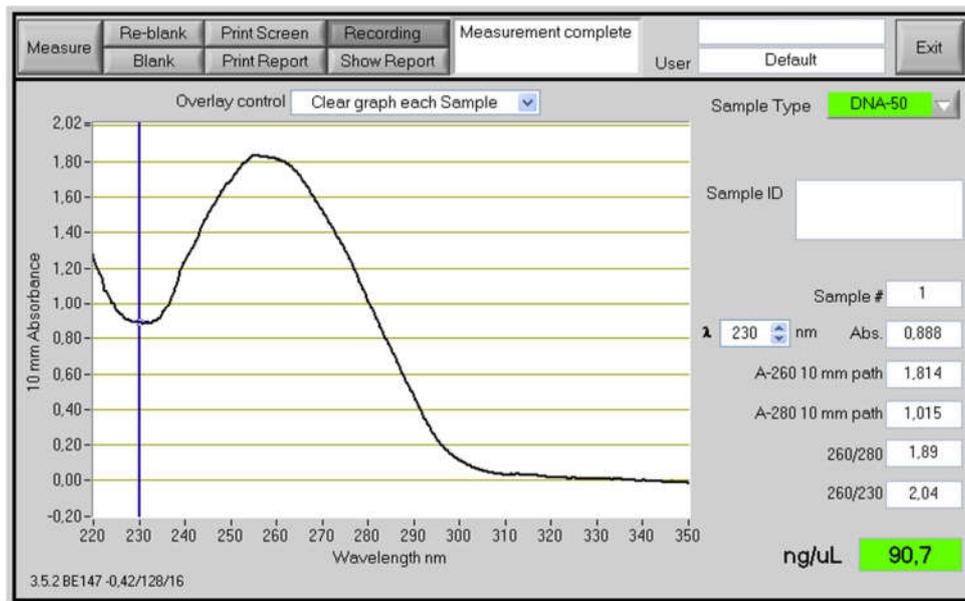
Para cada reação de sequenciação é usual colocar-se uma quantidade superior de um dos *primers* (desempenhando aqui o papel de sonda) e como um dos passos da incubação envolve a desnaturação da amostra, esta deve ser sequenciada na forma o mais pura possível, no sentido de evitar reações laterais com *primers* não consumidos provenientes do *PCR*. A importância da purificação com a “ExoFAST” prende-se ao facto de esta solução enzimática ser responsável por degradar e

eliminar fragmentos não específicos, sem que haja perda de amostra. Estruturas secundárias como dímeros e/ou vestígios de dNTP (destaques retangulares na **figura 2.5A**) podem inibir a sequenciação por competirem com os produtos de *PCR*, mascarando resultados e diminuindo a intensidade dos picos de fluorescência nos fluorogramas. Após a ativação e incubação da “ExoFAST” com os produtos de *PCR* correu-se um novo gel (**figura 2.5B**) e verificou-se a mistura enzimática degradou os *primers* ou dNTPs através do desaparecimento das bandas, estando a amostra de dsDNA pura e apta a ser sequenciada, com vista à identificação do respetivo genótipo.

### 2.3.2 Quantificação de ácidos nucleicos por Espectroscopia de UV-Vis

A quantificação de ácidos nucleicos, neste caso de dsDNA é fundamental para determinar qual a concentração ótima de produto de *PCR* para a aquisição de fluorogramas que conduzam à leitura e interpretação de resultados, de forma clara e inequívoca.

A técnica de espectroscopia de UV-Vis não só permite quantificar a amostra de dsDNA, como aferir quanto à sua pureza. O processo é significativamente facilitado através do uso do equipamento *Nanodrop*<sup>™</sup>, que mede automaticamente três valores de densidade ótica (*OD*) para comprimentos de onda distintos, 260, 230 e 280 nm. O valor de *OD*<sub>260</sub> é convertido a concentração molar por aplicação da Lei de *Lambert-Beer* atendendo à natureza da amostra, mais concretamente ao coeficiente de extinção molar do dsDNA (50 ng/μL.cm<sup>-1</sup>) e a amostra só é considerada pura quando o valor da razão de absorvâncias 260/230 é superior a 1,8 e 260/280 se situar entre 1,8 e 2,2. Esta técnica é, no entanto, pouco precisa uma vez que sobrestima a concentração efetiva de DNA. Dado que se procedeu a inúmeras quantificações ao longo do trabalho, selecionou-se um exemplo de medição da concentração de produto de *PCR* (345 bp). Depois da análise dos valores apresentados na **figura 2.5** pode concluir-se que, uma vez que as razões obtidas - 1,89 e 2,04 respetivamente, estão de acordo com os esperados para amostras puras, estas podem ser utilizadas na reação de sequenciação e/ou para outras aplicações.



**Figura 2. 5** – Captura da imagem da quantificação de ácidos nucleicos, do *software Nanodrop 1000* versão 3.8.1. Valores de uma medição da concentração de uma amostra de dsDNA e respetivas razões de absorvância.

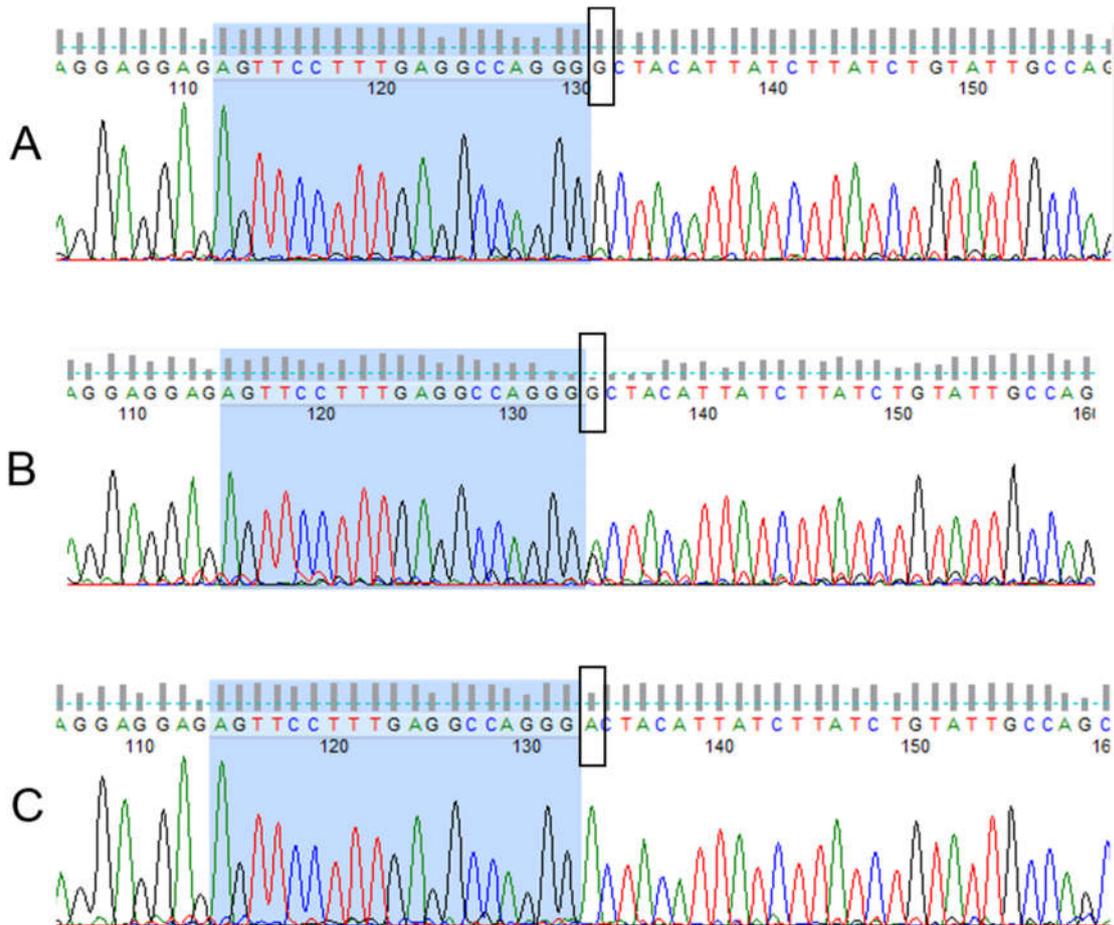
É de notar que após uma purificação com a “ExoFAST” o valor da concentração indicado pelo *Nanodrop* sofre consistentemente um decréscimo na ordem dos 20%, resultado de um possível fator de diluição. Este decréscimo deve-se ao facto, da leitura ser efetuada com um coeficiente de extinção molar característico de dsDNA, logo ao ocorrer a degradação da dupla cadeia, estas deixam de ser contabilizadas e detetadas como tal, pelo espectrofotómetro.

### 2.3.3 Sequenciação pelo método de *Sanger*

Depois de amplificadas, as cadeias que constituíam o produto de *PCR* foram marcadas através da inserção de quatro corantes fluorescentes que estão intercaladas com cada tipo de ddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP), por intermédio do *kit* de sequenciação *BigDye Terminator v3.1*. A reação de *Sanger* é efetuada com uma mistura de ddNTP na proporção de 1:4. Cada ddNTP emite luz a um determinado comprimento de onda, permitindo a identificação do nucleótido. A determinação da sequência dos produtos *PCR* foi realizada por eletroforese capilar.

#### 2.3.3.1 Análise dos produtos de *PCR* e atribuição dos genótipos

Os fluorogramas apresentados na **figura 2.6** dizem respeito aos três genótipos, intolerante – CC, moderadamente tolerante – CT e intolerante – TT, associados à variante genética responsável pela IL, a C/T -13910 (rs4988235).



**Figura 2.6** – Fluorogramas parciais de três amostras de produtos de *PCR* purificados, com genótipos diferentes: CC (A), CT (B) e TT (C), respectivamente. A faixa azul corresponde aos 19 nucleótidos que antecedem o SNP C/T -13910, evidenciado no retângulo.

A atribuição de bases a cada pico do fluorograma é completamente automática e não editável manualmente, a cada nucleótido é atribuído um valor “Q”. Este valor, também designado por *Phred quality score*, surge da equação estabelecida por Ewing *et al.*, sendo esta obtida a partir do logaritmo da probabilidade de erro,  $P(\text{erro})$ , ou seja, da atribuição da base estar incorreta <sup>16</sup>.

$$Q = -10 \log_{10} P(\text{erro})$$

Por sua vez, este valor irá variar consoante a fiabilidade do resultado e está diretamente relacionado com o tamanho das marcas cinzentas no topo de todos os fluorogramas. Isto significa quanto maior “Q”, maiores serão as marcas cinzentas. A **tabela 2.10** apresenta em termos numéricos, o rigor que está associado a cada valor de Q, permitindo assim avaliar a qualidade e veracidade da atribuição das bases pelo sequenciador.

**Tabela 2. 10** – Parâmetro de avaliação na atribuição de bases por um sequenciador, Q <sup>16</sup>.

Q	P(erro)	Rigor (%)
10	0,1	90
20	0,01	99
30	0,001	99,9
40	0,0001	99,99
50	0,00001	99,999

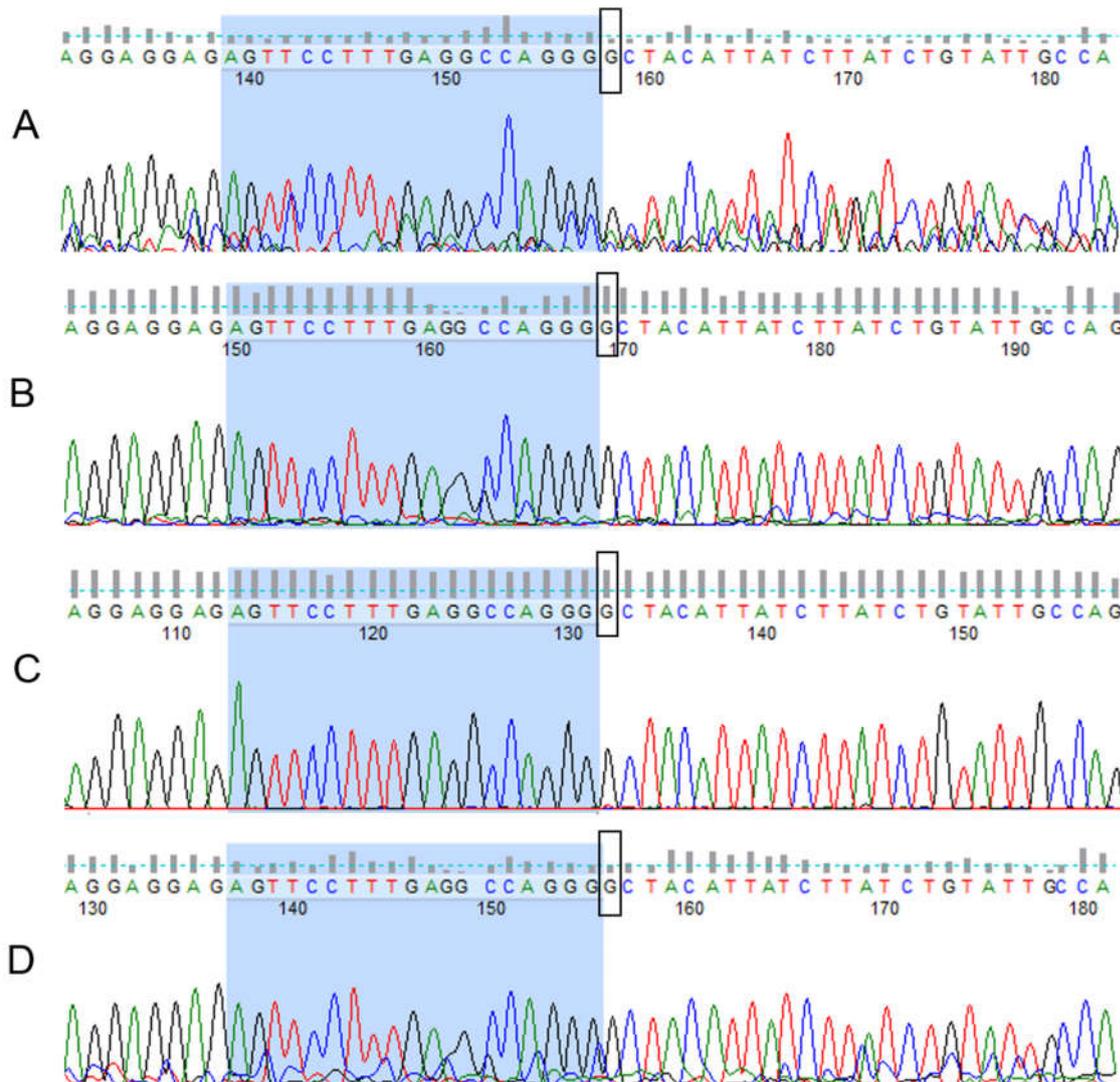
Para a atribuição dos genótipos aos fluorogramas apresentados, considerou-se uma sequência com cerca de 19 nucleótidos, que antecedem o SNP na posição -13910, a qual pode ser consultada na base de dados *Ensembl* e visualizada na zona azul dos fluorogramas da **figura 2.6**. A base que sucede a zona azul é a posição a atender, ou seja, a -13910. Nos fluorogramas a cada base azotada corresponde uma cor; à Guanina (G), Adenina (A), Citosina (C) e Timina (T) correspondem bandas pretas, verdes, azuis e vermelhas, respetivamente.

Ancestralmente, um individuo normal tem na posição -13910 uma C (C-13910), cujo fenótipo se caracteriza pela incapacidade de produzir lactase e conseqüentemente, não tolerar a lactose. Esta situação corresponde à apresentada no caso do fluorograma A da **figura 2.6**, sendo um caso de homozigotia CC, ou seja, ambos os alelos têm na posição -13910 uma C (que no fluorograma surge como a base complementar, ou seja, uma G). No caso do fluorograma B, na posição -13910 surge uma G, no entanto com uma intensidade muito baixa e com a presença concomitante de duas bandas (G e A), indicando um caso de heterozigotia, ou seja, num dos alelos está presente o polimorfismo, mas no outro não. Assume-se neste caso que há uma maior predisposição para manifestar um certo grau de IL, já que através da técnica em questão, deteta-se uma maior intensidade da banda da G e, portanto, uma maior probabilidade de ser intolerante. Em contrapartida, o que se verifica no caso do fluorograma C é que na posição -13910, em vez de a base ser uma G, visto ser a base complementar de C, observa-se uma A com um pico de intensidade moderadamente alto (marca cinzenta acima da linha a tracejado no topo do fluorograma) revelando que se está na presença de um polimorfismo. Neste caso, quando existe polimorfismo na posição -13910, o genótipo é CT e o individuo com esta informação no gene *MCM6* indica que tem a capacidade de regular o gene *LCT* e induzir a expressão de lactase.

### **2.3.3.2 Influência da concentração de dsDNA na sequenciação**

A concentração de dsDNA utilizada na reação de sequenciação variou entre as 5, 10 e 20 e 50 ng/μL. Geralmente a quantidade de dsDNA recomendada nos protocolos de sequenciação é de 50 ng/μL, contudo pretendeu-se testar com amostras puras, se seria possível reduzir as concentrações de dsDNA e obter o resultado pretendido, ou seja, o mesmo resultado para uma amostra cujo genótipo

era previamente conhecido (CC), sendo que os respectivos fluorogramas parciais podem ser consultados na **figura 2.7**.



**Figura 2. 7** – Fluorogramas parciais resultantes dos quatro ensaios com uma amostra *wild type* (CC) a diferentes concentrações de dsDNA utilizado na sequenciação: 50 ng/μL (**A**); 20 ng/μL (**B**); 10 ng/μL (**C**); 5 ng/μL (**D**). A faixa azul corresponde aos 19 nucleótidos que antecedem o SNP C/T -13910, evidenciado no retângulo. (Valores Q=19, Q=43, Q=41, Q=28 para as amostras A, B, C e D, respetivamente).

O resultado obtido em todos os fluorogramas, independentemente da concentração de dsDNA usada na sequenciação, correspondeu ao que era esperado, ou seja, a amostra cujo genótipo era CC foi identificada através do aparecimento, na posição -13910, da base azotada guanina (G). Embora o sequenciador tenha atribuído a cada amostra o genótipo certo, evidenciou através do valor Q, notórias diferenças em termos de rigor e qualidade na atribuição das bases.

A atribuição de baixos valores Q pelo sequenciador (Q=19) e o excesso de ruído presente no fluorograma A são aspetos comuns em leituras associadas a concentrações elevadas de dsDNA. O excesso de DNA (50 ng/μL) geralmente conduz ao entupimento dos filamentos do sequenciador,

despoletando uma maior dificuldade na atribuição de bases por parte deste. Simultaneamente para concentrações demasiado baixas de dsDNA, o sequenciador revela igualmente dificuldades na atribuição do genótipo, refletindo-se no valor Q (Q=28) considerado relativamente baixo. Esta situação possivelmente deve-se há presença insuficiente de amostra para se conseguir obter uma resposta consistente e um valor Q considerado razoável.

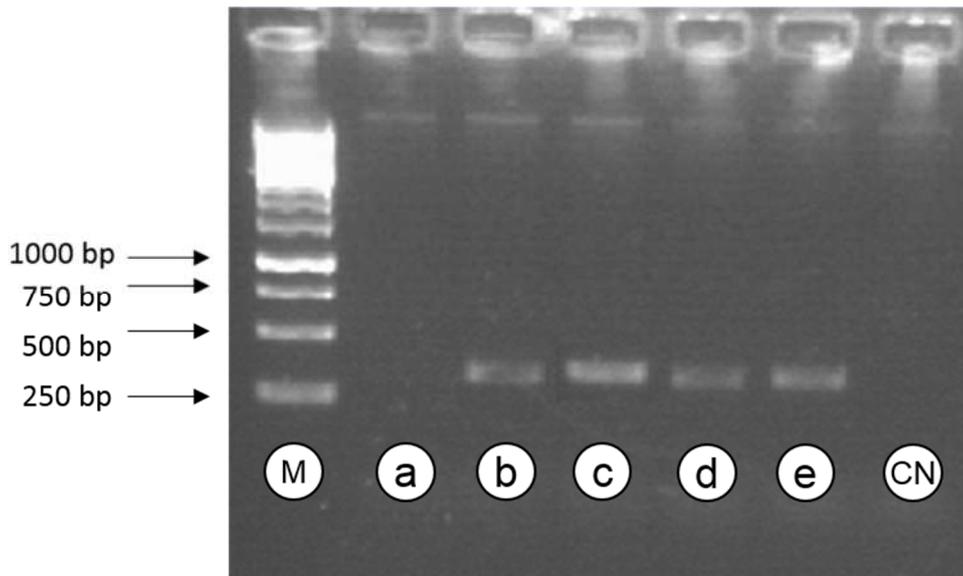
É essencialmente numa gama de concentrações intermédias (10-20 ng/ $\mu$ L) que os resultados se apresentaram mais fidedignos, sendo que o melhor resultado correspondeu a uma concentração de dsDNA na ordem dos 10 ng/ $\mu$ L. O seu fluorograma correspondente (C) evidenciou ausência total de ruído e um valor Q de 43. A partir desta otimização todas as restantes reações de sequenciação foram levadas a cabo com uma concentração de DNA de 10 ng/ $\mu$ L.

### **2.3.4 Sequenciação de Sanger direta**

Para que a sequenciação direta fosse exequível, as condições experimentais da reação de *PCR* tiveram que sofrer um ajuste, nomeadamente ao nível da concentração dos *primers* que era inicialmente colocada; pretendeu-se que um dos *primers* fosse totalmente consumido até ao termino da reação e o que restasse do outro, servisse de “sonda” para a reação de sequenciação, evitando assim, a habitual adição extra de *primer*.

#### **2.3.4.1 Supressão do passo da purificação para volume final de PCR de 25 $\mu$ L**

A tentativa de omitir o passo da purificação surgiu da análise de ensaios anteriores, designadamente de géis nos quais se podia visualizar em determinados casos, o aparecimento de uma banda extra, que estava relacionada dadas as suas características (menores pesos moleculares), à formação de dímeros de *primers*. Esta situação deveu-se ao facto de, no final da reação de *PCR*, ainda restar excesso de *primers* e estes reagirem entre si. Como tal, fez-se um estudo no qual se variou as proporções dos *primers FWD* e *REV* (fixando o *REV*) e procedeu-se à caracterização dos respetivos produtos de reação. Os resultados da reação de *PCR* assimétrico foram avaliados através da técnica de eletroforese em gel de agarose, apresentando-se o mesmo na **figura 2.8**.

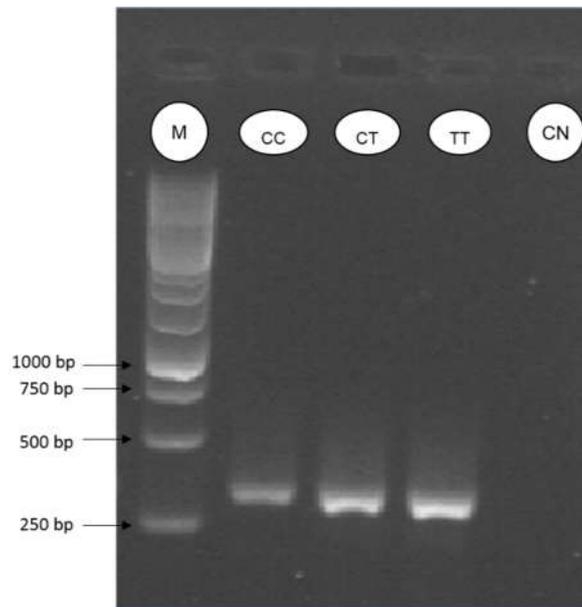


**Figura 2. 8** – Gel de agarose com fragmentos de dsDNA não purificados com diferentes concentrações de *primer FWD*: 0,08 (a) 0,16 (b) 0, 24 (c) 0,32  $\mu\text{M}$  (d) e concentração fixa de *REV* (0,4  $\mu\text{M}$ ), após eletroforese e revelação em câmara de UVs. *Condições*: agarose a 1,5%; 30 minutos a 12,5 V/cm em TAE 1x. O marcador (M) é o *GeneRuler™* 1 kb DNA Ladder.

Após a análise do gel de agarose concluiu-se que, praticamente em toda a gama de concentrações de *primer FWD* estudada, a amplificação de DNA ocorreu e os produtos de *PCR* formados apresentavam o mesmo peso molecular. A única exceção ocorreu à concentração mais baixa de *primer FWD* (0,08  $\mu\text{M}$ ), à qual não se assinalou a formação de nenhum fragmento de DNA, provavelmente por esta não ser suficiente para que a reação de amplificação desse início. Certificou-se também que não se formaram dímeros de *primers* em nenhum dos ensaios. Selecionou-se assim a concentração de *primer FWD* de 0,24  $\mu\text{M}$  (proporção *FWD:REV* de 1:2), visto que a banda se apresentava mais intensa do que a qualquer das outras concentrações de DNA e os resultados de sequenciação foram mais promissores.

#### **2.3.4.2 Diminuição do volume final na reação de *PCR* assimétrico**

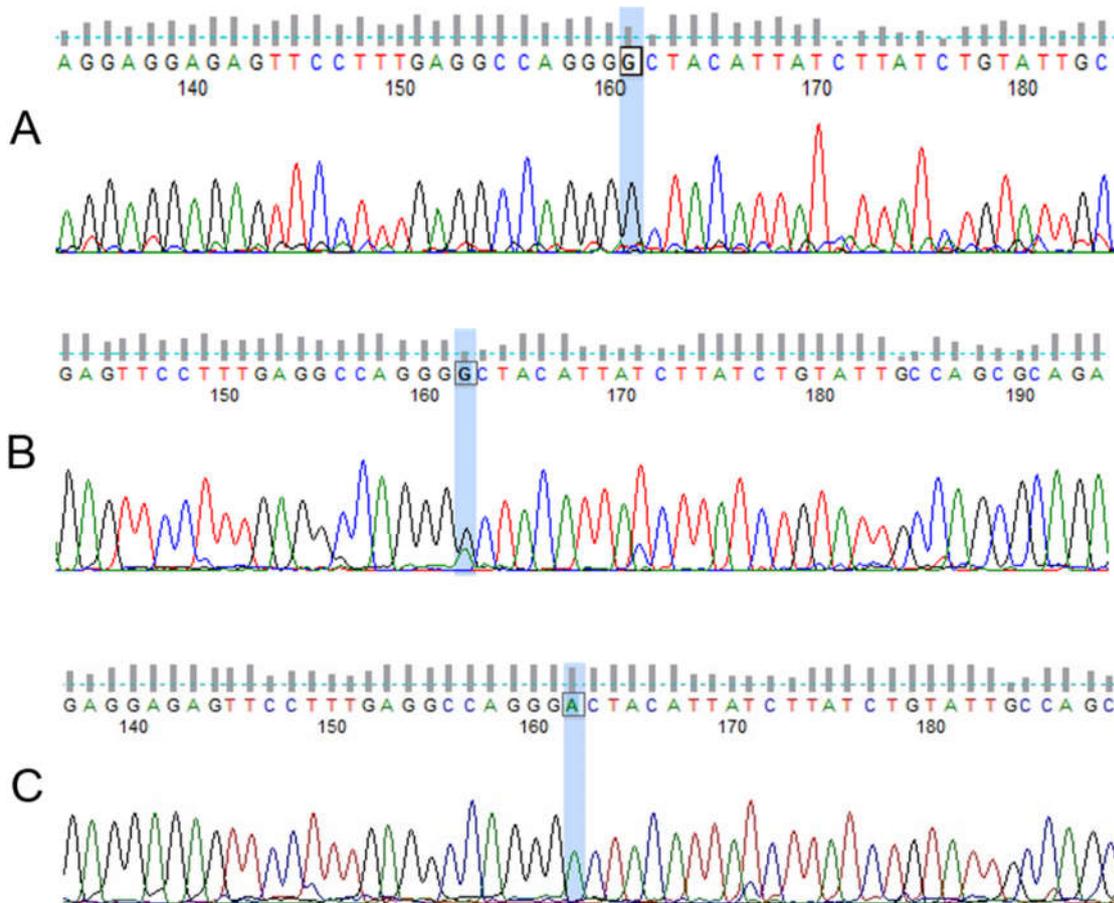
Os resultados apresentados na **figura 2.9** dizem respeito apenas à etapa final da otimização para a reação de *PCR*, nomeadamente para um volume final de 10  $\mu\text{L}$  (com as seguintes concentrações de *primers* finais: *FWD* = 0,24  $\mu\text{M}$  e *REV* = 0,4  $\mu\text{M}$ ), para a qual se selecionaram amostras relativas aos três genótipos CC, CT e TT.



**Figura 2.9** – Gel de agarose com produtos *PCR* não purificados, cujo genótipo é conhecido. No 2º poço (**CC**), no 3º (**CT**) e no 4º (**TT**), respectivamente, dsDNA provenientes da reação de *PCR* assimétrico, após eletroforese e revelação em câmara de UVs. *Condições*: agarose a 1,5% 30 minutos a 12,5 V/cm em TAE 1x. O marcador (**M**) é o *GeneRuler*<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder.

De acordo com os resultados de gel de agarose representados na **figura 2.9**, verifica-se que diminuindo a concentração de um dos *primers* (*FWD*), a amplificação do DNA é conseguida com sucesso, podendo verificar-se a presença de uma banda correspondente a um fragmento com o tamanho pretendido, cerca de 345 bp. A formação de produtos secundários (fragmentos inespecíficos - dímeros) poderá eventualmente ocorrer, mas em muito menor escala, uma vez que um dos *primers* (*FWD*) é utilizado na sua totalidade no decorrer da amplificação, restando apenas o *primer REV*. Este aspeto é fundamental na medida em que se consegue evitar o passo da purificação da amostra amplificada e todo o *primer* que não foi utilizado na amplificação, será reutilizado na etapa seguinte, na reação sequenciação.

Para a validação destas alterações recorreu-se à sequenciação de *Sanger* dos fragmentos obtidos. Através dos fluorogramas parciais representados na **figura 2.10** verificou-se que a reação de sequenciação ocorre, permitindo a identificação de todos os genótipos, de acordo com o esperado.



**Figura 2. 10** – Fluorogramas parciais de três amostras de produtos de *PCR* não purificados, cujo volume final de *PCR* foi 10  $\mu$ L e os seus genótipos diferentes: CC (**A**), CT (**B**) e TT (**C**), respectivamente. A barra azul corresponde ao genótipo associado ao SNP C/T -13910. (Valores Q=37, Q=28, Q=42, para amostras A, B e C, respectivamente).

A reatribuição dos genótipos coincidiu com o esperado e embora alguns fluorogramas apresentassem algum ruído e o valor de Q não fosse tão alto quanto desejado, estes aspetos não foram considerados relevantes, uma vez que nas experiências subsequentes, a atribuição dos genótipos revelou ser sempre consistente. No entanto, para atribuições de genótipo cujo valor Q fosse inferior a 30, a repetição do ensaio com um pouco mais de dsDNA (20 ng/ $\mu$ L) na reação de sequenciação, solucionava o problema.

## 2.4 Conclusões e considerações finais

O processo de otimização do protocolo de sequenciação de *Sanger* para a determinação de genótipos relacionados com a intolerância à lactose em amostras clínicas, revelou que a conversão da reação de *PCR* convencional em *PCR* assimétrico foi uma excelente opção para a otimização global do protocolo, na medida em que foi possível eliminar por completo o passo da purificação dos fragmentos de dsDNA pós-*PCR*; a redução do volume de mistura reacional de 25  $\mu$ L para 10  $\mu$ L foi igualmente importante, já que se reduziu drasticamente (cerca de 60%) a quantidade de reagentes usados no *PCR*. Embora a concentração dos reagentes fosse a mesma, o volume final utilizado foi suficiente para que o *PCR* assimétrico ocorresse e se formassem fragmentos dsDNA. Pequenas amostras destes fragmentos de dsDNA, cujo perfil genético era conhecido, foram diretamente sequenciados sem que a identificação dos três genótipos associados ao SNP C/T-13910 ficasse comprometida.

Numa fase final, após a validação das alterações propostas, efetuou-se o levantamento dos custos e tempos despendidos em todos os procedimentos envolvidos na genotipagem de amostras de sangue ou saliva, antes e depois da sua implementação. Avaliaram-se também as vantagens introduzidas ao teste genético realizado no âmbito do *kit* Nutrigene, que o podem tornar mais competitivo em termos de mercado. Entre reagentes e material, verificou-se efetivamente, que as alterações introduzidas no protocolo vigente na rotina laboratorial da empresa resultaram numa diminuição de custos para STAB-Vida Lda. de cerca de 12%, traduzidos em 1€ por análise. Aliado aos custos, reduziu-se também o tempo despendido em cada análise; só o passo da purificação consumia cerca de 45 minutos, distribuídos pela preparação da amostra e a ativação da enzima ExoFAST no termociclador.

Assim, face ao protocolo anterior, as alterações implementadas tiveram um forte impacto em termos económicos para a empresa STAB-Vida Lda., fazendo com que o custo de cada análise para o teste de diagnóstico genético da IL se apresente mais competitivo no mercado.

Esta forma de diagnóstico permite estabelecer a relação entre os três genótipos do SNP C/T - 13910 (CC, CT e TT) e os possíveis fenótipos manifestados pelos indivíduos que disponibilizaram, de forma consentida, as suas amostras para a elaboração deste estudo.

Assim, prevê-se que nos casos de **homozigotia TT**, os indivíduos que apresentem T-13910 em ambos os alelos, sejam tolerantes à lactose. O mesmo é dizer que apresentam o fenótipo oposto à condição ancestral (tolerante), situação que lhes proporciona simultaneamente, a capacidade de ingerir e digerir convenientemente, elevadas quantidades de lactose sem manifestarem qualquer sintoma associados à IL. Tudo indica que o código genético (gene *LCT*) destes indivíduos foi alvo de pressão seletiva, já que se tornaram providos da capacidade de produzir lactase para degradar o dissacarídeo da lactose.

Há, porém, casos excepcionais de indivíduos que embora apresentem genótipo TT, o facto de possuírem alguma deficiência ou infecção ao nível da mucosa intestinal ou recorrerem regularmente ao uso de antibióticos que provoquem a destruição das células onde a lactase é produzida. Nestes casos é comum obterem-se diagnósticos complementares incompatíveis, pelo que são situações pontuais e o diagnóstico genético poderá até advertir o paciente de que poderá sofrer de um tipo de hipolactasia adquirida decorrente de alguma alteração ao nível da mucosa intestinal (parasitoses, fibrose cística, consumo de drogas ou álcool em excesso, etc.)

Quando se trata de **heterozigotia CT**, isto significa que o SNP C/T -13910 se encontra apenas num dos alelos. O indivíduo com este diagnóstico terá uma maior propensão a tolerar a lactose relativamente a um indivíduo homozigótico com genótipo CC. Será capaz de ao longo da sua vida produzir alguma lactase, que lhe permitirá ingerir moderadamente alimentos que contenham na sua composição lactose. Existem estudos funcionais que mostram uma relação muito direta entre a presença deste polimorfismo e a quantidade de mRNA/lactase produzidos<sup>17</sup>. Estes indivíduos são mais suscetíveis a desenvolver IL secundária a eventuais eventos associados à lesão da mucosa intestinal.

Quando não é identificado qualquer polimorfismo em nenhum dos alelos, em condições normais, o indivíduo que apresente C-13910 é geneticamente intolerante à lactose, à semelhança do seu ancestral. Os indivíduos com que apresentem este perfil genético, produziu lactase apenas no seu período lactente, tendo deixado gradualmente de possuir a capacidade de a produzir em idade adulta. A relação entre os sintomas manifestados decorrentes da IL (avaliada através de testes complementares / genéticos) que tem vindo a ser descrita na literatura, revela ainda diversas incompatibilidades. Por exemplo, partindo do princípio que se estão a avaliar sintomas, descritos imediatamente após um consumo moderado de produtos lácteos, pode acontecer que a quantidade ingerida não seja suficiente para que os sintomas se façam sentir imediatamente, mesmo que o indivíduo apresente C-13910, isto é, seja intolerante. Isto porque, embora se observe um decréscimo da atividade da enzima, a expressão de lactase mantém-se, a um nível mais baixo e variável de pessoa para pessoa. Há também casos em que o indivíduo é geneticamente intolerante, nunca tenha manifestado sintomas, uma vez que apresenta na sua dieta, um consumo moderado e tolerável de laticínios. É igualmente importante considerar que a relação entre a presença do polimorfismo e os sintomas de IL não é sempre direta pois, por exemplo, uma criança mesmo que não apresente o polimorfismo (genótipo **CC** - intolerante) vai ter ainda a lactase muito ativa e, portanto, não vai manifestar sintomas de IL. É provável que existam outros fatores, tais como a idade e a etnia, mas o peso da existência de um polimorfismo é muito forte e por si só explica, de um modo geral, o fenótipo.

## 2.5 Referências Bibliográficas

1. Enattah, N. S.; Sahi, T.; Savilahti, E.; Terwilliger, J. D.; Peltonen, L.; Jarvela, I. *Nat Genet* **2002**, 30, (2), 233-237.
2. Troelsen, J. T. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2005**, 1723, (1-3), 19-32.
3. Sahi, T. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **1994**, 29, (sup202), 7-20.
4. Järvelä, I. E. *Ann Med* **2005**, 37.
5. Di Stefano, M.; Terulla, V.; Tana, P.; Mazzocchi, S.; Romero, E.; Corazza, G. R. *Digestive and Liver Disease* **2009**, 41, (7), 474-479.
6. Matthews, S. B.; Waud, J. P.; Roberts, A. G.; Campbell, A. K. *Postgraduate Medical Journal* **2005**, 81, (953), 167-173.
7. Itan, Y.; Jones, B. L.; Ingram, C. J.; Swallow, D. M.; Thomas, M. G. *BMC Evol Biol* **2010**, 10.
8. Harvey, C. B.; Fox, M. F.; Jeggo, P. A.; Mantei, N.; Povey, S.; Swallow, D. M. *Annals of Human Genetics* **1993**, 57, (3), 179-185.
9. Kruse, T. A.; Bolund, L.; Grzeschik, K. H.; Ropers, H. H.; Sjöström, H.; Norén, O.; Mantei, N.; Semenza, G. *FEBS Letters* **1988**, 240, (1-2), 123-126.
10. Harvey, C. B.; Yangxi, W.; Darmoul, D.; Phillips, A.; Mantei, N.; Swallow, D. M. *FEBS Letters* **1996**, 398, (2-3), 135-140.
11. Enattah, N. S.; Kuokkanen, M.; Forsblom, C.; Natah, S.; Oksanen, A.; Järvelä, I.; Peltonen, L.; Savilahti, E. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **2007**, 13, (25), 3508-3512.
12. Enattah, N. S.; Sahi, T.; Savilahti, E.; Terwilliger, J. D.; Peltonen, L.; Jarvela, I. *Nat Genet* **2002**, 30.
13. Integrated DNA Technologies, Inc. . <https://eu.idtdna.com/pages/support/technical-vault/faq/application/oligo-characteristics/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo->
14. Saiki, R.; Gelfand, D.; Stoffel, S.; Scharf, S.; Higuchi, R.; Horn, G.; Mullis, K.; Erlich, H. *Science* **1988**, 239, (4839), 487-491.
15. Bartlett, J. M. S.; Stirling, D., A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In *PCR Protocols*, Bartlett, J. M. S.; Stirling, D., Eds. Humana Press: Totowa, NJ, 2003; pp 3-6.
16. Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. C.; Green, P. *Genome Research* **1998**, 8, (3), 175-185.
17. Kuokkanen, M.; Enattah, N. S.; Oksanen, A.; Savilahti, E.; Orpana, A.; Järvelä, I. *Gut* **2003**, 52, (5), 647-652.



## Capítulo III.

Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com diferentes morfologias



### 3.1 Breve introdução ao capítulo

As AuNP continuam a ser altamente requisitadas quer para estudos fundamentais, como para aplicações tecnológicas, devido às potencialidades das suas propriedades físicas e químicas únicas, relativamente aos seus homólogos em massa (*bulk*). Um dos aspetos mais fascinantes nas AuNP são indiscutivelmente as suas propriedades óticas, que são preferencialmente aplicadas em biossensores. As AuNP possuem vantagens em relação às de outros metais, dado que demonstram ser altamente estáveis e biocompatíveis, não são citotóxicas, são quimicamente inertes e apresentam uma maior versatilidade na funcionalização da sua superfície <sup>1</sup>.

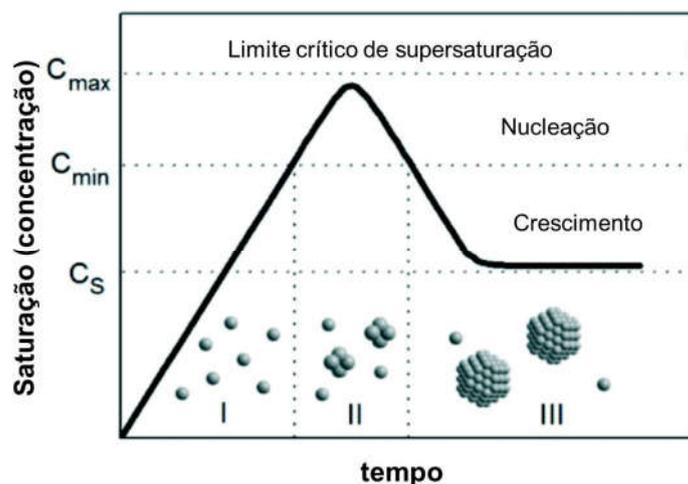
Existe uma enorme variedade de AuNP descritas na literatura, podendo estas ser classificadas de acordo com as suas características morfológicas, como esféricas ou não esféricas (*rods*, triângulos, cubos, estrelas, prismas). A obtenção destas AuNP e controlo das suas características depende sobretudo das técnicas de síntese empregues e das especificidades das mesmas.

São várias as técnicas de síntese capazes de criar AuNP com diferentes níveis de precisão, reprodutibilidade, rapidez e custo. Estas técnicas estão agrupadas em duas grandes categorias: *top-down* e *bottom-up*, que se distinguem pelo modo como abordam a produção das AuNP, física ou quimicamente. Enquanto as técnicas de *top-down* se baseiam na desintegração de material macroscópico até se obter a NP com a morfologia desejada (p. ex. por ablação por laser ou evaporação por vapor), as técnicas de *bottom up* baseiam-se na criação de AuNP, átomo por átomo, produzidas por reações químicas, eletroquímicas, térmicas ou fotoquímicas, que se depositam de forma organizada e formam estruturas bem definidas <sup>2</sup>.

#### 3.1.1 Síntese química de AuNP

O tipo de sínteses usadas nesta dissertação está inserido nas técnicas de "*bottom-up*", nas quais um sal de Au(III), que age como precursor, é decomposto ou reduzido para gerar átomos de ouro metálico (Au(0)), sendo estes a base estrutural para a formação da NP.

Prevê-se que antes da formação do ouro metálico, ou seja, da NP, ocorre a formação de núcleos cristalinos a partir do precursor. Embora o processo de nucleação ainda não esteja totalmente esclarecido, o modelo que reúne maior consenso é o modelo de LaMer <sup>3,4</sup>; foi proposto nos anos 50 e atualmente é ainda usado para explicar praticamente todas as reações de síntese química de AuNP. O diagrama que descreve este processo de produção de coloides monodispersos está representado na **figura 3.1**, baseando-se no conceito de separação da fase de nucleação da do crescimento.



**Figura 3. 1** – Diagrama representativo das diferentes fases de síntese de AuNP ao longo do tempo e a sua relação com a concentração atômica de precursor disponível. **Fase I** – Decomposição do precursor metálico – pré nucleação (Au(III)). **Fase II** – Formação de núcleos de cristalização/aglomerados. **Fase III** – crescimento da NP (Au(0)). Imagem adaptada da referência <sup>5</sup>.

O modelo propõe que a concentração de átomos disponíveis para a nucleação aumenta (fase I) à medida que o precursor é decomposto, por aplicação de calor por exemplo e, assim que a concentração dos átomos atinge a supersaturação, isto é, a concentração de nucleação mínima ( $C_{min}$ ), os átomos começam a agregar em pequenos núcleos (fase II) que vão crescendo de forma acelerada até se esgotar o precursor ( $C_{máx}$ ). Como forma de controlar o tamanho e a morfologia das partículas, recorre-se frequentemente a agentes de revestimento que se ligam à superfície das partículas (fase III), estabilizando-as e evitando a seu crescimento desmesurado, por aglomeração atômica (fusão de núcleos) <sup>6</sup>, atingindo assim um estado de equilíbrio ( $C_s$ ) entre os átomos superficiais da NP e os átomos em solução.

No caso de a reação principal ser a redução do ouro, o precursor encontra-se num estado de oxidação superior (Au(III)) em relação à espécie atômica (Au(0)). Nesse caso, dependendo do sistema em questão, pode ocorrer a redução do precursor metálico a átomos que depois formam os núcleos de cristalização ou existir primeiro a formação de aglomerados moleculares (*clusters*) contendo um número relativamente baixo de átomos do metal e ligandos existentes em solução <sup>6</sup>, ocorrendo posteriormente a redução e consequentemente a formação de NP <sup>7</sup>. O grau de dispersão de tamanhos de uma população de NP depende sobretudo do tempo de duração entre as fases de nucleação e crescimento <sup>8</sup>. Assim, quanto mais rápida e independente for a fase de nucleação em relação ao período de crescimento, mais monodispersa será a população, já todos os núcleos se formam quase simultaneamente e crescem a velocidades semelhantes, o que se traduz num crescimento homogêneo <sup>9,10</sup>.

Uma das maiores dificuldades experienciadas em síntese de NP prendem-se com aspetos relacionados com a estabilidade coloidal / agregação, o controlo do crescimento de cristal, morfologia, tamanho e a distribuição de tamanho. Todos estes fatores dependem do uso de um agente de

revestimento apropriado que, para além de ser o responsável por bloquear o crescimento, intervém na determinação da forma e tamanho e, principalmente, confere estabilidade à sua dispersão coloidal <sup>8</sup>.

De acordo com as metodologias aplicadas à síntese química de AuNP, estas podem dar origem a AuNP com características e propriedades distintas, ao mesmo tempo que a variação intrínseca de determinados parâmetros, tais como a concentração dos reagentes envolvidos, as condições reacionais e a natureza do solvente <sup>11-16</sup>, podem também eles ser capazes de gerar mais do que um tipo de AuNP com morfologia ou tamanhos diferentes.

### **3.1.1.1 Nanopartículas esféricas**

Dada a isotropia intrínseca das AuNP esféricas, estas apresentam-se como a forma mais estável termodinamicamente e, como tal, a mais fácil de obter. A síntese de Turkevich <sup>17</sup> surge como o método pioneiro de obtenção de nanopartículas de ouro esféricas, sendo até aos dias de hoje, um dos métodos mais utilizados. Neste método, usa-se H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> como precursor metálico e citrato de sódio, simultaneamente, como agente redutor e de revestimento, sendo que a sua função de agente redutor é ativada apenas a temperaturas elevadas. Desta síntese resultam AuNP com diâmetros compreendidos entre os 10 e os 20 nm. Embora se recorra sobretudo ao citrato <sup>18-20</sup>, podem ainda usar-se como promotores da reação de redução, aminoácidos <sup>21</sup> ou ácido ascórbico <sup>22</sup>. O tamanho das AuNP pode também ser controlado através do uso de outro tipo de agentes de revestimento/estabilização <sup>23</sup>.

Inicialmente, o método de Turkevich estava restringido à pequena gama de tamanhos de AuNP que gerava, contudo foram efetuadas algumas melhorias e atualizações ao método original, permitindo a obtenção de AuNP com maiores dimensões. Em 1973, Frens *et al.* <sup>24</sup> demonstraram que, variando a proporção entre o agente redutor e de revestimento, é possível obter AuNP com tamanhos específicos, que podem ir desde os 16 aos 147 nm <sup>25, 26</sup>. Mais tarde, a compreensão do papel que o pH, a temperatura do meio reacional e a concentração de citrato de sódio desempenhavam na reação permitiu propor um modelo de crescimento de partícula, que coincide em grande parte com o apresentado por LaMer <sup>27-29</sup>.

Mais recentemente, com base no mecanismo de LaMer e no fenómeno de maturação de Ostwald <sup>30</sup> foi reportado um novo método que permite o crescimento cineticamente controlado de AuNP esféricas, recorrendo ao crescimento sucessivo de AuNP que atuam, a cada etapa, como núcleos ou *seeds*. Geralmente os métodos baseados no crescimento mediado pela existência prévia de *seeds* promovem a formação de coloides com populações altamente monodispersas. O crescimento dá-se através da formação de camadas finas e homogéneas de ouro (Au(0)), resultante da redução de um precursor de ouro, auto-catalisada na superfície metálica das *seeds*. Por intermédio de adições suplementares de ouro em refluxo e a temperatura controlada, na presença de citrato de sódio em excesso é possível obter AuNP com diâmetros até 200 nm <sup>31</sup>.

Em contrapartida, para a produção de AuNP com tamanhos inferiores a 10 nm, a estratégia mais comum passa pelo uso de agentes redutores fortes, nomeadamente, de boro-hidreto de sódio <sup>32,33</sup> ou hidrazina <sup>34</sup> na presença de agentes de revestimento capazes de adsorver fortemente à superfície

da partícula, diminuindo a velocidade de difusão dos reagentes através dessa barreira de agente de revestimento e dificultando assim o crescimento de NP. As abordagens podem ser monofásicas ou bifásicas, como é o caso do chamado método de Brust<sup>35</sup>. Com base nestes sistemas bifásicos e no uso de solventes orgânicos, pode destacar-se a formação de pequenos *clusters* de ouro hidrófobos revestidos por fosfinas (1,4-1,5 nm)<sup>36</sup>, aminas (2,5-7 nm)<sup>37</sup> e alcanotióis (1-6 nm)<sup>38, 39</sup>. Do mesmo modo, o uso de agentes de revestimento hidrofílicos, tais como polietilenoglicol (PEG) (1,5-18 nm)<sup>40, 41</sup>, estabilizadores poliméricos (1,5-4 nm)<sup>42</sup>, tensoativos catiónicos (4-6 nm)<sup>43</sup> e outras moléculas funcionalizadas através de tióis (0,73; 2 nm)<sup>3, 44</sup> permitem igualmente a produção de AuNP neste regime de pequenos tamanhos<sup>45</sup>. Todavia, no final da síntese de AuNP com dimensões tão reduzidas, a sua superfície requer uma estabilização extra através de uma camada de tensoativo. No caso particular de sínteses aquosas, o protocolo mais comum é o relatado por Murphy *et al.* o qual gera AuNP com base na utilização de brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), numa gama de tamanhos compreendida entre 5 e 40 nm<sup>46, 47</sup>.

Uma interessante abordagem monofásica inserida no âmbito da Química Verde para a síntese de AuNP com 5-10 nm foi reportada por Quaresma *et. al*<sup>48</sup>. O método em questão descreve a formação fotocatalisada de AuNP à temperatura ambiente. A redução do precursor metálico dá-se a pH 7, por ação conjunta de um agente redutor fraco (trietanolamina) e de uma metaloporfirina de Sn(IV) fotossensível na presença de PVP.

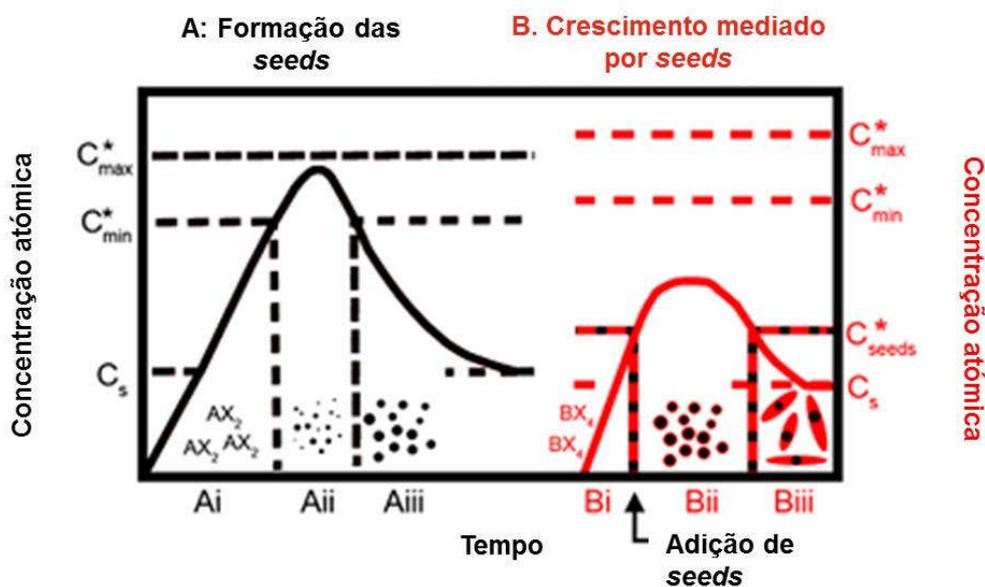
### **3.1.1.2 Nanopartículas não esféricas**

A metodologia adotada para a produção da grande maioria das AuNP com diferentes geometrias, cujos rendimentos são geralmente mais elevados é denominada por “crescimento mediado por *seeds*”<sup>5, 49-51</sup>. O princípio básico deste método consiste na síntese prévia de AuNP com dimensões reduzidas, através da redução do ouro com um agente redutor forte (p. ex. boro-hidreto de sódio). As *seeds* são, de seguida, adicionadas a uma solução de sal de ouro na presença de um agente redutor fraco (p. ex. ácido ascórbico) em condições experimentais em que este não é capaz de reduzir o precursor de ouro para formar novas *seeds*, mas em que é capaz de reduzir o precursor de ouro à superfície das *seeds* pré formadas, levando ao seu crescimento. Além disso é necessário um agente de revestimento que promova o crescimento anisotrópico das AuNP, sendo que os mais usados são o CTAB e o PVP<sup>52, 53</sup>.

A morfologia das nanoestruturas de ouro pode ser alterada através da variação da concentração de *seeds*, dos agentes redutores e dos agentes de revestimento. Embora o papel destes agentes de revestimento não seja ainda bem compreendido, pensa-se que o direcionamento do crescimento da estrutura em determinadas orientações preferidas está relacionado com uma maior afinidade do agente de revestimento por determinada faceta cristalográfica, atrasando o crescimento segundo a direção perpendicular a essa faceta cristalográfica<sup>54, 55</sup>.

O crescimento mediado por *seeds* em AuNP não esféricas é no fundo uma extensão do modelo de LaMer, uma vez que requer inicialmente da síntese de coloides monodispersos. O diagrama de

LaMer <sup>56</sup> da **figura 3.2A** ilustra a distribuição temporal ideal para a fase de nucleação (Aii) e de crescimento (Aiii) até à obtenção de AuNP isotrópicas monodispersas. No entanto, para a formação de AuNP não esféricas é essencial que a formação de *seeds* (representada por **A**) esteja temporalmente separada da etapa do crescimento (representado por **B**).



**Figura 3. 2** – Diagrama representativo das duas etapas que correspondem ao método denominado por “crescimento mediado por *seeds*” – **A.** formação de *seeds* e **B.** Crescimento mediado por *seeds*. Imagem adaptada da referência <sup>56</sup>

Para além da separação temporal é igualmente frequente a separação espacial em diferentes recipientes. Este aspeto permite uma maior eficácia na manipulação da cinética reacional envolvida no crescimento, o controlo da morfologia e ainda que o material que é reduzido e depositado na superfície da *seed*, seja diferente do que deu origem a esta.

Assim, de forma análoga ao diagrama de LaMer, os átomos podem ser gerados através da decomposição do precursor por diversas formas (uso de redutores, temperatura, etc.), no entanto, a concentração atômica idealmente deve permanecer abaixo do que é necessário para a nucleação autoinduzida (Bi). A adição de *seeds* (Bii) permite a nucleação do (segundo) material de crescimento apenas sob elas, o que requer uma menor concentração do que a necessária para a nucleação autoinduzida. No entanto, na prática a concentração atômica pode ser elevada ao ponto de se autoinduzir a formação de novas *seeds*, facto que contribui para um aumento da polidispersividade no final da síntese. Quando as *seeds* e o material de crescimento são os mesmos, torna-se impossível distinguir as *seeds* que são adicionadas intencionalmente e as que são formadas no seio da reação. O controlo e a manipulação das condições experimentais do crescimento podem prevenir esta situação através de pequenas alterações, dando lugar a um crescimento anisotrópico do material sobre as *seeds* previamente adicionadas (Biii) <sup>56</sup>. Os colóides de ouro com partículas não esféricas (p. ex.

nanotriângulos, nanocubos, nanoestrelas, *nanorods*) têm sido produzidos através da adaptação deste modelo, verificando-se que pequenas variações nas condições de crescimento podem determinar a morfologia das NP<sup>14</sup>.

Um dos primeiros protocolos descritos foi o da síntese de *nanorods*, cujo crescimento é mediado por *seeds* de ouro com cerca de 3,5 nm, estabilizadas por citrato<sup>46, 57, 58</sup>.

De forma generalizada, a razão dimensional entre AuNP não esféricas pode ser controlada através da quantidade e tamanho das *seeds* adicionadas, aditivos orgânicos, co-tensioativos<sup>58-60</sup> e do contra-íon halogeneto<sup>46, 54, 55, 57, 61, 62</sup>. Geralmente estas sínteses apresentam baixa seletividade de tamanho, dando origem a misturas de AuNP esféricas e AuNP com a forma pretendida, ou mesmo misturas de várias morfologias. O rendimento morfológico pode ser melhorado por ajuste das condições experimentais, nomeadamente através do pH e da temperatura<sup>58</sup>.

Mais tarde, desenvolveram-se outro tipo de métodos de síntese que não se baseiam na utilização de *seeds* preparadas separadamente<sup>63</sup>; em sistemas de microfluídica<sup>64-67</sup>, fotocataliticamente<sup>54, 55</sup>, etc. No âmbito desta dissertação recorreu-se à síntese de dois tipos de AuNP não esféricas - nanoestrelas (AuNS) e nanotriângulos (AuNT) - através de duas diferentes abordagens, ambas previamente reportadas na literatura por Liz Marzan *et al*<sup>53, 68</sup> e Miranda *et al*.<sup>55</sup>, respetivamente.

## 3.2 Metodologia Experimental

### 3.2.1 Materiais

#### 3.2.1.1 Equipamentos

- Balança analítica *Kern* ABS 120-4 ( $\pm 2 \times 10^{-5}$  g)
- Balança semi-analítica *Kern* EMB 600-2 ( $\pm 1 \times 10^{-2}$  g)
- Espectrofotômetro UV-Visível *Varian Cary 50 Bio*
- Microscópio de transmissão eletrônica *HITACHI H-8100*
- Microscópio de força atômica *Nano Scope 5.12*, dimensão 3100 (*Digital Instruments*)
- Centrífuga *SIGMA 2-16K* (Rotores *SIGMA: falcon 19776H; eppendorf 12154H*)
- Centrífuga *Eppendorf 5810R* (Rotores *Eppendorf: falcon F-34-6-38; eppendorf F-45-30-11*)
- Centrífuga com arrefecimento K3 (*Centurion Scientific*)
- Potenciômetro *Crison pH-meter BASIC 20+* com um elétrodo combinado de vidro *Crison (5208)*
- Grelhas de cobre revestidas com carbono (malha 200) - *C101/100 TAAB*
- Placa de agitação digital *Corning PC-420D*

#### 3.2.1.2 Reagentes químicos usados na preparação de soluções

Tabela 3. 1 – Reagentes químicos utilizados e respectivos distribuidores

Reagente	Distribuidores
Tetracloroeto e tosilato de <i>meso</i> -tetra-( <i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina de estanho (IV) ( <i>SntMepyP</i> )	Frontier Scientific, Inc.
Ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ); solução a 30% (p:p) em HCl, 99,99% puro	Sigma-Aldrich
Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB)	Sigma-Aldrich
Trietanolamina (TEA)	Fluka
Citrato de sódio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ )	Sigma-Aldrich
<i>N,N</i> -dimetilformamida (DMF)	Merck
Polivinilpirrolidona de peso molecular médio de 10 kDa (PVP K10)	Sigma-Aldrich
Etanol Absoluto	Carlo Erba

### 3.2.2 Procedimentos

#### SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNP)

Todo o material de vidro e agitadores magnéticos usados nos procedimentos que envolvem NP, tanto ao nível da síntese como do seu armazenamento foram devidamente lavados com uma solução de água-régia previamente preparada (NOTA. Esta solução é extremamente cáustica pelo que deve ser utilizada com extremo cuidado e usando material de proteção adequado) <sup>1</sup>. Após a colocação de todo o material imerso na solução por cerca de 10 minutos, passou-se abundantemente com água ultrapura (Milli-Q) e deixou-se o material secar. Este procedimento de lavagem do material é fundamental na medida em que impede a existência/criação de pontos de nucleação adicionais no material de vidro, nomeadamente devido a contaminações de ouro provenientes de sínteses anteriores, que durante a síntese podendo induzir agregação das NP.

##### 3.2.2.1 Síntese de nanopartículas de ouro de 15 nm (AuNP-15)

A síntese das AuNP-15 foi realizada através de uma adaptação ao método de redução do precursor de ouro por citrato de sódio, descrita inicialmente por Turkevich <sup>17</sup>, posteriormente otimizada <sup>20, 69</sup>.

Resumidamente, aqueceram-se até à ebulição 63 mL de solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) 1 mM num balão de 250 mL de fundo redondo, ligado a um condensador, em agitação vigorosa. Uma vez em refluxo, foram adicionados 6,25 mL de uma solução aquosa de citrato de sódio 38,8 mM e a mistura manteve-se em refluxo durante 15 minutos, com agitação vigorosa. Findo o tempo de reação, deixou-se a solução coloidal arrefecer até atingir a temperatura ambiente e armazenou-se no escuro até ser usada.

##### 3.2.2.2 Síntese de nanopartículas de ouro de 80 nm (AuNP-80)

As AuNP esféricas com dimensões de 80-90 nm de diâmetro foram sintetizadas de acordo com uma metodologia de crescimento sequencial que consiste no crescimento controlado e sucessivo de núcleos de crescimento (*seeds*) <sup>31</sup>. Este método envolveu numa fase inicial a síntese de AuNP-15 que, por sua vez, serviram de *seeds* para a formação de camadas de ouro com espessuras regulares, através da redução do metal à superfície da esfera.

Resumidamente, procedeu-se à síntese de *seeds* de 15 nm (AuNP-15) descrita na seção anterior **3.2.2.1** e logo de seguida, após os 15 minutos de reação a 100 °C, deixou-se a solução arrefecer até aos 90 °C, injetando-se imediatamente 1 mL de solução de citrato de sódio 60 mM e 1 mL de HAuCl<sub>4</sub> 25 mM. Deixou-se reagir 2 minutos a 90 °C, tendo-se colocado a solução de novo em refluxo por 30 min. Repetiram-se as adições sequenciais mais 8 vezes até se alcançar o tamanho pretendido.

---

<sup>1</sup> Água Régia - mistura de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e ácido clorídrico (HCl), na proporção de 1:3.

### 3.2.2.3 Síntese de nanoestrelas de ouro (AuNS)

O método adotado foi o descrito por Liz-Marzan *et al.*, no qual crescimento é mediado por *seeds*, ou seja, a formação das protuberâncias e o seu crescimento, dando origem às pontas das AuNS, está dependente da existência prévia de *seeds*, ou sejam, de núcleos esféricos<sup>53, 68, 70</sup>. Este método envolveu o uso de *seeds* de ouro revestidas com PVP (após a funcionalização as AuNP passaram a designar-se por Au-*seeds*), as quais foram adicionadas a uma solução H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (precursor metálico) em DMF (agente redutor) na presença de concentrações elevadas de PVP. O tamanho e o número médio de pontas formadas nas AuNS são dependentes da quantidade de Au-*seeds* que é adicionada à mistura reacional.

#### 3.2.2.3.1 Preparação das Au-*seeds* (AuNP funcionalizadas com PVP K10)

Numa primeira fase para a preparação das Au-*seeds*, sintetizaram-se AuNP-15 conforme o procedimento descrito na seção 3.2.2.1. De seguida, procedeu-se à sua funcionalização com PVP K10, através da adição de uma determinada quantidade de PVP, equivalente a aproximadamente 60 moléculas de polímero por nm<sup>2</sup> de área superficial de cada AuNP<sup>68</sup> (**equação 7 na seção A3-2 anexo III**).

Calculada a quantidade de PVP K10 a adicionar à solução de AuNP-15, procedeu-se à sua dissolução em 5 mL de H<sub>2</sub>O e adicionou-se, gota a gota, a solução preparada aos coloides de *seeds*, sob agitação vigorosa. Após duas horas em agitação vigorosa numa placa digital, deixou-se a funcionalização decorrer durante um período de cerca de 12 horas (durante a noite) em agitação moderada e T<sub>amb</sub>. Depois desse período, as Au-*seeds* foram centrifugadas a 8000 rpm durante 45 minutos; descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o resíduo em etanol absoluto. As Au-*seeds* foram colocadas no frio a cerca de 4 °C isoladas da luz.

#### 3.2.2.3.2 Formação das AuNS (crescimento das pontas)

Num gobelé dissolveram-se 1,5 g de PVP K10 em 15 mL de DMF em banho de ultrassons. De seguida, sob agitação vigorosa, adicionaram-se 82 µL de solução de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 50 mM; esperaram-se 2 minutos antes de se adicionarem as Au-*seeds* preparadas anteriormente e recém retiradas do frigorífico. Após a adição das Au-*seeds*, deixou-se a mistura reacional reagir por 2 horas, sob agitação vigorosa. Entretanto, reduziu-se a velocidade de agitação e ao abrigo da luz, durante a noite, garantiu-se que o crescimento das pontas findava. A caracterização decorreu após esse período.

Como mencionado anteriormente, a quantidade de Au-*seeds* a adicionar está dependente do tamanho e número de pontas médio que se pretende obter nas AuNS. Esta dependência traduz-se através do rácio [H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>]/[*seeds*], pelo que quanto menor, menor será o a distância ponta-a-ponta das AuNS, e vice-versa. O volume de Au-*seeds* foi calculado através da **equação 8** que se encontra na **seção A3-3 do anexo III**.

### 3.2.2.3.3 Lavagem das AuNS (troca de solventes e remoção de PVP em excesso)

A lavagem das AuNS foi efetuada por quatro ciclos de centrifugação/ressuspensão, dois deles relativos à mudança de solvente (DMF-etanol; etanol-água) e os outros dois, intermédios, para garantir que o excesso de PVP fosse removido. As condições de centrifugação apresentam-se na **tabela 3.2**.

**Tabela 3. 2** – Séries de lavagens por centrifugação das AuNS e respetivas condições

Lavagens	Rotações / rpm ( <i>Rotor falcons 19776H</i> )	Tempo / min
DMF > Etanol	11500	40
Etanol - Etanol	11500	40
Etanol > Água Milli-Q	11000	40
Água Milli-Q - Água Milli-Q	10000	40

Após cada centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi disperso em etanol absoluto filtrado (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> série) e em água Milli-Q nas restantes. A solução final foi colocada a 4 °C ao abrigo da luz.

### 3.2.2.3.4 Estimativa da concentração final de AuNS

Depois das lavagens, foi necessário efetuar uma estimativa da concentração e da área superficial das AuNS para se proceder a posteriores funcionalizações. Uma vez que se tratou de uma estimativa, foi necessário estabelecer duas premissas:

i) A reação de síntese de AuNS é completa. Isto significa que todo o ouro presente na solução reage exclusivamente à superfície das Au-seeds, não ocorrendo a formação colateral de novas NP. Assim, o número de AuNS em solução será igual ao número de Au-seeds adicionado.

ii) A redução do ouro é catalisada pela superfície das Au-seeds, formando-se protuberâncias mais ou menos pontiagudas, sendo que a quantidade de ouro é distribuída equitativamente pela superfície das NP.

Deste modo, assumiu-se que a concentração de AuNS em DMF é igual à concentração de Au-seeds adicionadas durante a síntese. Contudo, e embora seja incontornável o facto de durante as centrifugações ocorrer alguma perda de material, utilizou-se este pressuposto para calcular o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) a 400 nm das AuNS obtidas diretamente da síntese e determinou-se a concentração das soluções de AuNS após a centrifugação, por medição da absorvância a 400 nm. Considerou-se este comprimento de onda, pois é onde, no caso do ouro, a absorvância é essencialmente devido a transições interbanda<sup>71, 72</sup>.

De acordo com a segunda premissa, calculou-se a quantidade de ouro que se deposita em cada NP, correspondente às pontas, com base na razão entre  $n_{Au}$  total e  $n_{Au-seeds}$  adicionada. Sabendo a quantidade que de Au-seeds que se adicionou, a quantidade de ouro que cada AuNS tem é então

calculada através a quantidade de ouro total existente na solução, que se obtém atendendo à absorvância a 400 nm. Estes cálculos foram repetidos a cada centrifugação.

#### **3.2.2.4 Síntese de nanotriângulos de ouro (AuNT)**

Para a síntese de AuNT recorreu-se a um método de redução química controlado fotocataliticamente<sup>55</sup>. Este método tem a particularidade de ocorrer num só passo, ou seja, a nucleação e o crescimento ocorrem em simultâneo no mesmo meio reacional.

Para a obtenção de AuNT com as dimensões pretendidas, ou seja, arestas com cerca de 80-90 nm, é necessário, para além do precursor metálico de ouro (HAuCl<sub>4</sub>) e de um agente redutor, a utilização de um agente de revestimento específico e de um fotocatalisador que irá acelerar, ao mesmo tempo que controlará a reação de redução. Este catalisador é foto-ativado e face ao baixo poder do agente redutor, torna-se o intermediário preferencial na transferência de eletrões para o ouro(III) iniciador do processo de nucleação, conduzindo desta forma a um controlo mais preciso do tamanho e da morfologia dos triângulos obtidos. O crescimento das partículas ocorre pela via fotocatalítica e pela via de redução química direta pelo agente redutor à superfície das *seeds* formadas.

De forma sucinta, para um frasco de vidro adicionou-se 20 µL de uma solução de HAuCl<sub>4</sub> a 20 mM, 500 µL de TEA à concentração de 150 mM (solução preparada através da dissolução do TEA numa mistura de 1 M NH<sub>3</sub> e água – o pH da solução inicialmente alcalino teve de ser ajustado a pH 7, recorrendo-se a uma solução de 1 M de HCl). A mistura destes reagentes pela ordem indicada conduz ao desaparecimento da cor amarela, característica do sal de ouro, tornando-se após a adição do TEA, incolor, pelo que é necessário que a adição dos restantes reagentes seja rápida, de forma a não se dar início à reação sem que todos os intervenientes da reação estejam presentes. De seguida, 150 µL de uma solução de CTAB à concentração de 10 mM e 15 µL de uma solução de SntMepyP previamente preparada e aferida à concentração de 3.0 µM. A concentração desta metaloporfirina foi estimada por espectroscopia UV-Vis, na qual foram utilizados, de acordo com a literatura<sup>73</sup>, coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) das bandas Q, características deste tipo de porfirina. Por fim, 2535 µL de água Milli-Q foram adicionados de forma a perfazer um volume total de 3220 µL. A mistura reacional foi então irradiada por duas horas utilizando-se uma lâmpada de halogéneo, com uma potência de 100 W.

Depois de ser parada a irradiação, o frasco de vidro contendo a solução final foi colocado num compartimento às escuras e deixado em repouso por 12 horas. Este período de tempo irá garantir que a reação cessou por completo.

## CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As AuNP sintetizadas foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas presentes em laboratório, nomeadamente por espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-Vis), bem como por técnicas microscópicas, de transmissão eletrónica (TEM) e de força atómica (AFM).

### 3.2.2.6 Espectroscopia de UV-Vis

Os espectros de UV-Vis foram obtidos numa célula de quartzo com passo ótico de 1 cm na gama de comprimento de onda de 400-900 nm, usando como branco os solventes (Milli-Q, DMF e etanol). Os espectros das soluções de AuNP-5 e AuNT foram adquiridos sem qualquer diluição. No caso da solução de AuNP-15 e de AuNP-80 procedeu-se a uma diluição de 1:3 e na de AuNS, o fator de diluição foi de 1:6.

### 3.2.2.7 Microscopia de transmissão eletrónica (TEM)

As amostras de AuNP foram caracterizados por TEM através da deposição de uma gota (~10  $\mu$ L) de coloide numa grelha de cobre e uma fina camada de carbono "formvar" de 200 mesh da TAAB. A gota foi colocada na face com carbono e deixada evaporar. Dependendo da natureza dos agentes de revestimento usados nas sínteses, é aconselhada a "lavagem" posterior da grelha, com um volume de água equivalente ao da amostra. Tal é particularmente importante no caso dos AuNT, já que o agente de revestimento utilizado é o CTAB, um tensoativo catiónico que forma cristais facilmente por evaporação da solução, podendo criar artefactos na imagem de TEM. A análise e seleção das imagens foram efetuadas num microscópio eletrónico HITACHI H-8100 operado a 200 kV.<sup>2</sup> O tratamento das imagens e dimensionamento das AuNP foram realizados com recurso ao software gratuito *Image-J*<sup>74</sup>.

### 3.2.2.8 Dispersão Dinâmica de luz (apenas para as AuNP-15)

Transferiu-se para uma célula descartável apropriada para medições de tamanho hidrodinâmico (plástico, Malvern) 1 mL da solução coloidal de AuNP-15. Colocou-se a célula no compartimento do equipamento Zeta Sizer Nano ZS, e ajustou-se, para cada medição, o número de medições (triplicado) e a temperatura (25 °C).

### 3.2.2.8 Microscopia de Força Atómica (AFM)

Foram adquiridas imagens de AFM em substratos de vidro de borossilicato, apenas para as amostras de AuNT e AuNS, respetivamente. As análises de AFM foram efetuadas para confirmação da morfologia dos AuNT selecionados através da microscopia de campo escuro "darkfield" (conteúdos

---

<sup>2</sup> Operado pelo Doutor Pedro Quaresma; Equipamento da responsabilidade da Doutora Patrícia Carvalho, professora no Instituto Superior Técnico de Lisboa

abordados no **Capítulo 5**). A caracterização por AFM foi efetuada num equipamento *NanoScope* versão 5.12, *Dimension 3100*, em modo de contacto intermitente (*tapping mode*) com uma janela e velocidade de varrimento de 5  $\mu\text{m}$  e 0,2 Hz, respetivamente.

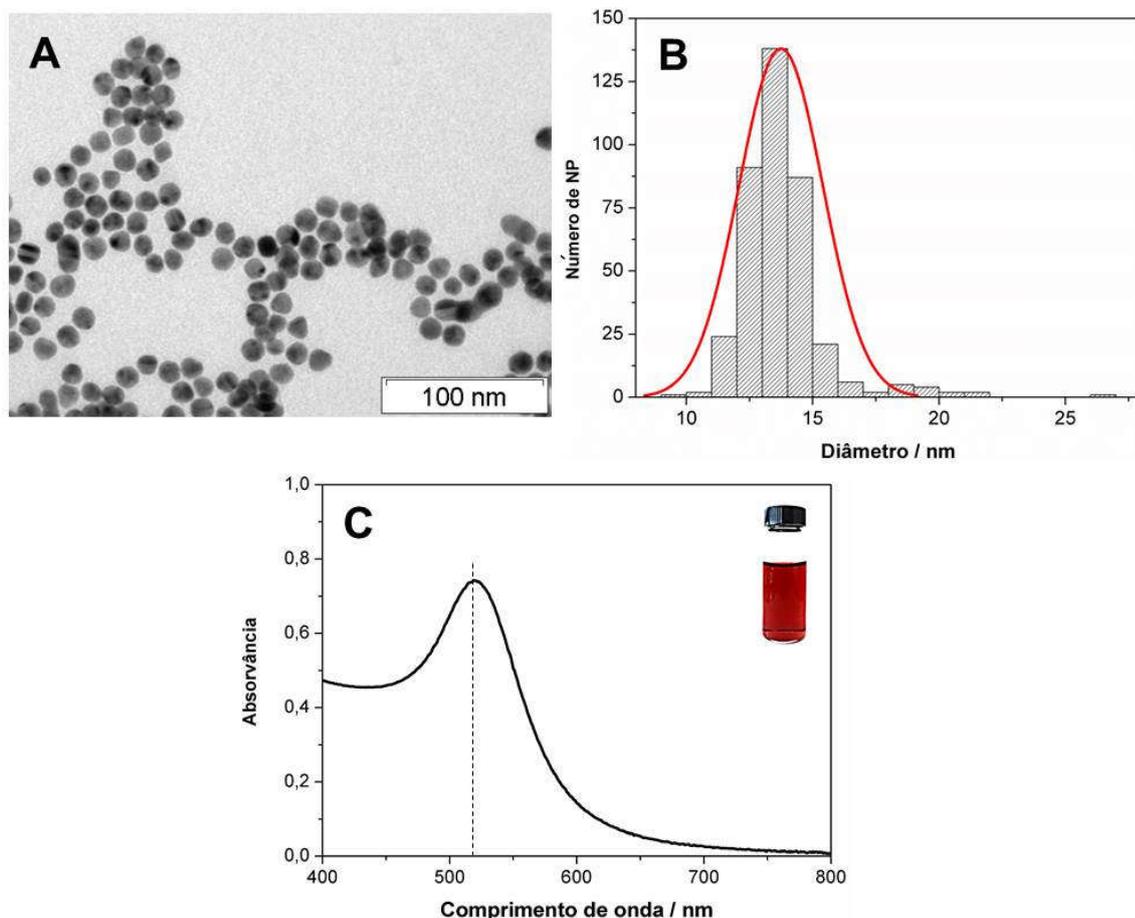
### **3.3 Resultados e Discussão**

Todas as AuNP sintetizadas neste trabalho foram usadas direta ou indiretamente como transdutores óticos em biossensores de DNA. As AuNP-15 foram indiretamente usadas, servindo de intermediário (*seeds*) na síntese de AuNS. Depois de formadas as pontas, as AuNS e todas as restantes nanopartículas (AuNT, AuNP-80 e AuNP-15, inclusive) foram usadas como transdutores óticos de biossensores. Independentemente da abordagem empregue na deteção, seja ela colorimétrica (em solução) ou por alteração individual do índice de refração (em *chip*), recorreram-se previamente a técnicas de caracterização espectroscópica e microscópica.

#### **3.3.1 Síntese e caracterização das AuNP sintetizadas**

##### **3.3.1.1 Nanoesferas de ouro de 15 nm (AuNP-15)**

A solução coloidal resultante da redução química do sal de ouro com citrato de sódio, na qual este desempenhou simultaneamente o papel de agente redutor e de revestimento, foi caracterizada por espectrofotometria de UV-Vis e por microscopia de transmissão eletrónica (TEM), como indicam as imagens da **figura 3.3**.



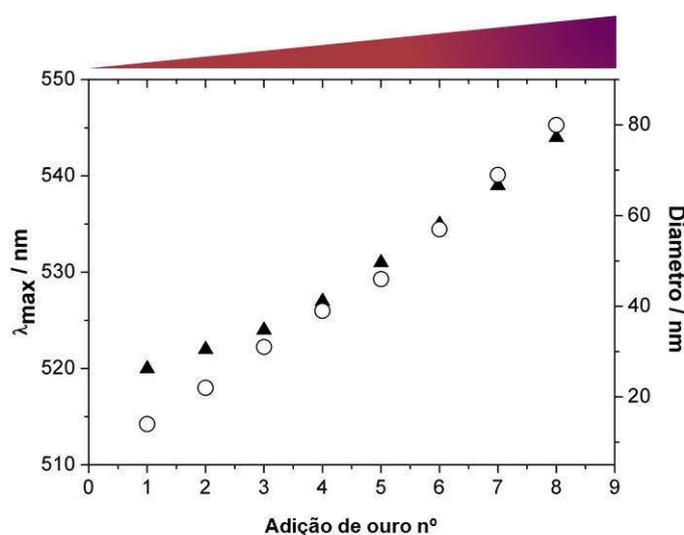
**Figura 3.3** – **A.** Imagem de TEM representativa de uma amostra de AuNP-15, revestida com iões citrato (barra de escala corresponde a 100 nm); **B.** Histograma de distribuição do diâmetro das AuNP-15 presentes na amostra (N=230 partículas); valor médio do diâmetro:  $14,7 \pm 1,7$  nm (desvio padrão da distribuição de tamanhos); **C.** Espectro visível de extinção da amostra de AuNP-15 em solução aquosa, com pico máximo centrado a  $\lambda = 520$  nm (fator de diluição de 3); no topo à direita, fotografia do coloide de AuNP-15 depois da síntese.

A solução resultante exibiu uma cor vermelho escuro, apresentando um máximo de comprimento de onda da banda de LSPR a cerca de 520 nm (**figura 3.3C**). A concentração do coloide e o tamanho das AuNP-15 foram estimados espectralmente, usando o método de Haiss *et al.* (ver **seção A3.1-1** do **anexo III**), baseado na teoria de Mie corrigida para o percurso livre médio e usando parâmetros adequados para nanopartículas de ouro esféricas, revestidas com citrato e com diâmetros médios entre 5-100 nm <sup>75</sup>. Neste método, o diâmetro médio é estimado com base na razão entre a absorvância máxima da banda plasmónica (SPR) e a absorvância a 400 nm, enquanto a concentração de nanopartículas é estimada a partir da absorvância a 400 nm e do diâmetro médio das partículas. A gama de concentrações obtidas situou-se geralmente entre os 8 - 11 nM e os diâmetros médios entre os 13 e os 15 nm. Estes valores foram corroborados pelos resultados de TEM ( $14,7 \pm 1,7$  nm) (histograma da **figura 3.3B**) e por DLS ( $17,1 \pm 2,7$  nm; desvio padrão correspondente às 3 medições efetuadas).

A estabilidade destas AuNP em solução aquosa é bastante razoável, no entanto com o aumento da força iónica e/ou a alteração pH para valores abaixo do  $pK_a$  do citrato, ocorre a destabilização do coloide. Esta destabilização leva as AuNP a aproximem-se, devido à redução de repulsões eletrostáticas e estas acabam por agregar.

### 3.3.1.2 Nanoesferas de ouro de 80 nm (AuNP-80)

A síntese de nanoesferas de ouro com um diâmetro médio de cerca de 80 nm foi efetuada por várias etapas de aumento progressivo do diâmetro das AuNP, partindo das AuNP-15, para a primeira etapa de crescimento, ou das AuNP obtidas na etapa anterior como seeds para o crescimento. As etapas de crescimento foram efetuadas por adição de precursor de ouro às seeds e refluxo a temperatura controlada (80 °C), dando origem à formação de finas camadas de ouro, em resultado da redução e deposição de átomos deste metal à superfície da NP <sup>31</sup>. Na **figuras 3.4** apresenta-se um diagrama ilustrativo do aumento do diâmetro médio e correspondente variação do comprimento de onda do máximo da SPR para cada uma das etapas de crescimento.

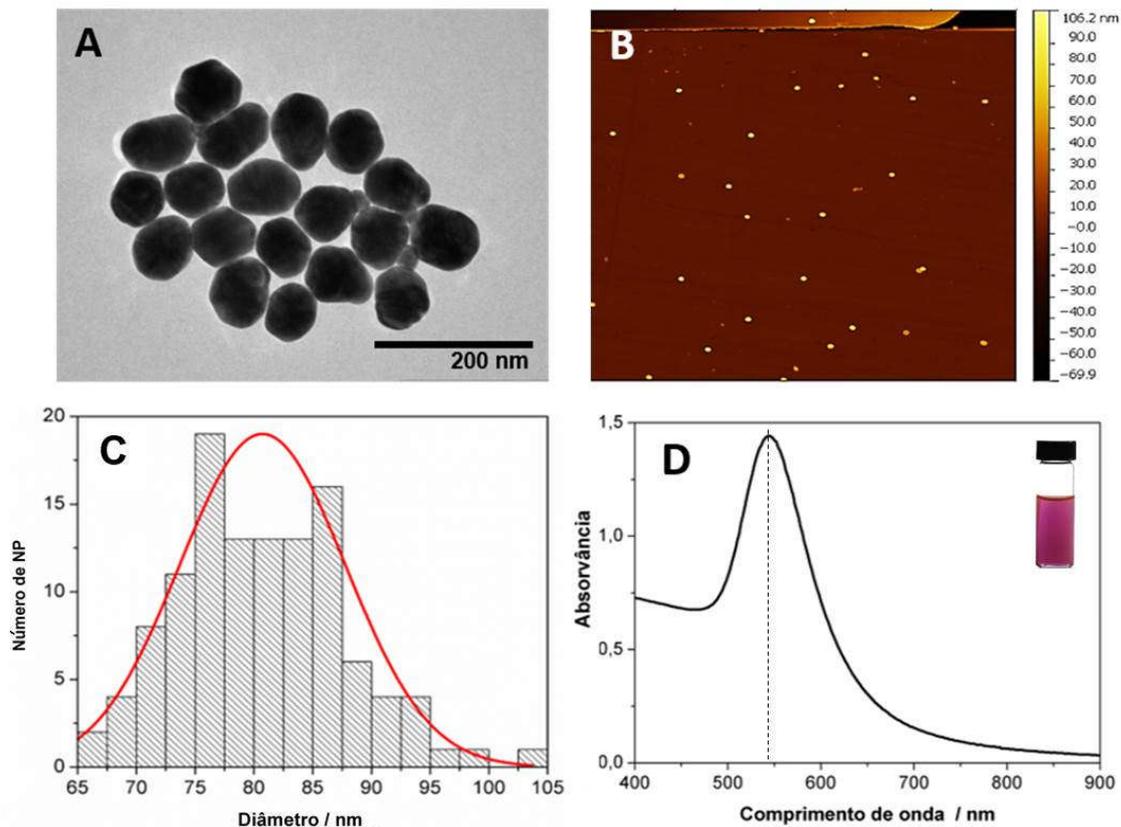


**Figura 3. 4** – Alterações do  $\lambda_{\text{máx}}$  da banda plasmónica (▲) e do diâmetro médio (○), calculado através do método de Haiss *et al.* <sup>282</sup> após cada etapa de crescimento na síntese de AuNP-80. No topo da figura representa-se esquematicamente a variação na cor da solução das AuNP com diferentes tamanhos obtidas a cada adição.

De acordo com o gráfico da **figura 3.4**, a cada adição de ouro, verificou-se que a banda plasmónica foi desviada para comprimentos de onda maiores desde 520 nm para as AuNP-15 iniciais até cerca de 545 nm para as AuNP-80, visível pela alteração da cor da solução (de vermelho para roxo). Esta alteração é consequência do aumento de volume das AuNP até estas atingirem as dimensões pretendidas. Embora Bastus *et al.* <sup>31</sup> apontassem que o raio aumentava de forma mais acentuada nas primeiras adições, a relação que se obteve entre o tamanho da AuNP e o número de

adições parece ser aproximadamente linear na gama de tamanhos considerada, sendo que em média, cada camada tem cerca de 8 nm de espessura.

A solução obtida tinha um aspeto turvo e cor castanha, devido à elevada dispersão de luz típica de partículas metálicas deste tamanho. Observadas em contra-luz apresentavam uma tonalidade roxa correspondente à banda LSPR, com um máximo de comprimento de onda a cerca de 545 nm (**figura 3.5C**). A caracterização por TEM mostrou AuNP esféricas cujos diâmetros entre os 70 e os 90 nm (histograma da **figura 3.5B**), sendo que o valor médio de aproximadamente 80 nm ( $80,7 \pm 7,1$  nm; desvio padrão da distribuição de tamanhos). Note-se que em nenhuma das imagens adquiridas desta amostra foram detetadas NP com tamanhos fora da gama de valores destacadas no histograma, demonstrando que a formação das camadas por deposição de ouro é efetivamente bastante homogénea. No âmbito da imobilização destas AuNP em substratos de vidro borossilicato, apresentou-se uma imagem de AFM que serve apenas como confirmação extra da média de tamanhos obtida para esta síntese, rondando precisamente os mesmos valores obtidos por TEM (70-90 nm). A estabilidade coloidal das AuNP-80 em solução aquosa é razoável, pelos mesmos motivos indicados para as AuNP-15 no entanto, atendendo às suas características, como são mais volumosas, são mais suscetíveis à agregação.



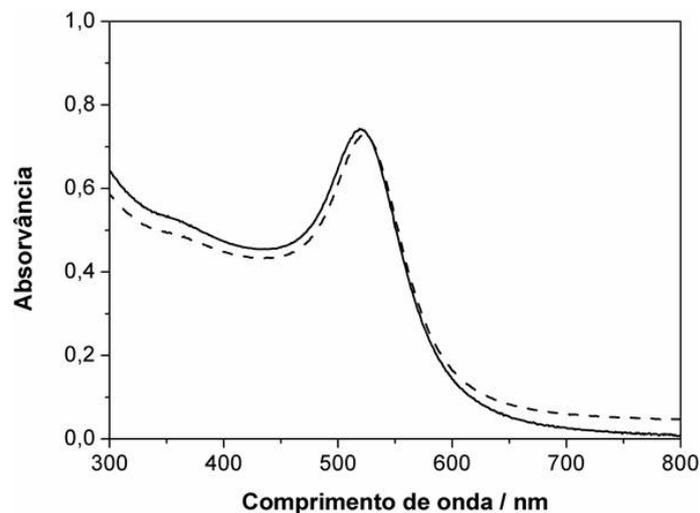
**Figura 3. 5 – A.** Imagem de TEM representativa de uma amostra de AuNP-80, revestida com citrato (barra de escala corresponde a 200 nm); **B.** Imagem de AFM (*tapping mode*) de uma zona selecionada da superfície de vidro onde são visíveis as AuNP-80; **C.** Histograma de distribuição do diâmetro das AuNP-80 nm obtido a partir das imagens de TEM (N=116 partículas); valor médio do diâmetro  $80,7 \pm 7,1$  nm; **D.** Espectro visível de extinção da amostra de AuNP-80 em solução aquosa, com pico máximo centrado a  $\lambda = 544$  nm (fator de diluição de 3); destaque do coloide de AuNP-80 depois da síntese.

### 3.3.1.3 Nanoestrelas de ouro (AuNS)

Como foi referido anteriormente, a formação de AuNS compreende duas etapas, a da síntese e funcionalização das AuNP que são usadas como núcleos de crescimento (*seeds*) e a do crescimento das pontas.

#### 3.3.1.3.1 Preparação das Au-seeds

Na primeira etapa funcionalizou-se o coloide de AuNP-15, previamente sintetizado (seção 3.3.1.1) com PVP K10. A funcionalização foi avaliada espectrofotometricamente, sendo que os respetivos espectros estão representados na **figura 3.6**.



**Figura 3. 6** – Espectros UV-Vis de extinção de uma amostra AuNP-15, antes (linha contínua) e depois da funcionalização com PVP K 10 (linha a tracejado). Depois de funcionalizadas passam a designar-se por *Au-seeds*.

Após a funcionalização dos coloides com PVP K10, verificou-se que ocorreu simultaneamente, uma ligeira diminuição na absorvância e um pequeno deslocamento da banda plasmónica. Estas diferenças estão certamente relacionadas com a troca do agente de revestimento, de citrato para PVP, resultado de uma alteração do índice de refração na vizinhança das AuNP. Esta troca foi validada por DLS, uma técnica que mede o diâmetro hidrodinâmico das AuNP. Face ao valor obtido para as AuNP revestidas com citrato ( $17,1 \pm 2,7$  nm) registou-se um aumento de 3 nm ( $19,7 \pm 2,4$  nm) após a funcionalização, pelo o valor da diferença possivelmente corresponde ao tamanho do de cada monómero de PVP. Este aumento do diâmetro era previsível, uma vez que o PVP é um polímero cujas dimensões são superiores ao da molécula de citrato.

#### 3.3.1.3.2 Formação das AuNS

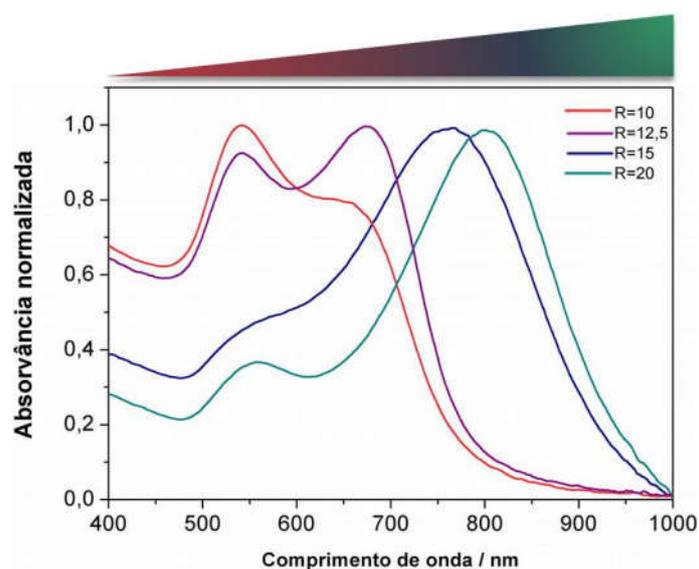
Antes de se ter dado início à síntese, de acordo com a aplicação proposta para estas AuNS, foi necessário atender a dois aspetos: **i)** as AuNS iriam usadas no desenvolvimento de um nanobiossensor de DNA, cujo método de deteção baseava-se em princípios colorimétricos (**Capítulo 4**), como tal estabeleceu-se que as AuNS a sintetizar deveriam absorver pouco além da região do visível, sensivelmente o correspondente ao alcance do espectrofotómetro, numa gama de comprimentos de onda entre 400 e 1000 nm. **ii)** as AuNS deveriam apresentar o maior número possível de pontas, de forma a maximizar a área superficial das NP (sensibilidade), relativamente às AuNP esféricas.

Barbosa *et al.* descreveram a relação que existe simultaneamente entre a morfologia e as propriedades óticas das AuNS, com a variação da razão entre a concentração de precursor de ouro  $[HAuCl_4]$  e a concentração de Au(0) presente nas *Au-seeds*,  $[Au-seeds]$ . Sendo que quanto menor for a razão, menor é a quantidade de ouro que se deposita por NP, logo as AuNS vão apresentar menor número de pontas e o tamanho das mesmas, será igualmente menor, e vice-versa. Assim sendo, na

segunda etapa foram criadas condições para que o ouro (Au(III)) presente em solução fosse reduzido na presença de PVP, a Au(0) pelo DMF e se depositasse à superfície das Au-seeds, dando origem a pequenas protuberâncias, que com o tempo crescem e formam as AuNS.

Com o intuito de se identificar qual o rácio que satisfazia as premissas iniciais, testaram-se quatro rácios  $[HAuCl_4]/[Au-seeds]$  ( $R=10$ ; 12,5; 15 e 20) sendo que todos os restantes parâmetros (reagentes e condições experimentais) se mantiveram constantes, nomeadamente, a quantidade de Au ( $[HAuCl_4]$ ), de PVP, de DMF, a temperatura a que se efetuou a síntese (25 °C) e a temperatura das Au-seeds (4 °C).

Na **figura 3.7** estão representados os espectros das soluções coloidais resultantes das sínteses de AuNS para os vários rácios  $[HAuCl_4]/[Au-seeds]$  estudados.



**Figura 3.7** – Espectros UV-Vis de extinção das amostras de AuNS dispersas em água, normalizados à unidade, para sínteses efetuadas com rácios  $[HAuCl_4]/[Au-seeds]$  diferentes ( $R= 10$ ; 12,5; 15; 20). No topo da figura representa-se esquematicamente a variação da cor da solução de AuNS obtidas com o aumento do rácio, desde rosa ( $R=10$ ) a verde ( $R=20$ ).

Após a síntese obtiveram-se quatro coloides com cores totalmente distintas, as quais correspondiam à cor do seu respetivo espectro da **figura 3.7** (rosa – roxo – azul e verde). Na gama de rácios estudados, os espectros apresentavam duas bandas plasmónicas intensas e largas, parcialmente sobrepostas, uma delas centrada a cerca de 550 nm (LSPR 1), correspondente à ressonância plasmónica do núcleo e a outra centrada no intervalo de 650-800 nm (LSPR 2), que corresponde à ressonância plasmónica das pontas das AuNS <sup>76</sup>. Os espectros foram normalizados à unidade para facilitar a análise e a identificação das AuNS cuja contribuição do núcleo prevalece em relação às pontas (e vice-versa), devido a efeitos de diluição decorrentes das lavagens. A diferença de absorvâncias entre a banda de maior comprimento de onda (LSPR2) e a banda a menor comprimento

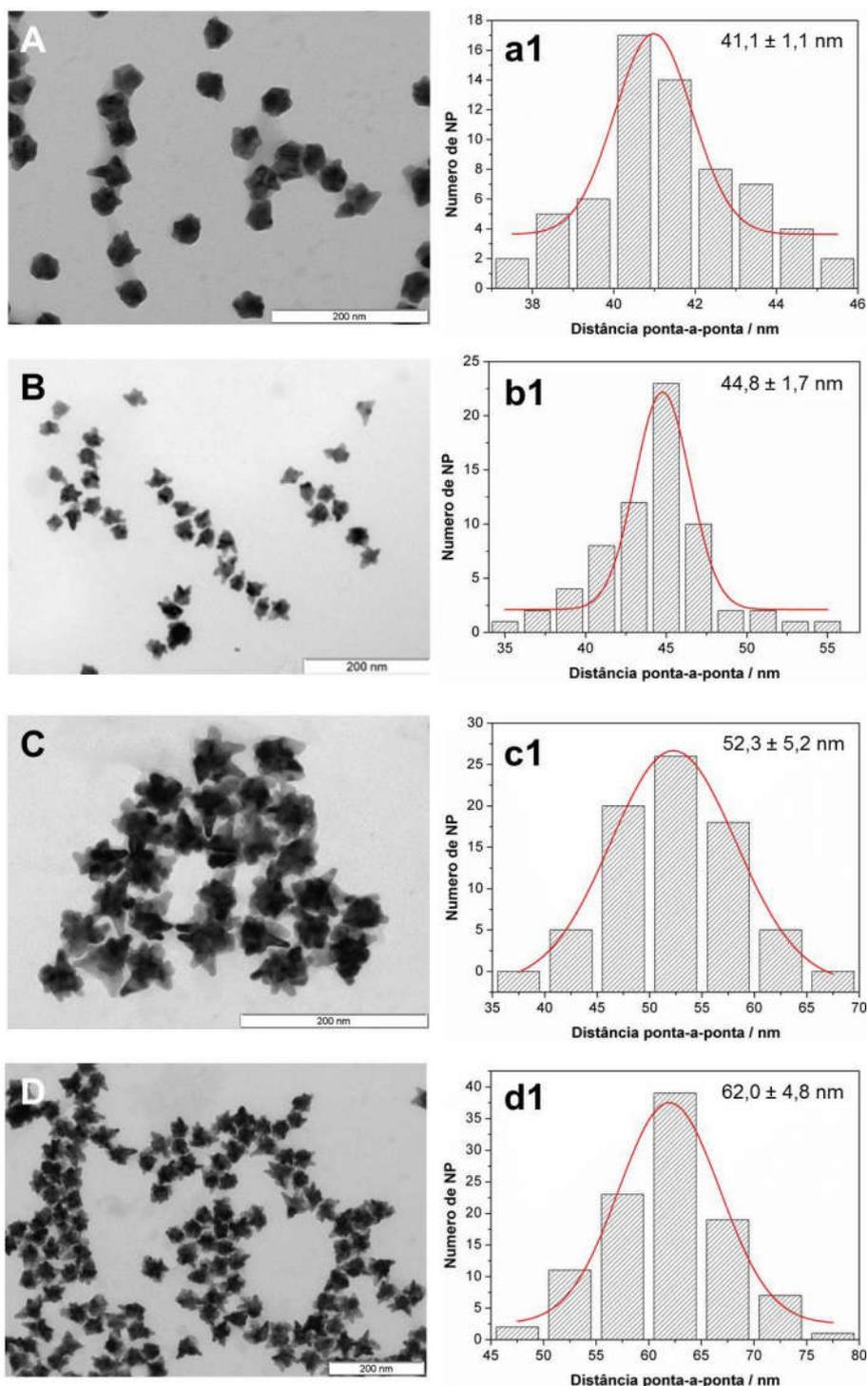
de onda (LSPR1) é assim visível em cada espectro, apresentando-se **tabela 3.3** os comprimentos de onda correspondentes a cada uma das LSPR e a razão de absorvância entre as duas.

**Tabela 3.3 – Posicionamento da banda transversal (LSPR1) e longitudinal (LSPR2).** Dados relativos à análise espectrofotométrica das soluções coloidais obtidas.

[HAuCl <sub>4</sub> ]/[Au-seeds]	$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$		$Abs_{\text{LSPR 2}} / Abs_{\text{LSPR 1}}$
	LSPR 1	LSPR 2	
10	541	655	1,21
12,5	542	666	1,23
15	556	763	1,30
20	561	801	1,43

Depois da análise detalhada dos espectros, denota-se um progressivo deslocamento da LSPR 2 para comprimentos de onda mais elevados, com o aumento do rácio. Isto deve-se, tal como esperado, ao facto de, para rácios superiores, existir uma maior quantidade de ouro por Au-seed, levando assim à formação de AuNS com maiores dimensões e/ou maior número de pontas. Visto que a LSPR 2 possui uma elevada contribuição relativa às pontas, o aumento do seu número e/ou crescimento, conduz a um desvio para o vermelho da banda plasmónica correspondente <sup>77</sup>. A intensidade relativa das bandas plasmónicas é também alterada através da alteração do rácio verificando-se um aumento significativo da intensidade da LSPR 2 e consequentemente, um aumento da razão das absorvâncias, para rácios mais elevados.

De maneira a verificar a morfologia das AuNS recorreu-se à análise por TEM das 4 amostras. Na **figura 3.8** apresentam-se as respetivas imagens, de acordo com o rácio [HAuCl<sub>4</sub>]/[Au-seeds] usado.



**Figura 3. 8** – Imagens de TEM representativas das amostras de AuNS em solução aquosa, resultantes da variação do rácio  $[HAuCl_4]/[Au-seeds]$ ,  $R= 10$  (A),  $12,5$  (B),  $15$  (C) e  $20$  (D) e respetivos histogramas de distribuição do comprimento máximo ponta a ponta das NS. Inclui-se também a média do comprimento e o desvio padrão (número de NP analisadas **a1**= 65; **b1**= 66; **c1**= 74, **d1**= 102). Todas as barras de escala correspondem a 200 nm.

Numa primeira análise constatou-se não só nas imagens da figura 3.8, como em todas as restantes que foram capturadas, que o método é efetivamente eficaz na “transformação” das Au-seeds em AuNS. A julgar pelos resultados de TEM, o rendimento desta etapa foi de 100%. Embora em

percentagens diferentes, em todas as imagens é visível a deposição de átomos de ouro à superfície das NP, aliás como indicavam os espetros, devido à presença de duas bandas plasmónicas. Entre AuNS da mesma amostra há uma relativa homogeneidade na dispersão de tamanhos (e número de pontas), no entanto, o mesmo não é observado entre amostras. As NP apresentam morfologias irregulares, variando entre a forma quase esférica a nanoestrelas bem definidas.

Após se observar detalhadamente, verifica-se que o número de pontas está, de facto, relacionado com o deslocamento das bandas plasmónicas. O aumento do rácio parece induzir a formação de um número crescente de pontas, ao mesmo tempo que promove o crescimento diferencial das partes que constituem a AuNS (núcleo e pontas).

**Tabela 3. 4** – Resumo dos dados relativos à análise das imagens de TEM

<b>Amostra (Rácio)</b>	<b>Comprimento médio / nm (distância ponta-a-ponta)</b>	<b>Nº de pontas</b>	<b>Diâmetro médio do núcleo / nm</b>	<b>Comprimento médio das pontas / nm</b>
<b>A (10)</b>	41,0 ± 1,1	1 (máximo)	38,1 ± 0,7	8,3 ± 0,8
<b>B (12,5)</b>	44,8 ± 1,7	2-3	38,9 ± 0,8	13,8 ± 3,6
<b>C (15)</b>	52,3 ± 4,8	5-6	40,5 ± 2,8	21,6 ± 5,0
<b>D (20)</b>	62,0 ± 5,2	mais de 6	41,2 ± 3,6	27,2 ± 8,1

Segundo Mazzucco *et al.*, as NP representadas nas imagens de TEM, de acordo com as suas características são designadas por esferoides (**A**), “*quasi-estrela*” (**B**) e nanoestrelas (**C** e **D**)<sup>78</sup>.

As esferoides, como o próprio nome indica assemelham-se a esferas, dada a inexistência de pontas definidas, observam-se apenas ligeiras protuberâncias na superfície da NP, como é o caso da amostra **A**. O diâmetro das NP esferoides é de sensivelmente 41 nm, dos quais cerca de 38 nm correspondem ao núcleo. A banda LSPR 2 (sobrepota) surge justamente em consequência da existência de um número reduzido de pontas mal definidas.

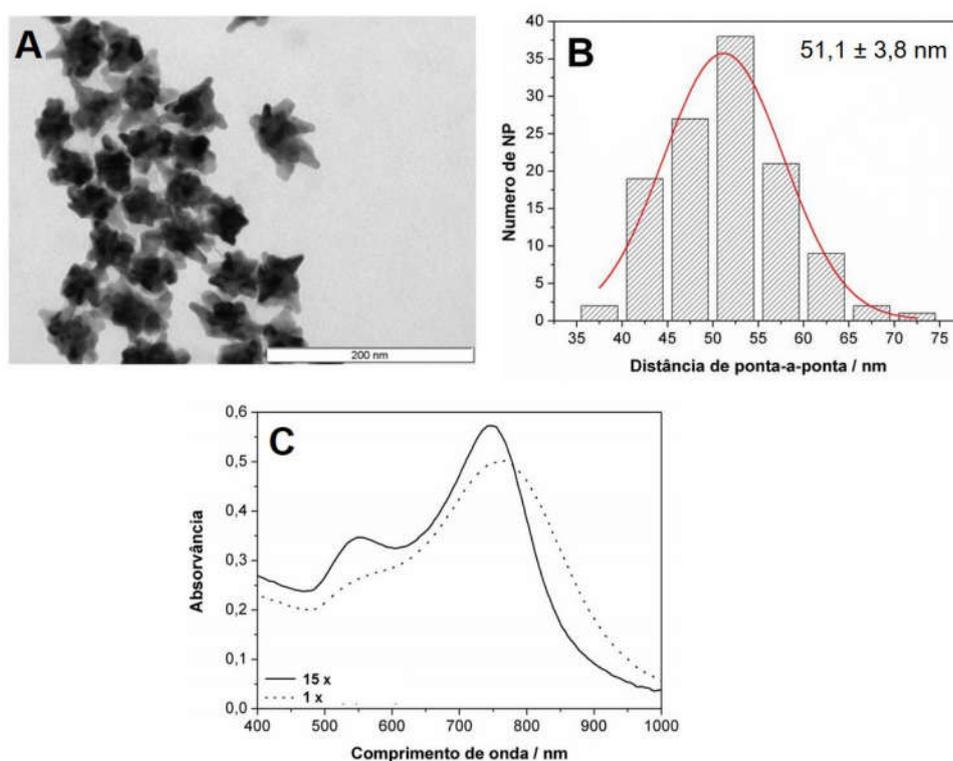
As *quasi-estrela* da imagem **B** apresentam um grau de complexidade maior, são visíveis cerca de três pontas que se projetam a partir do núcleo esférico. A alteração de rácios comparativamente à amostra anterior conduziu a um aumento do tamanho (45 nm), sem que este se manifestasse ao nível do núcleo (manteve-se nos 39 nm), mas sim a formação de pontas mais definidas e de maiores dimensões (13 nm). Estas informações vieram validar a informação proveniente dos espetros, sendo que a LSPR 1 das *quasi-estrelas* não sofreu deslocamento, ao contrário da LSPR 2 que não só desviou para o vermelho, como aumentou de intensidade relativamente à LSPR 1.

Em ambas as imagens **C** e **D**, verifica-se a existência de nanoestrelas bem definidas, nas quais o número de pontas era praticamente sempre igual ou superior a 5. Estas AuNS apresentam maiores dimensões, sendo que as maiores diferenças se registavam ao nível do tamanho médio das pontas, já que o diâmetro do núcleo aumentou menos de 1 nm. O número crescente de pontas foi então o

responsável pela indução de um desvio adicional para comprimentos de onda superiores, ao mesmo tempo que fez aumentar a razão entre as duas bandas, como indicavam os espectros da **figura 3.7**.

### 3.3.1.3.3 Aspectos relacionados com o aumento de escala e lavagens das AuNP

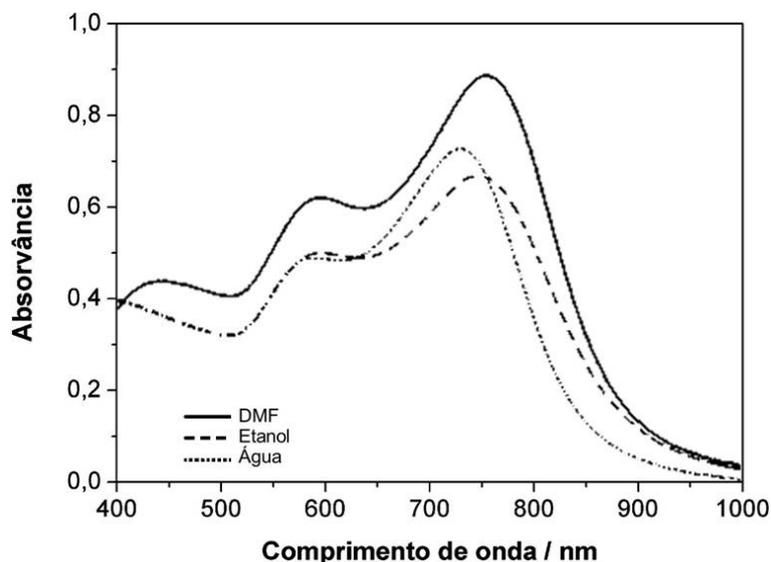
Com base nos pré-requisitos selecionou-se a solução de AuNS cujo rácio era 15 e procedeu-se ao aumento de escala da reação. Esta escolha baseou-se no facto de as AuNS apresentarem-se numa gama de comprimentos de onda que ainda permite deslocamentos de banda adicionais em processos de agregação. Aumentou-se o volume reacional 15 vezes (de cerca de 7 mL para cerca de 105 mL), sem alterações significativas no rendimento ou morfologia das AuNS, tal como se pode verificar na **figura 3.9**, onde se apresentam os espectros de UV/Vis das AuNS obtidas nas duas escalas reacionais e também uma imagem de TEM das AuNS obtidas.



**Figura 3.9 – (A)** Imagem de TEM da amostra de AuNS (R=15) dispersas em água após aumento de escala do volume reacional e respetivo histograma de distribuição do comprimento máximo ponta a ponta das NS com a média do comprimento e o desvio padrão  $51,1 \pm 3,8$  nm (117 NP analisadas). Barra de erro corresponde a 200 nm. **(C)** Espectros UV-Vis das amostras obtidas para volumes reacionais de 7 mL (**1x**) e 105 mL (**15x**).

Através dos espectros de UV-Vis verificou-se um estreitamento e aumento da intensidade da banda LSPR 2 e um pequeno deslocamento para o azul. Enquanto que a banda LSPR 1 sofreu um aumento de intensidade. Estas alterações possivelmente estão relacionadas com uma menor polidispersão de tamanhos (menor desvio padrão:  $3,8 < 4,8$  nm) e/ou melhor definição das pontas.

Para a utilização das AuNS em solução aquosa foi necessário proceder à sua lavagem para remoção do DMF e excesso de reagentes. A alteração de solventes, de DMF para água Milli-Q compreendeu mais do que uma lavagem por centrifugação, sendo que em cada uma delas, uma percentagem de amostra foi inevitavelmente perdida juntamente com o sobrenadante. Após cada alteração de solventes, caracterizou-se espectralmente a solução coloidal (ver **figura 3.10**) e determinou-se a sua concentração.



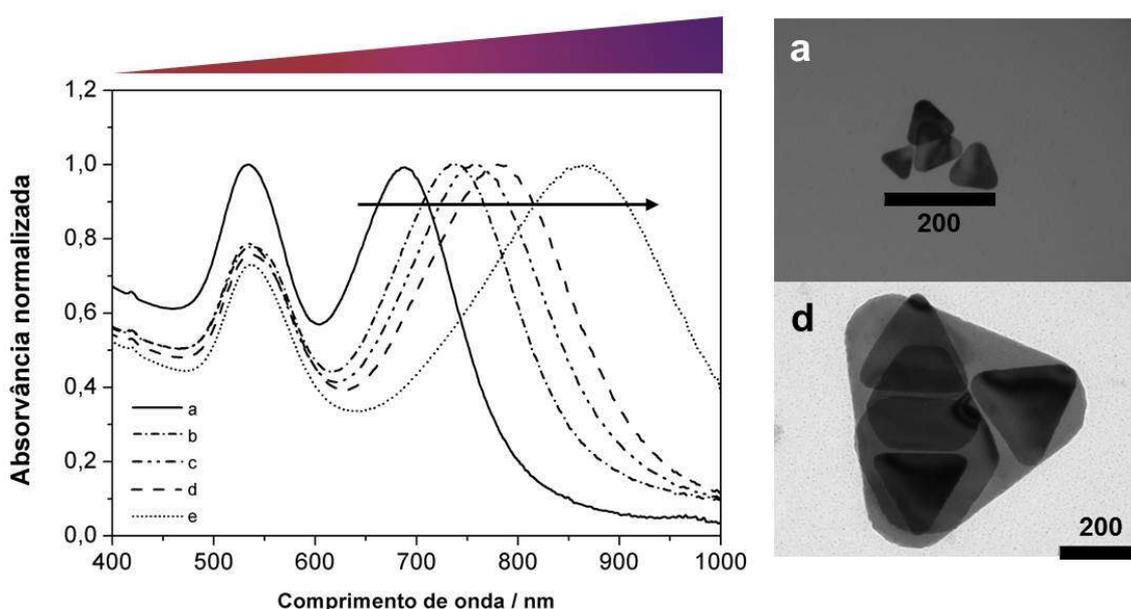
**Figura 3.10** - Espectros UV-Vis de extinção da amostra AuNS (R=15) que sofreu aumento de escala dispersa em diferentes solventes (DMF, etanol e água).

Através das absorvâncias dos espectros, nomeadamente ao nível da banda LSPR2 verifica-se que houve de facto, uma perda de AuNS durante a lavagem de DMF para etanol, de cerca de 16% e uma perda adicional de 11% durante as lavagens de etanol para água. Além disso, para diferentes solventes ocorrem pequenos desvios da banda plasmónica, facto que se poderá dever aos diferentes índices de refração para cada solvente.

A concentração das AuNS foi estimada espectralmente com base nas premissas que foram estabelecidas na seção 3.2.2.3.4 e no método de Hendel *et al.*<sup>71</sup> (seção A3.1-2 do anexo III). Assim, a concentração da solução imediatamente após o término da síntese era 0,11 nM (em DMF). Depois de duas lavagens por centrifugação, o resíduo foi ressuspenso em etanol, tendo-se estimado o valor de 0,09 nM. A transferência das AuNS para água conduziu a uma perda sistematicamente menor de NP, obtendo-se uma concentração final de 0,08 nM. O decréscimo da concentração observado foi concordante com a percentagem estimada pela diferença de intensidade da banda LSPR 2.

### 3.3.1.4 Nanotriângulos de ouro (AuNT)

Os aspetos mais relevantes envolvidos na otimização da síntese fotocatalítica de AuNT e consequente influência nas características morfológicas, embora tenham sido estudados por mim e pela Mestre Eliana Malheiro, num período anterior à elaboração deste projeto de doutoramento, não serão aqui abordados de forma extensiva. As conclusões mais significativas constam na sua dissertação de Mestrado intitulada “*Efeitos cinéticos no controlo morfológico de nanopartículas de ouro*”<sup>79</sup> e na literatura<sup>55</sup>, sendo que neste trabalho apenas será demonstrada a versatilidade deste método no ajuste do tamanho dos AuNT através variação da concentração do fotocatalisador, uma metaloporfirina de estanho (IV). Os resultados obtidos na caracterização dos AuNT por UV/vis e TEM apresentam-se nas **figuras 3.11**.



**Figura 3.11** – Espectros UV-visível de extinção obtidos para amostras de AuNT em solução aquosa, nas quais se efetuou um gradiente de concentração de SnP(IV). No topo deste representa-se a variação da cor da solução de AuNT obtidas. As concentrações variaram entre (a) 0,019 (b) 0,016 (c) 0,014 (d) 0,012 (e) 0,09  $\mu\text{M}$ . À direita, as imagens de TEM capturadas na análise das amostras (a) e (d).

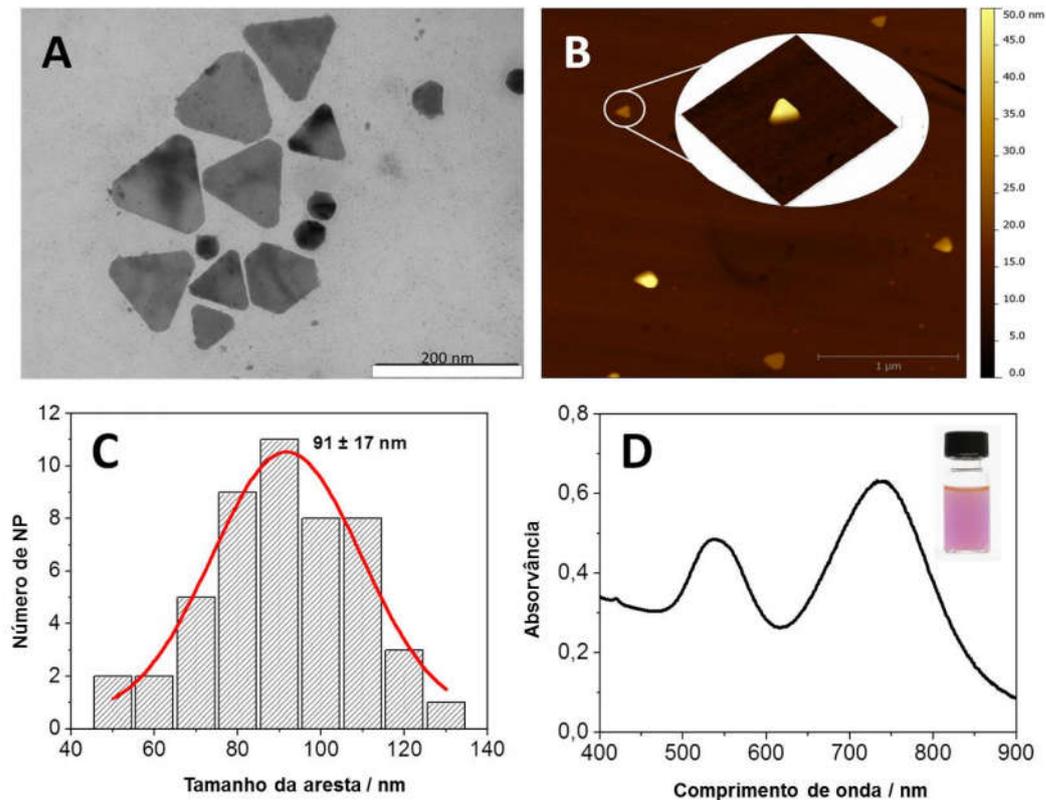
Dada a anisotropia intrínseca dos AuNT, estas nanoestruturas planares exibem duas bandas plasmónicas, isto significa que polarizam a luz em ambas as direções dos eixos, longitudinal e transversal. Enquanto a banda correspondente ao modo de ressonância transversal pode elucidar quanto à espessura dos AuNT, a longitudinal está relacionada com o tamanho das arestas.

Por análise dos espectros de UV/vis apresentados na **figura 3.11** verifica-se que a banda longitudinal varia significativamente com a concentração de SnP(IV), enquanto a banda transversal apresenta ressonâncias sempre por volta dos 535 nm, indicando que a variação da concentração de porfirina deve induzir uma variação significativa do tamanho das arestas dos triângulos, mas que a espessura dos AuNT se mantém inalterada. A diminuição gradual da concentração de SnP(IV) provoca

um desvio da banda plasmónica para o vermelho, cujos  $\lambda_{\text{máx}}$  variam entre os 680 (lilás) e os 870 nm (roxo). A diferença entre os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  é típico de sistemas em que o fotocatalisador afeta principalmente a velocidade de formação de *seeds*. Para concentrações mais elevadas de fotocatalisador forma-se um maior número de *seeds* na primeira fase da formação de nanopartículas, que depois competem entre si pelo precursor de ouro disponível para crescimento, até que este se esgote, levando, portanto, a um menor tamanho dos AuNT formados.

As imagens de TEM indicam que há de facto, um aumento do tamanho das arestas quando a concentração de SnP(IV) é menor, bem como uma maior polidispersão de tamanhos. Tal é evidente para a amostra **(e)** que apresenta AuNT com diversos tamanhos: sobrepostos a um AuNT de cerca de 600 nm de aresta encontram-se outros 4, cujos tamanhos são todos diferentes.

Neste estudo otimizou-se a concentração de SnP(IV) para a síntese dos AuNT com as características óticas pretendidas e que corresponderam a dimensões de 80-100 nm. Embora a gama de valores de concentração seja extremamente reduzida (0,01-0,02  $\mu\text{M}$ ), é importante constatar que esta pequena variação influencia significativamente o comprimento das arestas. Contudo, depois de se proceder ao aumento de escala, este aspeto deixou de ser tão relevante, dado que os volumes totais de solução adicionados foram maiores, tornando-se um método mais robusto. Tendo-se chegado à conclusão que 0,014  $\mu\text{M}$  parecia ser o valor de concentração de SnP(IV) mais indicado para a obtenção dos AuNT que vão ser usados em micro-espectroscopia UV-Vis (conteúdo inserido no **Capítulo 5**). A caracterização do coloide resultante da otimização está resumida na **figura 3.12**.



**Figura 3.12** – **A.** Imagem de TEM representativa de uma amostra de AuNT (barra de escala corresponde a 200 nm) **B.** Imagem de AFM (*tapping mode*) de uma zona seleccionada da superfície de vidro onde foram depositados os AuNT (destaque de um AuNT isolado com  $17 \pm 2$  nm de espessura) **C.** Histograma de distribuição do tamanho da aresta dos AuNT presentes na amostra (N=51 partículas); valor médio do tamanho da aresta:  $91 \pm 17$  nm **D.** Espectro visível de extinção da amostra de AuNT em solução aquosa (destaque do coloide de AuNT depois da síntese).

Através da imagem de TEM constata-se que os nanotriângulos predominam em relação às esferas e a outras formas poligonais; e que as arestas destes medem entre 70 e 110 nm, sendo que o valor médio obtido por TEM é de  $91 \pm 17$  nm. Embora ambas as técnicas forneçam informações concordantes quanto à morfologia e ao tamanho, só através da técnica de AFM se pôde estimar a espessura dos AuNT, que ronda em média os  $17 \pm 2$  nm.

Pode considerar-se que o rendimento desta síntese, em termos percentuais é elevado, sobretudo porque se trata de uma metodologia que envolve apenas “um passo” (ao contrário dos convencionais métodos de síntese de AuNT), sendo que a formação de outras nanoestruturas é reduzida (**figura 3.12A**). O CTAB, enquanto agente de revestimento (tensoativo catiónico) proporciona em termos de carga absoluta, uma boa estabilidade coloidal em solução aquosa. No entanto dada a dimensão dos AuNT, estes tornam-se significativamente instáveis na presença de novos ligandos ou solventes.

### 3.4 Conclusões e considerações finais

Para o desenvolvimento dos nanobiossensores de DNA foi necessário recorrer-se a dois tipos de AuNP, esféricas e não esféricas (nanotriângulos e nanoestrelas). De acordo com as características pré-estabelecidas para cada um deles e atendendo que o objetivo principal era avaliar a sensibilidade e desempenho dos biossensores com base na morfologia das AuNP usadas, sintetizaram-se nanoesferas de ouro de 15 e 80 nm, nanoestrelas e nanotriângulos.

Os métodos utilizados para a obtenção das AuNP tiveram por base procedimentos descritos na literatura, sendo que estes foram implementados e escalados para maiores volumes com bastante sucesso, os diâmetros médios corresponderam aos esperados (ver **tabela resumo**), com elevado rendimento. Em contrapartida, os métodos referentes às AuNP não esféricas, cuja formação dependia da existência prévia de núcleos de crescimento (*seeds*) necessitaram de alguns ajustes experimentais, de modo a obterem-se AuNP com as dimensões pretendidas. Precisamente pelo facto dos passos da nucleação e crescimento ocorrerem desfasadamente e até mesmo em recipientes diferentes, embora se tenham obtido sempre AuNP com a morfologia desejada, o controlo do tamanho foi sem dúvida, o fator limitante destas sínteses. Desde a concentração rigorosa de alguns reagentes, ao tamanho e temperatura das Au-*seeds* passando pelo pH das soluções à agitação, o controlo rigoroso de todos estes parâmetros foi determinante para a sistematização destes métodos. Ao efetuar-se o aumento de escala, as questões que se prendiam com o rigor das concentrações de determinados reagentes, uma vez que os procedimentos experimentais estão descritos à escala do nanolitro, foram atenuadas quando se passou para os microlitros, representando assim uma vantagem. Ainda assim, a reprodutibilidade dos métodos foi manifestamente mais acentuada nas sínteses de AuNP esféricas (**tabela resumo**) não só porque os métodos já se encontram altamente otimizados, mas acima de tudo pelo motivo referido anteriormente, isto é, dependerem de duas reações (formação das *seeds* e crescimento de determinadas facetas cristalográficas). De lote para lote, as diferenças observadas tanto para os AuNS como para os AuNT, no que diz respeito às bandas LSPR eram muito pouco significativas quando comparados com os tamanhos e a forma detetados por TEM, que se apresentavam sensivelmente os mesmos.

A possibilidade de determinar a concentração de AuNP foi um aspeto importante no decorrer deste trabalho, sobretudo porque era necessário parametrizar a quantidade de AuNP presente em cada nanobiossensor, de forma a poder comparar resultados provenientes de lotes diferentes. A principal vantagem da utilização do método de Haiss *et al.* é que é bastante fidedigno no cálculo e atribuição do diâmetro de AuNP revestidas a citrato (confirmado por TEM), um aspeto que diminuiu drasticamente a necessidade de se recorrer a constantes análises de TEM. Este método permitiu igualmente a determinação da concentração de AuNP, no entanto apenas para AuNP em solução aquosa, revestidas por citrato. As limitações do método de Haiss *et al.* foram colmatadas pela utilização do método de Hendel *et al.*, pelo que este permite a estimativa da concentração da concentração de AuNP independentemente da forma, tamanho, revestimento, etc... Embora os revestimentos das AuNP fossem por vezes distintos, ambos os métodos davam origem a resultados idênticos e muito precisos, sempre na mesma ordem grandeza.

**Tabela Resumo** –AuNP sintetizadas e respetiva caracterização por espectrofotometria UV-Vis e TEM

<b>AuNP</b>	<b>Método</b>	<b>Diâmetro TEM / nm</b>	<b>Diâmetro teórico / nm</b>	<b>Diâmetro por UV-Vis / nm</b>	<b>[AuNP] por UV-Vis / nM</b>
<b>AuNP-15</b>	<i>“Turkevich”</i>	13,7 ± 1,7	13-15	14,6	8
<b>AuNP-80</b>	<i>Crescimento mediado por seeds</i>	80,7 ± 7,1	(8ªadição) 80,1 ± 5,4	79,9	0,1
<b>AuNT</b>	<i>Fotocatalítico</i>	91,0 ± 17,0	variável	-	-
<b>AuNS</b>	<i>Crescimento mediado por seeds</i>	51,1 ± 3,8	variável	-	0,08

### 3.5 Referências bibliográficas

1. Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. *Anal Bioanal Chem* **2007**, 391, (3), 943-950.
2. Cunningham, A.; Bürgi, T., Bottom-up Organisation of Metallic Nanoparticles. In *Amorphous Nanophotonics*, Rockstuhl, C.; Scharf, T., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 1-37.
3. LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, 72, (11), 4847-4854.
4. Mer, V. K. L. *Industrial & Engineering Chemistry* **1952**, 44, (6), 1270-1277.
5. Polte, J. *CrystEngComm* **2015**, 17, (36), 6809-6830.
6. Watzky, M. A.; Finke, R. G. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, (43), 10382-10400.
7. Yao, T.; Sun, Z.; Li, Y.; Pan, Z.; Wei, H.; Xie, Y.; Nomura, M.; Niwa, Y.; Yan, W.; Wu, Z.; Jiang, Y.; Liu, Q.; Wei, S. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, (22), 7696-7701.
8. Thanh, N. T. K.; Maclean, N.; Mahiddine, S. *Chemical Reviews* **2014**, 114, (15), 7610-7630.
9. Hubert, F.; Testard, F.; Spalla, O. *Langmuir* **2008**, 24, (17), 9219-9222.
10. Vetter, T.; Iggländ, M.; Ochsenbein, D. R.; Hänseler, F. S.; Mazzotti, M. *Crystal Growth & Design* **2013**, 13, (11), 4890-4905.
11. Gole, A.; Murphy, C. J. *Chemistry of Materials* **2004**, 16, (19), 3633-3640.
12. Eustis, S.; El-Sayed, M. A. *Chemical Society Reviews* **2006**, 35, (3), 209-217.
13. Sau, T. K.; Murphy, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (28), 8648-8649.
14. Chen, Y.; Gu, X.; Nie, C.-G.; Jiang, Z.-Y.; Xie, Z.-X.; Lin, C.-J. *Chemical Communications* **2005**, (33), 4181-4183.
15. Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chemical Reviews* **2004**, 104, (1), 293-346.
16. Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, (29), 13857-13870.
17. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, 11, (0), 55-75.
18. Enustun, B. V.; Turkevich, J. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, (21), 3317-3328.
19. Sivaraman, S. K.; Kumar, S.; Santhanam, V. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 361, (2), 543-547.
20. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (32), 15700-15707.
21. Shao, Y.; Jin, Y.; Dong, S. *Chemical Communications* **2004**, (9), 1104-1105.
22. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Advanced Materials* **2001**, 13, (18), 1389-1393.
23. Cheng, H.-W.; Schadt, M. J.; Zhong, C.-J. *Chemistry – An Asian Journal* **2016**, 11, (1), 120-127.
24. Frens, G. *Nature Physical Science* **1973**, 241, (105), 20-22.
25. Yonezawa, T.; Kunitake, T. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, 149, (1-3), 193-199.
26. Watson, K. J.; Zhu, J.; Nguyen, S. T.; Mirkin, C. A. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, (2), 462-463.
27. Chow, M. K.; Zukoski, C. F. *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, 165, (1), 97-109.
28. Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, (45), 13939-13948.
29. Kumar, S.; Gandhi, K. S.; Kumar, R. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2007**, 46, (10), 3128-3136.
30. Sahu, P.; Prasad, B. L. V. *Langmuir* **2014**, 30, (34), 10143-10150.
31. Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntès, V. *Langmuir* **2011**, 27, (17), 11098-11105.
32. Guo, Z.; Fan, X.; Xu, L.; Lu, X.; Gu, C.; Bian, Z.; Gu, N.; Zhang, J.; Yang, D. *Chemical Communications* **2011**, 47, (14), 4180-4182.
33. Mallin, M. P.; Murphy, C. J. *Nano Letters* **2002**, 2, (11), 1235-1237.

34. Tatarchuk, V. V.; Sergievskaya, A. P.; Druzhinina, I. A.; Zaikovskiy, V. I. *Journal of Nanoparticle Research* **2011**, 13, (10), 4997-5007.
35. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, (7), 801-802.
36. Weare, W. W.; Reed, S. M.; Warner, M. G.; Hutchison, J. E. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (51), 12890-12891.
37. Schmid, G. *Chemical Society Reviews* **2008**, 37, (9), 1909-1930.
38. Song, J.; Kim, D.; Lee, D. *Langmuir* **2011**, 27, (22), 13854-13860.
39. Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, (16), 1655-1656.
40. Wuelfing, W. P.; Gross, S. M.; Miles, D. T.; Murray, R. W. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (48), 12696-12697.
41. Oh, E.; Susumu, K.; Goswami, R.; Mattoussi, H. *Langmuir* **2010**, 26, (10), 7604-7613.
42. Hussain, I.; Graham, S.; Wang, Z.; Tan, B.; Sherrington, D. C.; Rannard, S. P.; Cooper, A. I.; Brust, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (47), 16398-16399.
43. Liu, Y.; Male, K. B.; Bouvrette, P.; Luong, J. H. T. *Chemistry of Materials* **2003**, 15, (22), 4172-4180.
44. Yonezawa, T.; Yasui, K.; Kimizuka, N. *Langmuir* **2001**, 17, (2), 271-273.
45. Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48, (1), 60-103.
46. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Langmuir* **2001**, 17, (22), 6782-6786.
47. Zheng, Y.; Zhong, X.; Li, Z.; Xia, Y. *Particle & Particle Systems Characterization* **2014**, 31, (2), 266-273.
48. Quaresma, P.; Soares, L.; Contar, L.; Miranda, A.; Osorio, I.; Carvalho, P. A.; Franco, R.; Pereira, E. *Green Chemistry* **2009**, 11, (11), 1889-1893.
49. Zhi-Chuan, X.; Cheng-Min, S.; Cong-Wen, X.; Tian-Zhong, Y.; Huai-Ruo, Z.; Jian-Qi, L.; Hu-Lin, L.; Hong-Jun, G. *Nanotechnology* **2007**, 18, (11), 115608.
50. Motl, N. E.; Smith, A. F.; DeSantis, C. J.; Skrabalak, S. E. *Chemical Society Reviews* **2014**, 43, (11), 3823-3834.
51. Niu, W.; Zhang, L.; Xu, G. *Nanoscale* **2013**, 5, (8), 3172-3181.
52. Bakshi, M. S. *Crystal Growth & Design* **2016**, 16, (2), 1104-1133.
53. Pandian Senthil, K.; Isabel, P.-S.; Benito, R.-G.; Abajo, F. J. G. d.; Luis, M. L.-M. *Nanotechnology* **2008**, 19, (1), 015606.
54. Miranda, A.; Malheiro, E.; Eaton, P.; Carvalho, P. A.; de Castro, B.; Pereira, E. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2011**, 15, (05n06), 441-448.
55. Miranda, A.; Malheiro, E.; Skiba, E.; Quaresma, P.; Carvalho, P. A.; Eaton, P.; de Castro, B.; Shelnut, J. A.; Pereira, E. *Nanoscale* **2010**, 2, (10), 2209-2216.
56. Burrows, N. D.; Vartanian, A. M.; Abadeer, N. S.; Grzincic, E. M.; Jacob, L. M.; Lin, W.; Li, J.; Dennison, J. M.; Hinman, J. G.; Murphy, C. J. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2016**, 7, (4), 632-641.
57. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, (19), 4065-4067.
58. Busbee, B. D.; Obare, S. O.; Murphy, C. J. *Advanced Materials* **2003**, 15, (5), 414-416.
59. Ye, X.; Jin, L.; Caglayan, H.; Chen, J.; Xing, G.; Zheng, C.; Doan-Nguyen, V.; Kang, Y.; Engheta, N.; Kagan, C. R.; Murray, C. B. *ACS Nano* **2012**, 6, (3), 2804-2817.
60. Ye, X.; Zheng, C.; Chen, J.; Gao, Y.; Murray, C. B. *Nano Letters* **2013**, 13, (2), 765-771.
61. Si, S.; Leduc, C.; Delville, M.-H.; Lounis, B. *ChemPhysChem* **2012**, 13, (1), 193-202.
62. Garg, N.; Scholl, C.; Mohanty, A.; Jin, R. *Langmuir* **2010**, 26, (12), 10271-10276.
63. Ali, M. R. K.; Snyder, B.; El-Sayed, M. A. *Langmuir* **2012**, 28, (25), 9807-9815.
64. Lohse, S. E.; Eller, J. R.; Sivapalan, S. T.; Plews, M. R.; Murphy, C. J. *ACS Nano* **2013**, 7, (5), 4135-4150.
65. Skrabalak, S. E.; Brutchey, R. L. *Chemistry of Materials* **2016**, 28, (4), 1003-1005.
66. Thiele, M.; Soh, J. Z. E.; Knauer, A.; Malsch, D.; Stranik, O.; Müller, R.; Csáki, A.; Henkel, T.; Köhler, J. M.; Fritzsche, W. *Chemical Engineering Journal* **2016**, 288, 432-440.

67. Thiele, M.; Knauer, A.; Csáki, A.; Mallsch, D.; Henkel, T.; Köhler, J. M.; Fritzsche, W. *Chemical Engineering & Technology* **2015**, 38, (7), 1131-1137.
68. Barbosa, S.; Agrawal, A.; Rodríguez-Lorenzo, L.; Pastoriza-Santos, I.; Alvarez-Puebla, R. A.; Kornowski, A.; Weller, H.; Liz-Marzán, L. M. *Langmuir* **2010**, 26, (18), 14943-14950.
69. Lee, P. C.; Meisel, D. *The Journal of Physical Chemistry* **1982**, 86, (17), 3391-3395.
70. Kedia, A.; Senthil Kumar, P. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, 116, (2), 1679-1686.
71. Hendel, T.; Wuithschick, M.; Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Rademann, K.; Polte, J. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, (22), 11115-11124.
72. Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; García de Abajo, F. J.; Liz-Marzán, L. M. *Langmuir* **2006**, 22, (16), 7007-7010.
73. Harriman, A.; Richoux, M. C.; Neta, P. *The Journal of Physical Chemistry* **1983**, 87, (24), 4957-4965.
74. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. *Nat Meth* **2012**, 9, (7), 671-675.
75. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (11), 4215-4221.
76. Khoury, C. G.; Vo-Dinh, T. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* **2008**, 2008, (112), 18849-18859.
77. Hao, F.; Nehl, C. L.; Hafner, J. H.; Nordlander, P. *Nano Letters* **2007**, 7, (3), 729-732.
78. Mazzucco, S.; Stéphan, O.; Colliex, C.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Garcia de Abajo, J.; Kociak, M. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **2011**, 54, (3), 33512.
79. Malheiro, E. Efeitos cinéticos no controlo da morfologia de nanopartículas de ouro. Universidade do Porto, Faculdade de Ciências  
2010.



## **C**apítulo IV.

Deteção do SNP C/T -13910 em  
Amostras Clínicas recorrendo a  
Nanossensores Colorimétricos em  
Solução



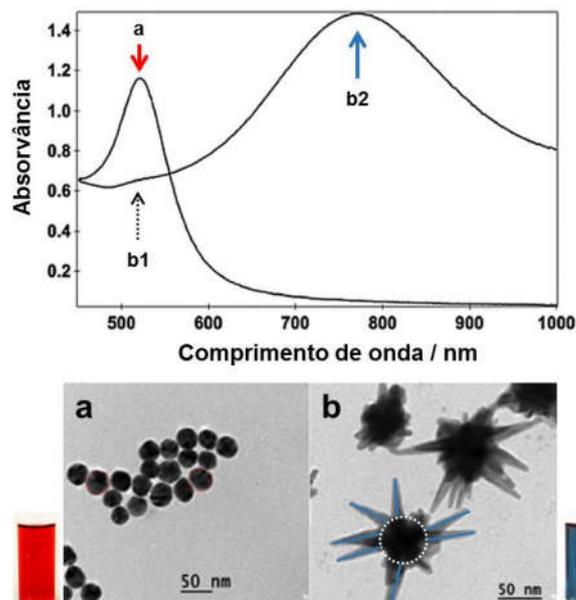
## 4.1 Breve introdução ao capítulo

O interesse em diagnosticar doenças ou condições médicas numa fase precoce tem vindo a aumentar, exigindo cada vez mais o recurso a novas tecnologias para diminuir o tempo de diagnóstico, o que possibilita terapêuticas mais rápidas e eficazes. Entre estas novas tecnologias, os sistemas nanotecnológicos têm possibilitado o desenvolvimento de novas metodologias, com elevada sensibilidade e especificidade, a baixo custo. De todos os sistemas nanotecnológicos, os que incluem NPM têm adquirido grande relevância em vários campos científicos. As NPM apresentam propriedades óticas específicas dependentes do seu tamanho e sobretudo da sua morfologia que permitem a exploração das interações biomoleculares com as NP, com vista à sua aplicação em diagnósticos biomédicos <sup>1-3</sup>.

### 4.1.1 Nanobiossensores colorimétricos de DNA

#### 4.1.1.1 Nanopartículas de ouro

Os coloides de ouro, sejam eles constituídos por AuNP esféricas ou não esféricas possuem geralmente cores bastante intensas. A alteração das suas características físicas proporciona-lhes propriedades óticas específicas que suscitam elevado interesse biotecnológico, sobretudo as que são influenciadas pelo seu tamanho e forma (área de superfície) e pela distância interpartícula (fenómeno de agregação). Na origem física de tais propriedades encontra-se o fenómeno de ressonância plasmónica de superfície localizado (LSPR) <sup>4</sup>. Na **figura 4.1** apresentam-se as principais diferenças entre nanoesferas (AuNP) e nanoestrelas de ouro (AuNS).



**Figura 4. 1 – Comparação entre as AuNP usadas na preparação dos nanobiossensores.** Espectros UV-Vis e respetivas imagens de TEM de nanoesferas – coloide vermelho (a) e nanoestrelas de ouro – coloide azul (b). b1 e b2 correspondem às duas LSPR das nanoestrelas, transversal e longitudinal, respetivamente.

As soluções coloidais de AuNP esféricas com diâmetros de 13-18 nm apresentam no seu espectro UV-Vis uma única banda LSPR característica a 520 nm <sup>5</sup>. As AuNP não esféricas apresentam normalmente mais do que uma banda plasmónica, como é o caso das nanoestrelas de ouro (AuNS); devido à sua anisotropia intrínseca, exibem duas bandas LSPR. A ressonância plasmónica de AuNS resulta da hibridação da excitação coletiva dos eletrões do núcleo da NP e de cada ponta individual da NP. Nos respetivos espectros de extinção observam-se então duas bandas distintas, uma compreendida entre os 700 e 800 nm (longitudinal) e uma mais fraca compreendida entre os 500 e 600 nm (transversal) <sup>6-8</sup>.

A estabilidade das AuNP relativamente a fenómenos tais como agregação e adesão de NP é dependente das forças presentes à sua superfície. Estas forças variam com as condições físicas e químicas do meio em que se encontram. A agregação é o processo pelo qual duas ou mais NP se aproximam até que a distância interpartícula seja tão reduzida que leva a que estas se agrupem (agregado) <sup>9</sup>. O termo “estabilidade” em AuNP representa a estabilidade cinética, e define-se assim como a capacidade de NP coloidais permanecerem uniformemente distribuídas em solução <sup>10</sup>. Esta propriedade pode ser alterada através da adição de substância (eletrólitos) que interajam física ou quimicamente com cada uma das NP do sistema. De facto, as NP em suspensão coloidal encontram-se estabilizadas por uma camada de iões à superfície que mantém uma carga fixa e de valor absoluto, promovendo a repulsão eletrostática e mantendo-as afastadas (cineticamente estáveis). No entanto, por adição de um eletrólito e conseqüente aumento de força iónica no meio, a repulsão eletrostática entre as partículas é atenuada, e a suspensão coloidal passa a ser cineticamente instável, originando a agregação. A agregação das NP, por sua vez, provoca um alargamento da banda da LSPR devido ao acoplamento das bandas plasmónicas de todas as AuNP envolvidas, aumentando assim o coeficiente de extinção molar para comprimentos de onda mais elevados. Este alargamento/deslocamento da banda está associado uma alteração da cor das AuNP, no caso mais comum (AuNP esféricas) de vermelho para azul <sup>10, 11</sup>.

#### **4.1.1.2 Nanossondas de ouro**

Existe um interesse crescente em desenvolver técnicas de análise e deteção de DNA por imobilização em suportes sólidos, nas mais variadas áreas da biotecnologia e em particular para a deteção de sequências específicas de DNA. As nanossondas de ouro são a fusão de duas tecnologias <sup>12-15</sup>. Por um lado, a síntese de AuNP, evidenciando todas as suas propriedades físicas e óticas, do outro a tecnologia de funcionalização de superfícies de ouro com oligonucleótidos tiolados, descrita por Storhoff *et al.* A fusão destas duas metodologias permite a utilização das NP em sistemas de deteção de ácidos nucleicos <sup>16</sup>. Estes sistemas apresentam-se como uma alternativa aos métodos tradicionais de hibridação em suportes sólidos, sem, contudo, recorrer a passos de lavagens ou à utilização de fluoróforos, se bem que apresentando por vezes uma sensibilidade mais baixa <sup>17, 18</sup>.

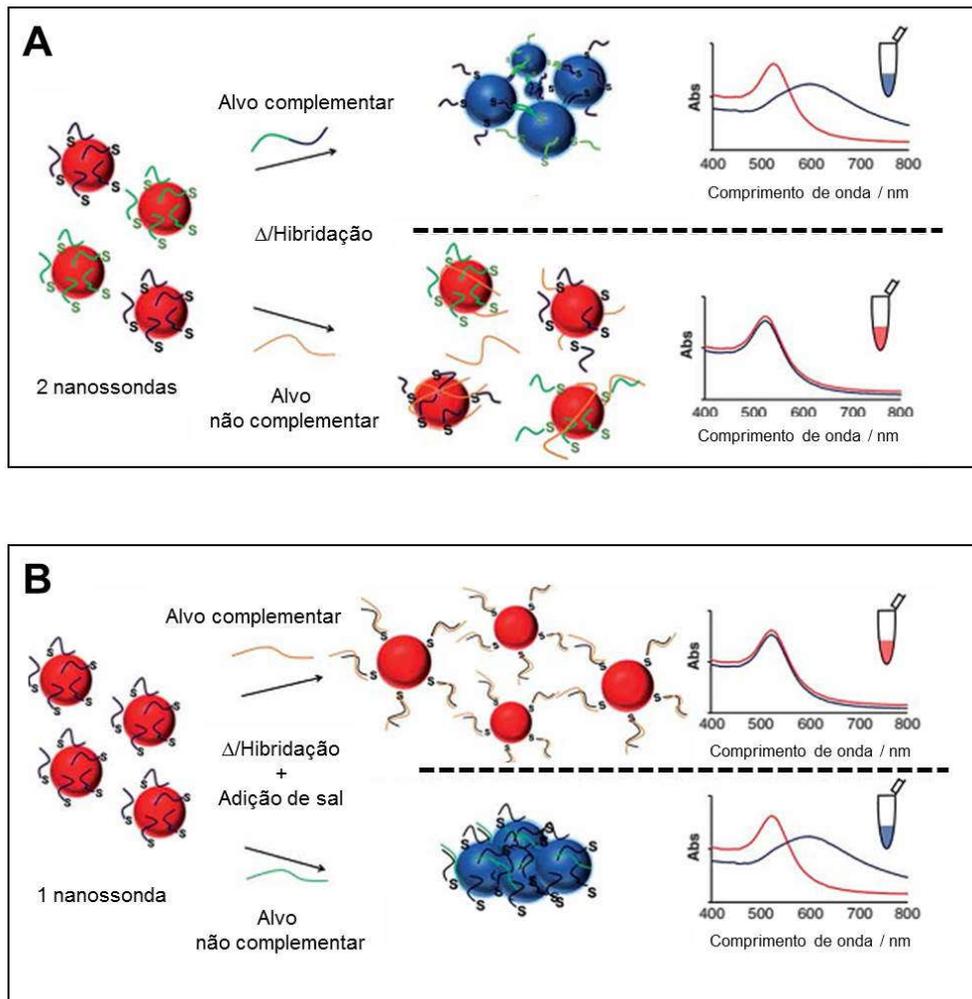
Na preparação de conjugados de AuNPs com sondas de oligonucleótidos (nanossondas de ouro), com vista à sua utilização na deteção de sequência específicas de ácidos nucleicos, Mirkin *et al.* conjugaram pela primeira vez oligonucleótidos em cadeia simples (ssDNA) modificados com tióis, com

AuNP na sequência de uma abordagem de "salt aging" <sup>19</sup>. Neste processo, a concentração de NaCl era gradualmente aumentada de modo neutralizar a adsorção não-específica. A adição de detergentes, como o SDS, antes da adição de sal surgiu para prevenir a agregação das AuNP, sobretudo na presença de concentrações elevadas de sal. A utilização de ultrassons por Storhoff *et al.* durante o procedimento de "salt aging" surge com o objetivo de aumentar a densidade de oligonucleótidos à superfície das AuNP, potenciando o empacotamento ordenado das sondas <sup>20, 21</sup>, ao mesmo tempo que reduz o tempo de funcionalização e melhora a reprodutibilidade.

#### **4.1.1.3 Metodologia non-crosslinking**

O desenvolvimento de sistemas para detecção colorimétrica de DNA baseado no uso de AuNP foi introduzido por Mirkin *et al.*, tendo ficado conhecidos por serem baseados em processos de reticulação ("crosslinking") <sup>19</sup> (**figura 4.2A**). Nesta abordagem eram utilizados dois tipos de nanossondas complementares a regiões adjacentes ao alvo de interesse, em que a AuNP se encontrava ligada à extremidade 5' de uma sequência e a 3' na outra. Ao promover a hibridação dos alvos com as nanossondas, promovia-se também a sua aproximação, resultando assim na alteração de cor da suspensão <sup>19, 22-25</sup>.

Posteriormente, surgiram outras abordagens que recorriam apenas a uma nanossonda com uma única sequência de DNA. Neste caso, o fenómeno de agregação não resultava da hibridação dos alvos com a sonda, mas sim da indução do aumento da força iónica do meio após adição de eletrólito, designando-se este método por *non-crosslinking* (**figura 4.2B**). A hibridação de alvos com a nanossonda aumenta a sua estabilidade, impedindo a sua agregação <sup>26-34</sup>. O método de *non-crosslinking* tem sido desenvolvido de forma a aumentar a sensibilidade e especificidade, tendo já sido aplicado com sucesso na detecção de mutações pontuais <sup>27, 32</sup>, na caracterização da expressão génica sem passos de transcrição reversa e/ou amplificação por *PCR* <sup>34</sup>.



**Figura 4. 2 – Princípios de detecção colorimétrica envolvidos em eventos de hibridação de DNA.** Mecanismo, espectros UV-Vis e resultados colorimétricos em **(A)** métodos *crosslinking*<sup>19</sup> e **(B)** métodos *non-crosslinking*<sup>26</sup>. Imagem adaptada da referência<sup>36</sup>.

No presente capítulo serão desenvolvidos dois biossensores colorimétricos segundo uma metodologia *non-crosslinking*<sup>26, 37</sup>. O alvo de detecção de ambos os biossensores será o polimorfismo de base única C/T -13910 (rs4988235) responsável pela condição genética da intolerância à lactose. O objetivo principal para além da detecção do SNP, será comparar a influência do tipo de suporte sólido usado, ou seja, o tipo de AuNP e identificar quais as vantagens em recorrer-se a NP não esféricas em sistemas de detecção colorimétrica.

## 4.2 Metodologia Experimental

### 4.2.1 Material e equipamentos

- Colunas *Illustra* NAP-5 *Sephadex*<sup>®</sup> G-25 DNA Grade (*GE Healthcare*)
- Filtros de seringa 0,20 µm – Membranas de Acetato de celulose (*GVS*)
- Espectrofotômetro UV-Visível *Varian Cary 50 Bio*
- Centrífuga com arrefecimento K3 (*Centurion Scientific*)
- Centrífuga *Eppendorf 5810R* (Rotores: *falcon* F-34-6-38; *eppendorf* F-45-30-11)
- Microcentrifuga *Galaxy MiniStar C1413-V230* (*VWR*)
- Potenciômetro *Crison pH-meter BASIC 20+* com um eletrodo combinado de vidro *Crison* (5208)
- Agitador térmico *Thermoblock TS-100* (*Biosan*)
- Vortex 2x<sup>3</sup> (*VELP Scientifica*)
- Banho de Ultrasons (*P. Selecta*)
- Banho-maria digital, modelo 601/5 (*Nahita*)
- Equipamento horizontal para eletroforese em gel E1007-7 (*Labnet*)
- Fonte de energia *PowerPac™ Basic* (*Bio-Rad*)
- Célula de absorção de quartzo “*Supraci*<sup>®</sup>” *Ultra micro Hellma*<sup>®</sup>, volume de 50 µL e passo ótico de 10 mm

#### 4.2.1.1 Reagentes químicos usados na preparação de soluções

Tabela 4. 1 – Reagentes químicos utilizados e respetivos fabricantes

Reagente	Fabricante
Ditiotreitol (DTT) – solução 1 M	Sigma-Aldrich
NaCl	Scharlau
Sulfato de amónia (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Panreac
Fosfato de sódio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Scharlau
Hidrogenofosfato dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Glicerol	Sigma-Aldrich
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Sigma-Aldrich
Etanol absoluto	Carlo Erba
Acetato de Etilo	Carlo Erba
Agarose ultrapura	Invitrogen
Tris (base)	Fluka
Ácido acético (glacial)	Riedel-de Haen
EDTA	Merck

#### 4.2.1.2 Oligonucleótidos

Tabela 4. 2 – Sequências dos oligonucleótidos sintéticos desenhados para a funcionalização das AuNP

Oligonucleótido sonda	Sequência de nucleótidos (5'- HS → 3')	Fornecedor
<b>LCT(G)-15</b>	CTTTGAGGCCAGGGG	STAB-Vida, Portugal
<b>LCT(G)-20</b>	GTTCTTTGAGGCCAGGGG	
<b>10A-LCT(G)-15</b>	AAAAAAAAAACTTTGAGGCCAGGGG	
<b>10A-LCT(G)-20</b>	AAAAAAAAAAGTTCTTTGAGGCCAGGGG	

Obs. Os oligonucleótidos foram modificados em laboratório pelo fabricante, através da adição de um grupo tiol (-SH) na extremidade 5', através da reação com *linker* C6 (6 carbonos).

#### 4.2.1.3 Amostras clínicas de DNA

Na secção 2.2.1.4 do capítulo 2 é referido o tipo de amostras de DNA seleccionadas e nas secções de 2.2.2 a 2.2.6 inclusive, estão descritos os procedimentos envolvidos no processamento das amostras, nomeadamente desde a extração à amplificação; purificação, validação da reação de PCR por eletroforese em gel de agarose e por fim, quantificação de DNA através de espectrofotometria de UV-visível. As amostras consistem em fragmentos com cerca de 345 bp de tamanho, relativas ao gene *LCT* responsável pela intolerância à lactose.

## 4.2.2 Procedimentos

### 4.2.1.1 Síntese e caracterização das nanopartículas

Para efeito de posterior comparação, dois tipos de NP com morfologias distintas foram sintetizados, nomeadamente nanoesferas de ouro cujo diâmetro rondava os 15 nm (AuNP-15) e nanoestrelas de ouro com cerca de 50 nm de distância ponta-a-ponta (AuNS).

### 4.2.2.2 Preparação de soluções tampão

Na preparação das soluções tampão de fosfato de sódio, PBS, AGE I e AGE II usou-se água Milli-Q recém obtida do sistema de água ultrapura, sendo que adicionalmente foram esterilizadas com um filtro de seringa com 0,20 µm e armazenadas no frio a 4 °C. Antes da sua utilização foram aquecidas até à  $T_{amb}$  em banho maria.

**FOSFATO DE SÓDIO 10 MM (TF)** A solução tampão de fosfato de sódio (TF) foi bastante usada em praticamente todos os procedimentos, nomeadamente na preparação de outras soluções, tais como nos tampões AGE I e AGE II, na purificação dos oligonucleótidos, na preparação das Au-sondas e em todos os ensaios decorrentes da hibridação. A sua preparação baseou-se na mistura das soluções de  $Na_2HPO_4$  e  $NaH_2PO_4$  às concentrações indicadas na **tabela 4.3**.

**Tabela 4. 3** – Reagentes e concentrações requeridas na preparação das soluções tampão de fosfato de sódio, a pH 7 e pH 8.

Reagente	Concentração / mM	
	pH 7	pH 8
$Na_2HPO_4$	5,77	9,32
$NaH_2PO_4$	4,23	0,68

**FOSFATO-SALINO 10 MM PH 7 (PBS)** A solução PBS a pH 7 foi usada apenas na funcionalização das AuNP-15 nm e preparada através da adição de NaCl à solução TF 10 mM pH 7, de forma à concentração de NaCl final ser de 0,1 M na solução PBS.

**AGE I** A solução tampão AGE I foi usada na funcionalização de ambas as AuNP (AuN-15 e AuNS) e foi obtida através da dissolução de um tensoativo, o SDS numa solução de TF 10 mM pH 8, de modo a que na solução AGE I, a concentração de SDS fosse de 2% (m/v).

**AGE II** À semelhança da AGE I, esta solução tampão foi igualmente utilizada na funcionalização das AuNP; cuja preparação consistiu para além da dissolução de SDS a 0,01% numa solução TF 10 mM pH 8, na adição de NaCl (o equivalente a 1,5 M).

**TAE 20x** A solução tampão TAE foi usada no procedimento da eletroforese em gel, nomeadamente como solvente, usado na preparação do gel (TAE 1x) e como solução tampão para correr o gel (TAE 1/8x). Preparou-se uma solução de TAE 20x usando as três soluções às concentrações indicadas e procedeu-se posteriormente, às respetivas diluições.

Reagente	Concentração (TAE 20x)
Tris (base)	0,80 M
Ácido acético glacial	0,40 M
EDTA	20 mM

#### 4.2.2.3 Preparação dos oligonucleótidos

A síntese e purificação dos oligonucleótidos foi da responsabilidade da empresa STAB-Vida Lda.. Depois da purificação por HPLC, os oligonucleótidos foram liofilizados, de forma a garantir uma maior segurança quanto à degradação por nucleases e uma maior estabilidade no transporte à  $T_{amb}$ .

A manipulação dos oligonucleótidos exigiu uso de luvas para evitar contaminações. A sua preparação envolveu a dissolução do produto liofilizado em 100  $\mu$ L de uma solução de DTT 1 M, sendo que a função deste reagente foi quebrar as pontes dissulfureto (S-S) dos dímeros que se formam em solução. Deixou-se incubar esta mistura por 1 hora à  $T_{amb}$  e de seguida adicionaram-se 900  $\mu$ L de água sem nucleases, de modo a obter-se uma concentração final de DTT de 0,1 M, deixando-se incubar por mais 1 hora à  $T_{amb}$ . Por fim, armazenou-se no congelador a -20 °C.

#### 4.2.2.4 Purificação dos oligonucleótidos

Ainda que os oligonucleótidos tenham sido purificados imediatamente após a síntese, foi necessário garantir um maior grau de pureza, pois uma vez que como vão interagir com AuNPs, através da funcionalização da superfície destas, a estabilidade coloidal não pode ser comprometida. Como tal, começou por se efetuar uma extração orgânica com acetato de etilo, cuja função é essencialmente remover o DTT. Sucintamente, num *ependorf* adicionou-se 1 volume de oligonucleótido dissolvido em DTT a 2 volumes de acetato de etilo, de seguida agitou-se manualmente a mistura durante cerca de 1 minuto e centrifugou-se a 25 °C, durante 5 minutos a 14000 rpm (repetiu-se 3 vezes). Por fim, retirou-se o *ependorf* da centrifuga e a fase orgânica, que se encontrava em cima, foi descartada.

Entretanto, os restantes contaminantes (solventes e EDTA) provenientes da síntese foram removidos recorrendo-se a colunas NAP-5 *Sephadex*<sup>®</sup> G-25, específicas para moléculas de DNA. Usou-se a solução TF 10 mM pH 8 como eluente, para lavar e equilibrar a coluna, assim como na

extração do oligonucleótido. De acordo, com as recomendações do produto <sup>3</sup>, p. ex. para 250 µL de oligonucleótido colocados na coluna, adicionaram-se 250 µL de solução TF 10 mM pH 8 e deixou-se que toda a solução atravessasse a coluna, descartando-a até a coluna ficar seca. A fração que continha o oligonucleótido foi eluída após a adição de 700 µL de solução TF 10 mM pH 8. Depois de purificado, a sua concentração foi calculada espectrofotometricamente (Nanodrop) através da medição da densidade ótica a 260 nm, atendendo ao respetivo coeficiente de extinção para dsDNA [ $33 \text{ (ng/}\mu\text{l)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ], assim como, simultaneamente a eficácia da purificação avaliada com base nos valores dos rácios  $Abs_{260}/Abs_{280}$  e  $Abs_{260}/Abs_{230}$ .

#### **4.2.2.5 Preparação das nanossondas de ouro**

As nanossondas foram preparadas através da funcionalização das AuNP sintetizadas com os oligonucleótidos sonda listados na **tabela 4.2**. Para o efeito fez-se algumas adaptações ao método descrito por Hurst *et al.* <sup>21</sup>. Este método baseia-se na combinação de um processo de “*salt aging*” (aumento gradual da concentração de sal em solução) com o do poder dos ultrassons, promovendo em simultâneo, um empacotamento mais eficaz de oligonucleótidos à superfície das AuNP. Apresenta-se seguidamente a preparação de “nanossondas-15” e “nanossondas-S”, que se referem à funcionalização das AuNP-15 e AuNS, respetivamente com oligonucleótidos tiolados.

##### **4.2.2.5.1 Preparação das “nanossondas-15”**

Depois de purificado, a concentração de oligonucleótido foi determinada espectrofotometricamente, bem como a da solução de AuNP-15. Calculou-se o volume de AuNP-15 necessário para a funcionalização com os diferentes (4) oligonucleótidos, assumindo a razão [oligonucleótido]/[AuNP-15] de 200. Antes de se dar início à preparação das nanossondas, retiram-se do frio (4 °C) as soluções a usar e colocaram-se as no banho a 25 °C.

Genericamente, o protocolo consistiu na adição de 700 µL de oligonucleótido ao volume de AuNP medido previamente para um tubo cónico de 15 mL, tendo-se misturado e homogeneizado cuidadosamente com a ajuda da micropipeta; deixou-se repousar durante 2 horas ao abrigo da luz. Passado esse período, deu-se início às adições das soluções tampão AGE I e AGE II. Começou por se adicionar AGE I, até a solução alcançar uma concentração final de 0,01 % em SDS; inseriu-se o tubo num banho de ultrassons durante 10 segundos e deixou-se repousar à  $T_{amb}$  por 20 minutos. Entretanto, com o intuito de aumentar lentamente a força iónica da solução, passou-se a adicionar AGE II, reforçando a concentração de NaCl até alcançar um máximo de 0,3 M. Foram efetuadas mais 4 adições, nas quais se impôs um aumento gradual da concentração de NaCl (0,05; 0,1; 0,2; 0,3 M). A cada adição, o tubo foi submetido a ultrassons durante 10 segundos, deixando-se a repousar à  $T_{amb}$  por 20 minutos. Terminado o processo de “*salt-aging*”, reservou-se o tubo ao abrigo da luz e à  $T_{amb}$  por um período de cerca de 16 horas. Finalmente, distribuiu-se o conteúdo para *ependorfs* de fundo cónico

---

<sup>3</sup> Ilustra NAP-5 Column 17-0853-01/17-0853-02 (consulta do protocolo)

de 1,5 mL e centrifugaram-se por 20 minutos a 13000 rpm à  $T_{amb}$ . Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante (contendo oligonucleótidos não adsorvidos) e redispersou-se o resíduo com solução TF 10 mM pH 8. Repetiu-se este procedimento de lavagem 2 vezes com esta solução tampão, sendo que na última se usou a solução PBS e depois da centrifugação, ressuspendeu-se o resíduo em 500  $\mu$ L da mesma solução tampão. Depois das lavagens, a solução de nanosonda estava preparada e no caso de não ser utilizada de imediato, era armazenada ao abrigo do ar e da luz, a 4 °C.

#### **4.2.2.5.2 Preparação das “nanosondas-S”**

Prepararam-se nanosondas-S com diferentes razões [oligonucleótido]/[AuNS] de 150; 175; 200; 225; 250, 275 e 300.

O procedimento adotado foi o mesmo que o acima descrito, à exceção de três aspetos que tiveram de ser considerados: **i)** após a adição das soluções tampão e do período de repouso de 16 horas, as AuNS depositam-se no fundo do tubo. Embora à primeira vista aparentem estar agregadas, a cuidadosa remoção do sobrenadante e posterior ressuspensão em TF 10 mM pH 8 devolve-lhes a estabilidade coloidal. **ii)** a velocidade das centrifugações aplicada foi sempre inferior, cerca de 11000 rpm. Ambas as exceções **i)** e **ii)** devem-se ao facto das AuNS serem maiores e mais densas do que as AuNP-15 nm e por fim, **iii)** a última lavagem em vez de se utilizar PBS, optou-se pelo TF 10 mM pH 8, dado que as AuNS em contacto prolongado com halogenetos sofrem alterações morfológicas.

#### **4.2.2.6 Otimização da razão [oligonucleótido]/[AuNP]**

##### **4.2.2.6.1 Nanosondas-15**

A escolha do valor da razão [oligonucleótido]/[AuNP-15] usado na secção anterior foi devido ao facto de estar referido na literatura <sup>34</sup> como o indicado para a funcionalização de AuNP com características similares. No entanto, no decurso do trabalho devido a dificuldades na indução da agregação durante o ensaio, testaram-se mais duas razões 100 e 150, tendo-se caracterizado espectrofotometricamente as nanosondas formadas.

##### **4.2.2.6.2 Nanosondas-S**

Para além da caracterização espectrofotométrica, recorreu-se adicionalmente à eletroforese em gel de agarose com o objetivo de averiguar qual o razão [oligonucleótido]/[AuNS] a ser aplicado nos ensaios de deteção. Testaram-se a seguinte gama de razões 0, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300.

Sucintamente, preparou-se um gel de agarose à concentração de 0,5% (m/v), através da dissolução a quente de 0,22 g de agarose em 45 mL da solução tampão de TAE 1/8x. Depois de morno, verteu-se a mistura para um molde com um pente de 8 poços e deixou-se arrefecer. Depois do gel (7x7 cm) estar solidificado, colocou-se o mesmo na tina horizontal do dispositivo da eletroforese e verteu-se solução tampão TAE 1/8x até tapar toda a sua superfície.

Na preparação das amostras, para além do volume de AuNS/nanossonda-S (à concentração de 2,5 – 3 nM) foi necessário colocar um elemento que facilitasse o carregamento das amostras nos poços do gel, aumentando a densidade das mesmas. Assim, aos 36  $\mu\text{L}$  de AuNS/nanossonda-S foram misturados cuidadosamente com ajuda da micropipeta, 4  $\mu\text{L}$  de glicerol, perfazendo um volume total de amostra de 40  $\mu\text{L}$ . Visto que à concentração usada as amostras apresentavam coloração azul, não foi necessária a adição de qualquer indicador do progresso eletroforético. Para a migração, aplicou-se um potencial de 150 V e permitiu-se que as amostras corressem durante 20 minutos.

#### **4.2.2.7 Estimativa da concentração das nanossondas**

Ao contrário das AuNP, a concentração da nanossondas não pôde ser determinada através do método de Haiss *et al.*, uma vez que esta abordagem é válida apenas para AuNP não funcionalizadas. Como tal, estimou-se o valor aproximado da concentração com base no volume de AuNP (AuNP-15 ou AuNS) usado no processo de funcionalização, considerando que o volume de solução final, após a adição dos restantes reagentes (oligonucleótido, soluções tampão) compensa a perda de nanossonda nas lavagens por centrifugação. Na última lavagem, as nanossondas foram concentradas cerca de x3.

#### **4.2.2.8 Estabilidade coloidal das AuNP e das nanossondas**

O estudo comparativo da estabilidade coloidal das AuNP antes e depois da funcionalização com DNA, isto é, da formação das nanossondas, foi efetuado através da caracterização espectrofotométrica destas na presença de sais. Este estudo serviu para determinar a concentração mínima necessária de sal para induzir a agregação das nanossondas, a qual será aplicada nos ensaios colorimétricos de deteção (definição das condições do ensaio “branco”).

Para o efeito, efetuaram-se quatro ensaios (**1:** AuNP-15; **2:** nanossonda-15; **3:** AuNS e **4:** nanossonda-S) com diferentes sais; nos que envolviam o uso de AuNP-15 a estabilidade foi avaliada através da variação da concentração de NaCl, sendo que nos ensaios com AuNS usou-se o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Resumidamente, para cada ensaio foram preparadas cerca de 10 alíquotas cujo volume final foi de 70  $\mu\text{L}$ . Antes de se dar início à preparação dos ensaios, retiram-se do frio (4 °C) as soluções a usar e colocaram-se as no banho a 25 °C. Pela seguinte ordem e a 25 °C, adicionou-se um volume variável de **solução de TF 10 mM pH 8**, usado para perfazer o volume final a 70  $\mu\text{L}$ ; 10  $\mu\text{L}$  de solução coloidal de **AuNP** ou **Au-sondas**, de modo a obter-se a concentração final de 2,5 – 3 nM; um volume variável de **solução de NaCl** ou  **$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$** , à concentração de 5 M, usado para obter o gradiente de concentração (0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3). Depois de homogeneizada a mistura com a ajuda da micropipeta, esperou-se 15 minutos e traçou-se o espectro de UV-Vis a 25 °C.

#### **4.2.2.9 Ensaios colorimétricos com base em método non-crosslinking**

O método colorimétrico que se pretende desenvolver é baseado num sistema *non-crosslinking* descrito por Baptista *et al.*<sup>30</sup>, que prevê a discriminação de estados de agregação de nanossondas. Na

presença de alvo complementar as nanossondas hibridam, permanecendo uniformemente dispersas em solução, traduzindo-se na cor vermelha do coloide original (resultado positivo); na ausência de alvo complementar as nanossondas agregam, traduzindo-se numa mudança visível de cor de vermelho para azul (resultado negativo).

Este método será primeiramente aplicado a AuNP-15 para as quatro sondas da intolerância à lactose listadas na **tabela 4.2** e só depois extrapolado para AuNS para a sonda que demonstrar maior eficiência na detecção do SNP C/T -13910. As condições relativas a cada ensaio são as mesmas para ambas as nanossondas.

#### **4.2.2.9.1 Detecção do SNP C/T -13910 em amostras clínicas (produtos de PCR)**

Os ensaios consistiram na adição de três soluções pela seguinte ordem: **TF 10 mM pH 8, Au-sonda e DNA alvo** (produto de PCR). A concentração de nanossondas foi fixada nos 2,5 - 3 nM e fez-se variar a concentração de dsDNA alvo entre 1,5 e 45 ng/ $\mu$ L, determinada por espectrofotometria *NanoDrop* para evitar perda de amostra. Os *ependorfs* contendo as amostras de dsDNA foram agitados em vortex e sujeitos a uma rotação para garantir que nenhuma amostra ficasse nas paredes do mesmo. De seguida, foram colocados no termoagitador a 90 °C durante 10 minutos, de modo a promover a desnaturação das cadeias duplas de DNA. Ainda no termoagitador, esperou-se mais 10 minutos a 4 °C para que a mistura arrefecesse e simultaneamente se desse início à hibridação das cadeias simples existentes em solução com a nanossonda. Avaliou-se a hibridação através da adição de um determinado volume de NaCl 5 M, nos ensaios com as nanossondas-15 ou de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 M, nos ensaios com as nanossondas-S. O volume adicionado era correspondente à concentração mínima necessária para a indução de agregação. Aguardaram-se 15 minutos após a adição e traçou-se os espetros UV-Vis numa gama de comprimentos de onda de 300-800 nm para as nanossondas-15 e 400-1000 nm para as nanossondas-S. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

#### **4.2.2.9.2 Cinética do ensaio de detecção do SNP**

A cinética de agregação da nanossonda na presença dos alvos de DNA envolvidos no ensaio de detecção do SNP C/T -13910 foi analisada espectrofotometricamente através da avaliação da velocidade da agregação para a concentração de DNA alvo mais promissora com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . O procedimento de preparação de cada ensaio foi semelhante ao da secção anterior, à exceção do tipo de medição. No anterior procedeu-se a uma simples leitura da absorvância num determinado instante; aqui como se trata da análise da cinética colorimétrica, a alteração da cor da solução será avaliada ao longo do tempo, através do deslocamento da banda LSPR desde a forma estável até à sua forma agregada. Mediu-se o valor da absorvância a 750 nm e a 820 nm a cada 90 segundos, durante 15 minutos.

## 4.3 Resultados e Discussão

# NANOSSENSOR COLORIMÉTRICO DE DNA USANDO NANOPARTÍCULAS ESFÉRICAS DE OURO

### 4.3.1 Síntese e caracterização das AuNP-15

Os resultados relativos à síntese e caracterização das AuNP-15 foram discutidos no **capítulo 3**, concretamente na secção **3.3.2.1**.

### 4.3.2 Avaliação da estabilidade coloidal aplicada ao sistema colorimétrico

A alteração das características superficiais das AuNP tem consequências diretas na sua estabilidade coloidal, traduzindo-se num aumento dessa estabilidade quando se efetua a funcionalização com oligonucleótidos tiolados e num decréscimo de estabilidade na presença de eletrólitos. Este é um dos fatores mais relevantes que fazem das AuNP excelentes biossensores colorimétricos, sendo que através do controlo da sua estabilidade é possível aplica-las na deteção de eventos de hibridação de DNA. Nos ensaios colorimétricos que se pretende desenvolver, recorreu-se à indução da agregação das nanossondas (constituídas por AuNP) por adição de sal, resultando no deslocamento da banda LSPR para comprimentos de onda superiores. Este deslocamento é dependente da concentração de sal, portanto para uma posterior comparação das diferentes medições é necessária a normalização de cada espectro, eliminando a dependência da intensidade do espectro. Neste contexto definiu-se um parâmetro indicador da agregação que permitisse avaliar o efeito do sal em cada espetro, sendo este correspondente à razão de absorvâncias entre a banda LSPR relativo às NP na forma estável e a banda correspondente à forma agregada, definido por  $R(Abs)$ :

$$R(Abs) = \frac{Abs \lambda_{forma\ estável}}{Abs \lambda_{forma\ agregada}}$$

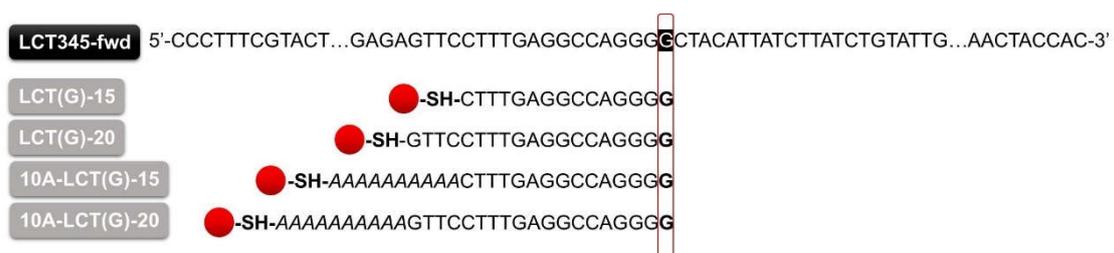
Visto que cada nanossonda sintetizada apresenta características espectroscópicas únicas, é necessário verificar qual o comprimento de onda a que ocorre o máximo de absorvância de ambos os estados das AuNP. Como não se dispõe de valores de absorvância molar para cada espécie, esta razão corresponde, de forma empírica, à razão entre a população de AuNP estáveis e agregadas. Através da razão dos valores de absorvância, não são comparados valores absolutos, mas sim a proporção relativa que cada um destes valores apresenta no espetro. Esta normalização permite ainda uma simplificação da análise dos resultados, baseada na cor. Considerando-se assim que para  $R(Abs) < 1$  significa que o valor de absorvância da espécie agregada é superior ao valor de absorvância da espécie não agregada, traduzindo-se num coloide de cor azul (teste negativo). Para  $R(Abs) > 1$ , significa que o valor de absorvância da espécie estável é superior ao valor de absorvância da espécie

agregada, traduzindo-se num coloide de cor vermelha (teste positivo). Uma vez que se pretende o desenvolvimento de um teste de diagnóstico, reservaram-se os valores  $1 < R(Abs) < 1,1$ , sendo que esta gama de absorvâncias apresenta uma baixa diferenciação colorimétrica entre as espécies presentes na amostra testada (coloide de cor roxa). Podem recair sobre esta zona, testes em que a amostra se encontra abaixo do limite de deteção do sistema, ou amostras que contenham substâncias que possam interferir com o resultado (p. ex. contaminantes provenientes do *PCR*).

#### 4.3.3 Desenho das nanossondas e do ensaio colorimétrico

Foram desenhadas quatro sondas (**figura 4.3**) com sequências derivadas do gene *LCT* numa determinada zona onde está localizado o polimorfismo de base única (SNP) C/T na posição -13910 responsável pela IL, ou seja, pela incapacidade de produção da lactase.

Todas as sondas apresentavam sequências apropriadas para a deteção do SNP num fragmento do gene *LCT* resultante da reação de *PCR* (**Capítulo 2**). O nucleótido responsável pela deteção foi estrategicamente posicionado na extremidade -3', uma vez que conforme a literatura, promovia uma melhor e mais específica discriminação das sequências <sup>179</sup>. As sondas eram complementares ao gene "*wild-type*", o qual na posição -13910 possui uma citosina (C) e por isso apresentavam todas uma guanina (G) na sua extremidade 3'. As diferenças entre as sondas incidiam essencialmente no tamanho das sequências 15, 20, 25 e 30 bp, respetivamente, sendo que as duas últimas têm a particularidade de, para além da sequência específica, apresentarem 10 adeninas na extremidade -5' logo a seguir ao grupo tiol (**figura 4.3**). A inserção desta sequência poli-A surge de modo a contrariar um possível impedimento estérico, dada a proximidade entre os oligonucleótidos ao redor da superfície da AuNP.

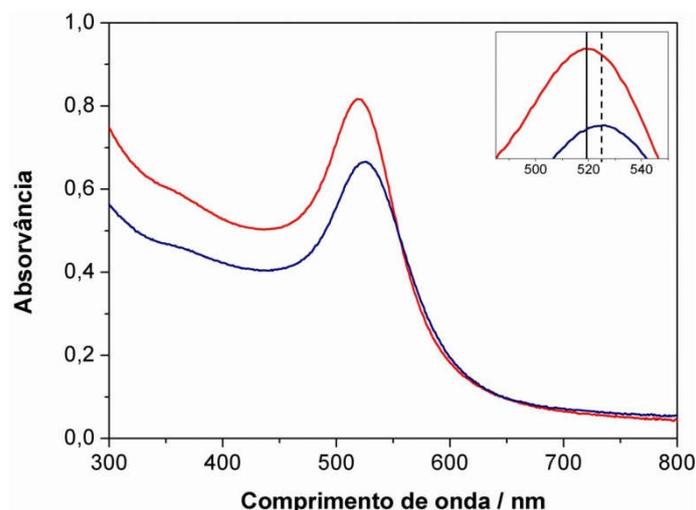


**Figura 4. 3 – Desenho das sondas e do ensaio colorimétrico aplicado às AuNP-15.** Representação de uma sequência incompleta do fragmento do gene *LCT* "*wild-type*" no sentido *forward*, com destaque para a região onde está localizado o SNP C/T na posição -13910.

Relativamente aos ensaios colorimétricos, as nanossondas (AuNP + oligonucleótido) representadas na figura irão hibridar com fragmentos *LCT* "*wild-type*" e com SNP com cerca de 345 bp, resultantes da amplificação de amostras clínicas cujo genótipo era previamente conhecido por sequenciação de *Sanger*. Depois de selecionadas as amostras, apenas se usaram as relativas a pacientes que possuíam homozigotia, ou seja, CC ou TT.

#### 4.3.4 Formação e caracterização das nanossondas esféricas (nanossondas-15)

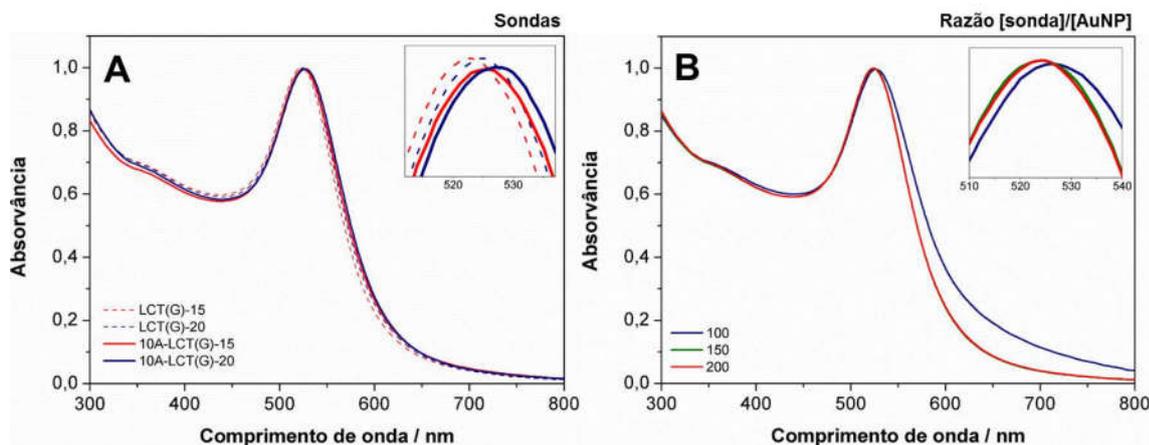
A funcionalização de AuNP-15 processou-se através da substituição dos iões citrato presentes à superfície pelas diferentes sondas *LCT* tioladas. À exceção do decréscimo registado no valor da absorvância, relativo provavelmente à perda de algumas nanossondas nas lavagens por centrifugação, a alteração de revestimentos, de um modo geral, não provocou alterações relevantes ao nível do espetro de UV-vis (**figura 4.4A**).



**Figura 4. 4 – Formação das nanossondas esféricas.** Espetros UV-Vis das AuNP-15 após a síntese, revestidas com iões citrato (linha a vermelho) e após a funcionalização com moléculas de DNA – oligonucleótidos tiolados (linha a azul). Destaque para os máximos de absorvância, onde  $\lambda_{\text{máx}}$  (LSPR vermelho) = 520 nm e  $\lambda_{\text{máx}}$  (LSPR azul) = 526 nm.

Porém, numa análise mais detalhada (imagem em destaque), percebe-se que a banda LSPR característica das AuNP-15 situada a 520 nm, sofreu um pequeno deslocamento para o vermelho. Após a formação da nanossonda, a LSPR desviou cerca de 5-6 nm, apresentando assim um máximo de absorvância da LSPR a 526 nm.

Estes deslocamentos revelaram estar em conformidade com o tamanho dos oligonucleótidos (15, 20, 25 e 30 bp), que conseqüentemente parecem conduzir a um aumento de volume da AuNP detetado pelo espectrofotómetro, como se pode constatar na **figura 4.5A**.



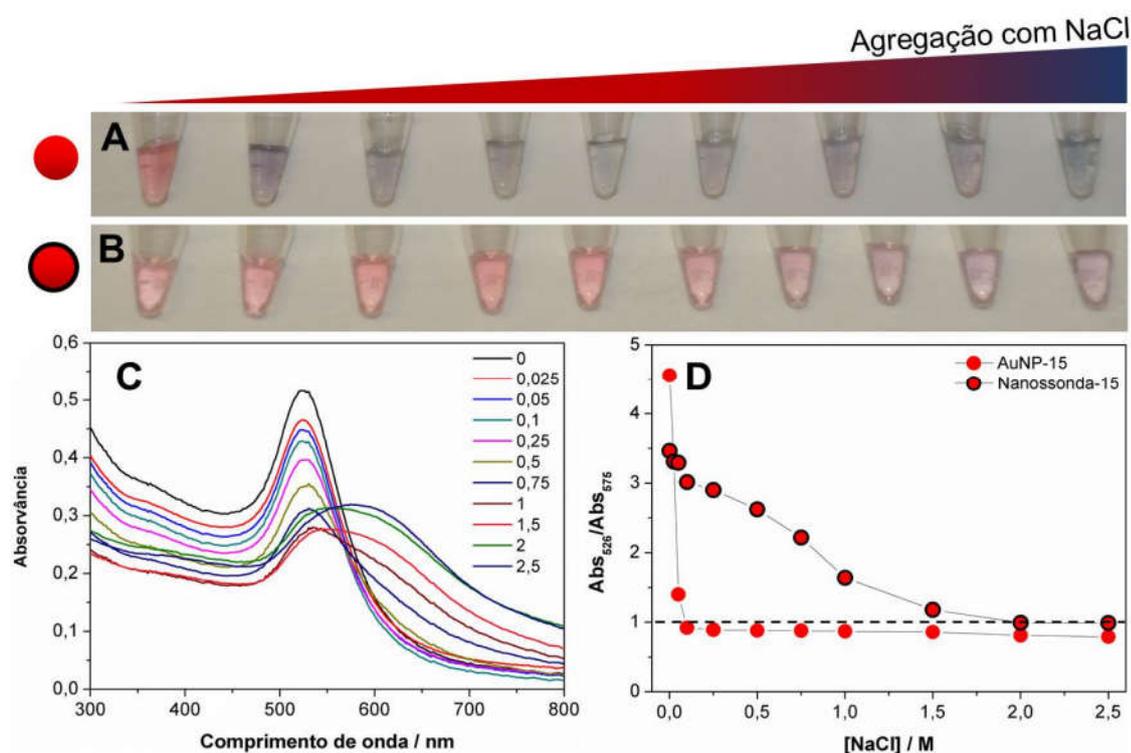
**Figura 4. 5 – Formação das nanossondas esféricas.** Espectros UV-Vis das nanossondas **(A)** à razão de 200, nas quais se fez variar a sonda (as sondas representadas a **vermelho** partilham a mesma sequência específica, bem como a **azul**, diferindo entre elas a presença de sequência poli-A; **(B)** nas quais se fez variar a razão [sonda]/[AuNP] usando a *LCT-20*.

Registou-se assim um desvio regular de cerca de 2-3 nm, a cada 5 bp que cada sonda continha adicionalmente (destaque na **figura 4.5A** para as sondas de 15 e 20 bp). Estas sondas modificadas alteraram as características da superfície das AuNP, conferindo-lhes maior estabilidade relativamente à força iónica. Este aspeto foi de facto confirmado ao ponto de, após a formação das nanossondas à razão de 200 oligonucleótidos por AuNP, ter-se verificado que a indução da agregação por aumento da força iónica era praticamente impossível, mesmo para valores de concentração de NaCl superiores a 2,5 M, inviabilizando a sua utilização num ensaio colorimétrico. Face ao sucedido, optou-se por preparar novas nanossondas usando razões [sonda]/[AuNP] inferiores (100 e 150), cujo resultado da sua caracterização espectrofotométrica está representado na **figura 4.5B**.

A formação das nanossondas a razões mais baixas foi uma vez mais bem-sucedida, embora para à razão [sonda]/[AuNP-15] de 100, se tenha observado com o tempo, um ligeiro escurecimento do coloide e alguma precipitação no fundo de cada *ependorf*. Estas evidências fizeram levantar a suspeita de que a superfície das AuNP-15 não estaria totalmente estabilizada, isto é, revestida com oligonucleótidos e, dada a concentração de eletrólitos (NaCl) que foram usados no processo de funcionalização, possivelmente estariam a provocar uma progressiva agregação das AuNP-15. Em contrapartida, a nanossonda com razões 150 apresentava um espetro muito semelhante ao obtido para a razão 200, ambas as soluções mantinham a cor vermelha característica, ainda que nesta última a densidade de moléculas de DNA fosse superior. Nos ensaios de hibridação optou-se então por utilizar as nanossondas à razão de 150.

#### 4.3.5 Estabilidade da nanossonda em função da força iónica e determinação da concentração mínima de sal para a indução da agregação

O estudo prévio da estabilidade das AuNP-15 que deram origem às nanossondas esféricas foi elaborado apenas como mais uma forma de confirmação da funcionalização. Assim, e em consonância com os dados da literatura, concluiu-se que na ausência de sal, os coloides de AuNP-15 apresentavam-se estáveis (solução vermelha), no entanto na presença de concentrações crescentes de NaCl, o coloide sofria alterações abruptas de cor, demonstrando agregação (solução azul) a concentrações muito baixas. Este fenómeno pode ser confirmado visualmente através da **figura 4.6A**, bem como espectrofotometricamente na **figura 4.6D**, onde se deteta que logo à concentração de 0,1 M de NaCl, os valores de  $R(Abs)$  já eram inferiores à unidade.



**Figura 4. 6 – Estabilidade das AuNP-15 e das nanossondas-15 na presença de NaCl.** Alteração visível a “olho nu” da cor dos coloides de AuNP-15 (**A**) e das respetivas nanossondas (**B**), ambas na presença de um gradiente crescente de NaCl. (**C**) Análise espectrofotométrica das nanossondas representadas em B. (**D**) Comparação da estabilidade coloidal entre AuNP e nanossondas, atendendo à razão de absorvâncias entre a absorvância da LSPR na forma estável ( $\lambda = 526$  nm) e na forma agregada ( $\lambda = 575$  nm).

Por outro lado, após a formação das nanossondas à razão de 150 sondas por AuNP, confirmou-se que os oligonucleótidos tiolados conferem de facto, um aumento significativo da estabilidade às AuNP. Prova disso foi a visível manutenção da cor vermelha das nanossondas em quase toda a gama de concentrações de NaCl (**figura 4.6B**). Simultaneamente a nível espectrofotométrico (**figura 4.6C**), o deslocamento/alargamento da banda LSPR só se manifestou para valores de concentração de sal superiores a 1 M, pelo que até este valor a  $R(Abs) > 1$ , indicando que a maioria das nanossondas

permaneceram estabilizadas. As nanossondas consideraram-se agregadas, segundo os valores de  $R(Abs)$  apenas a partir dos 2 M, tendo-se definido este valor de concentração de NaCl, como concentração mínima para a indução da agregação das nanossondas. A caracterização colorimétrica das restantes nanossondas à razão de 150 foi efetuada utilizando o mesmo gradiente de concentração de NaCl. Na **tabela 4.3** apresentam-se os valores relativos à concentração mínima de sal necessária à indução de agregação de cada nanossonda.

**Tabela 4. 4** – Valores da concentração de NaCl mínima necessária para a indução de agregação de nanossondas preparadas à razão de 150.

<b>Nanossonda</b>	<b>[NaCl]<sub>min</sub> para induzir agregação / M</b>
<b>LCT-15</b>	1,5
<b>LCT-20</b>	2
<b>10A-LCT-15</b>	2,5
<b>10A-LCT-20</b>	3

Após a determinação da concentração de NaCl mínima necessária para promover a agregação das nanossondas, verificou-se que à medida que o tamanho da sonda aumenta, ou seja, o número de nucleótidos das respetivas sequências, a concentração de NaCl requerida para as desestabilizar, aumenta na mesma proporção. As nanossondas demonstram maior sensibilidade à força iónica quando à mesma razão de sondas por AuNP, estão revestidas por oligonucleótidos mais pequenos.

#### **4.3.6 Eventos de hibridação e deteção do SNP (C/T -13910) com nanossondas-15**

Depois de estudada a estabilidade das nanossondas-15, procedeu-se à caracterização da sua capacidade de deteção na presença dos alvos homocigóticos (CC e TT) associados à IL, segundo o método de *non-cross-linking*.

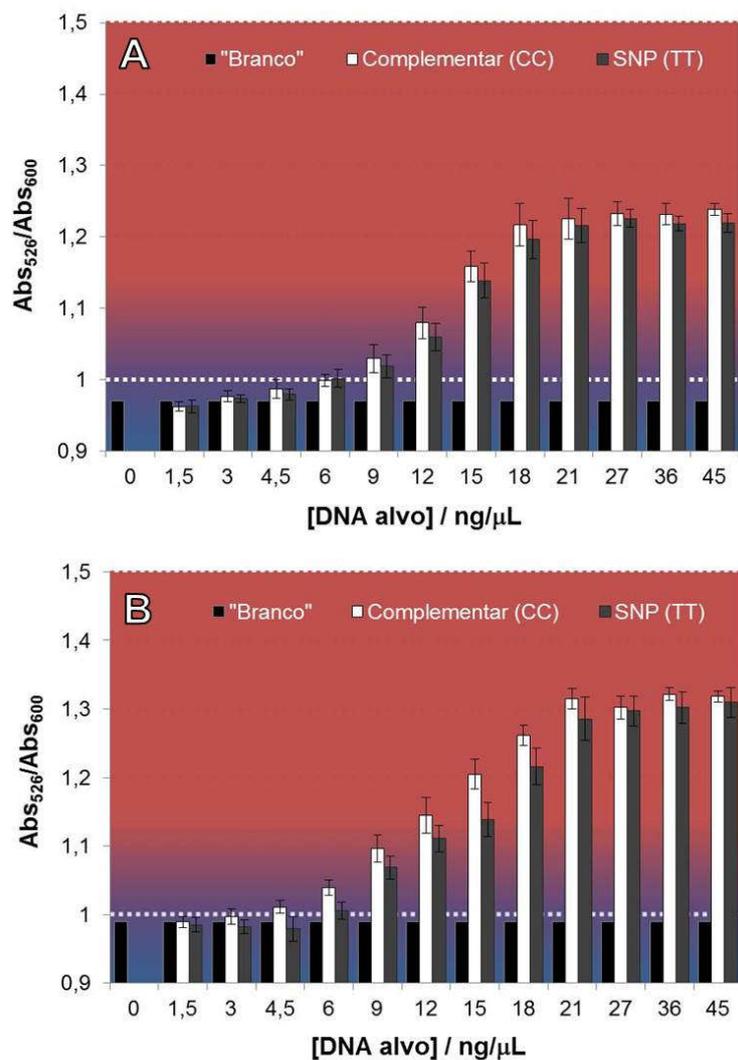
Cada ensaio consistiu na reação de hibridação de três soluções-teste: "**Branco**" que continha apenas a nanossonda; "**Complementar (CC)**", a nanossonda e o dsDNA alvo complementar e "**SNP (TT)**" a nanossonda e o dsDNA alvo que possuía o polimorfismo C/T -13910.

Depois da desnaturação / hibridação do dsDNA alvo e da posterior adição de sal, esperava-se que, passados 15 minutos as soluções-teste "Branco" e "SNP (TT)" mudassem de cor, de vermelho para azul e a "Complementar (CC)" preservasse a cor vermelha. Em determinados casos, estas mudanças de cor eram visíveis a "olho nu", contudo, foram sempre confirmadas através da aquisição de espectros visíveis, nos quais a banda LSPR passaria a absorver a cerca de 575 nm, com um concomitante decréscimo da intensidade da ressonância plasmónica original a 526 nm.

Com base nestes ensaios colorimétricos, pretendeu-se então averiguar qual das nanossondas-15 (com 15 ou 20 nucleótidos, com ou sem sequência poli-A) promovia a discriminação mais eficiente

dos alvos homozigóticos - produtos de *PCR* com cerca de 345 bp. A indução da agregação das nanossondas à respetiva  $[NaCl]_{min}$  necessária, permitiu também seleccionar consoante a amostra, qual a sonda que originava uma alteração “visível” de cor. Em simultâneo, analisou-se numa vasta gama de valores de concentração de DNA alvo, quais as que resultavam em respostas válidas por parte do biossensor.

Nas **figuras 4.7** (*LCT-15 / 10A-LCT15*) e **4.8** (*LCT-20 / 10A-LCT20*) apresentam-se os resultados dos ensaios, nomeadamente as razões de absorvância,  $R(Abs)$  obtidas para cada nanossonda-15 na presença de diferentes concentrações de dsDNA (complementar ou SNP), cujos valores variaram entre os 1,5 e os 45 ng/ $\mu$ L. Para além disso, de acordo com os critérios pré-estabelecidos na **secção 4.3.2**, ou seja, através dos intervalos de  $R(Abs)$ , foi possível identificar no fundo do próprio gráfico, a coloração final do coloide. A solução-teste “branco” de cada ensaio é única para cada nanossonda e  $R(Abs)$  deve ser sempre inferior a 1 para ser considerado um ensaio válido.



**Figura 4.7 – Ensaio colorimétrico das nanossondas-15 na presença de um gradiente de concentrações de DNA alvo.** Nanossondas-15 preparadas com a sonda *LCT-15* (A) e *10A-LCT-15* (B) à razão [sonda]/[AuNP-15] de 150. Eventos de hibridação na ausência e presença de produtos de *PCR* provenientes de amostras homocigóticas, cujas sequências são complementares (CC) ou apresentam na posição -13910 o SNP (TT). Gama de valores de concentração de DNA alvo estudados compreendidos entre 1,5 e 45 ng/μL. Valores de R(Abs) para os ensaios com nanossonda a ~2,5 nM em TF pH=8. Indução de agregação através da adição de NaCl a 1,5 M (A) e 2,5 M (B). Leitura das absorvâncias efetuada 15 minutos após a adição de sal.

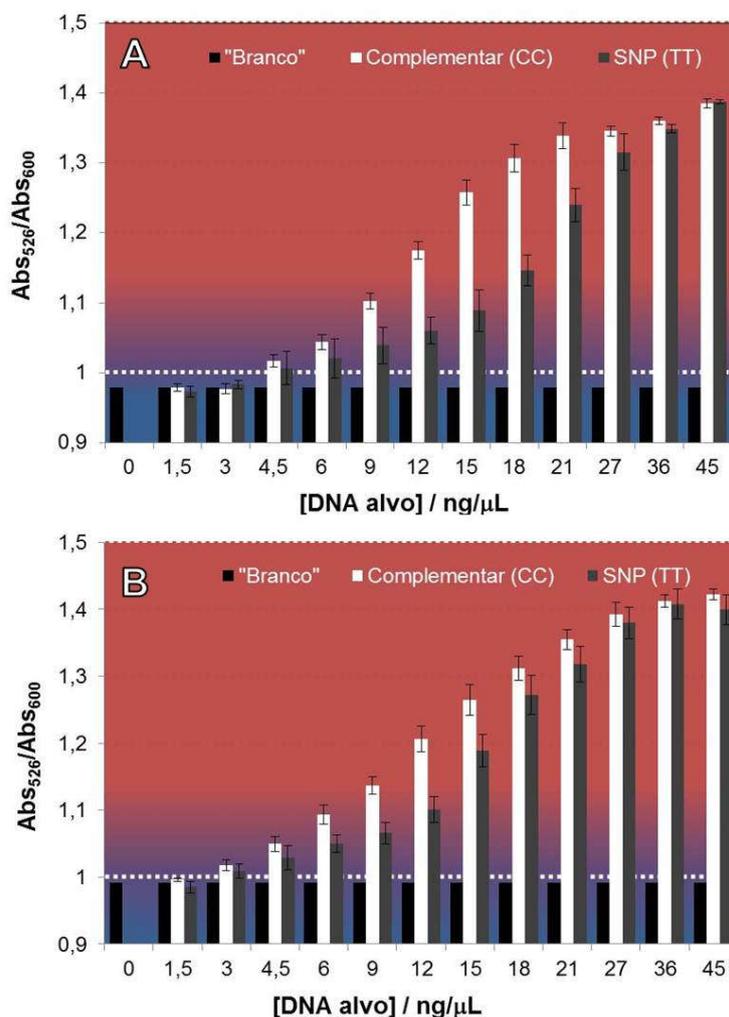
Ambas as nanossondas-15 representadas na **figura 4.7** partilhavam uma sequência de 15 nucleótidos específica ao alvo complementar (15/15 nucleótidos na *LCT-15* e 15/25 na *10A-LCT-15*) pelo que na presença do alvo com o SNP, apenas um nucleótido não era compatível (14/15 e 14/25).

De um modo geral, embora os resultados apresentados demonstrem diferenças entre o alvo complementar e que tem o SNP, estes devem ser devidamente discutidos de acordo com as R(Abs), pois face aos parâmetros estabelecidos, a diferenciação colorimétrica não é suficientemente significativa para obter um tipo de detecção visível a “olho nu”.

Em ambos os casos, as sequências aparentam ser demasiado curtas para que a hibridação ocorra de forma discriminada. Aliás, independentemente da amostra, só a partir de concentrações acima dos 9 ng/ $\mu$ L, se começou efetivamente a detetar hibridação. Em contrapartida, para valores acima dos 18 ng/ $\mu$ L, a concentração de DNA alvo adicionada é tão elevada, que se traduz num reforço da estabilidade da AuNP, possivelmente por adsorção não específica de moléculas de DNA. Em sistemas de análise de DNA semelhantes, este comportamento é normal já que existe um valor máximo a partir do qual a superfície das nanossondas se apresenta saturada com alvos hibridados. Esta estabilização ocorre devido às interações eletrostáticas entre as cargas negativas dos grupos fosfato.

A sonda *LCT-15* não promoveu discriminação dos alvos praticamente em toda a gama de concentrações estudada. No entanto, a presença da sequência poli-A junto à superfície da AuNP na sonda *10A-LCT-15* parece ter melhorado ligeiramente a deteção, ao tornar a sequência específica mais disponível para a hibridação, aumentando conseqüentemente a diferenciação entre os alvos. Ainda que a deteção não fosse visível “a olho nu”, espectrofotometricamente constatou-se que ambas as nanossondas têm uma maior capacidade de resposta numa gama de concentrações entre os 9-15 ng/ $\mu$ L, já que a diferença entre as  $R(Abs)$  entre amostras é maior.

Em contrapartida, nos ensaios com as nanossondas-15 cujas sequências possuíam 20 nucleótidos específicos ao alvo complementar (*LCT-20* e *10A-LCT-20*), os quais foram efetuados exatamente sob as mesmas condições, à exceção da força iónica que teve de ser adequada a cada uma das nanossondas (**tabela 4.4**) foram obtidos os resultados apresentados na **figura 4.8**.



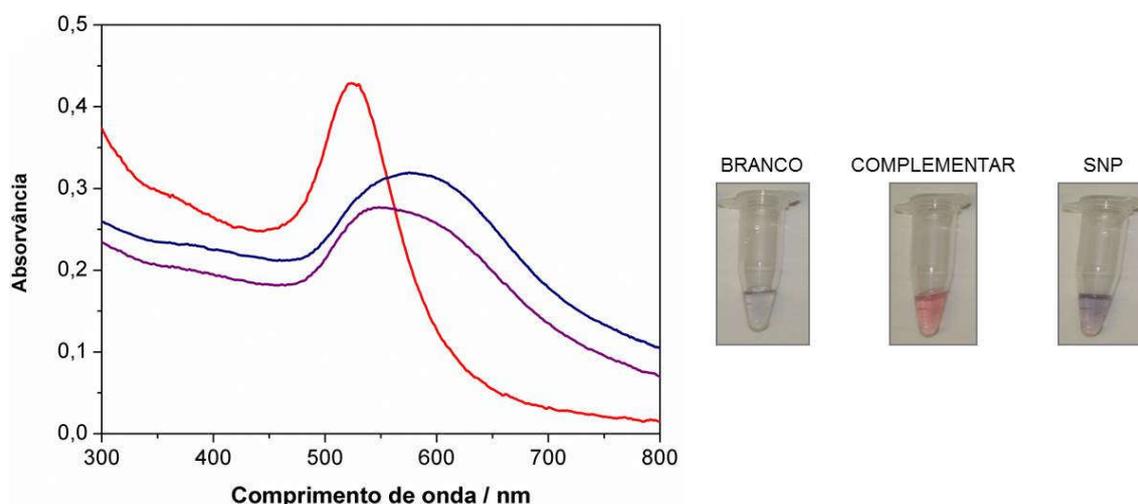
**Figura 4. 8 – Ensaios colorimétricos das nanossondas-15 na presença de um gradiente de concentrações de DNA alvo.** Nanossondas-15 preparadas com a sonda *LCT-20* (A) e *10A-LCT-20* (B) à razão [sonda]/[AuNP-15] de 150. Eventos de hibridação na ausência e presença de produtos de *PCR* provenientes de amostras homocigóticas, cujas sequências são complementares (CC) ou apresentam na posição -13910 o SNP (TT). Gama de valores de concentração de DNA alvo estudados compreendidos entre 1,5 e 45 ng/μL. Valores de  $R(Abs)$  para os ensaios com nanossonda a ~2,5 nM em TF pH=8. Indução de agregação através da adição de NaCl a 2 M (A) e 3 M (B). Leitura das absorvâncias efetuada 15 minutos após a adição de sal.

Embora os valores de  $R(Abs)$  obtidos nos ensaios com o alvo complementar não difiram muito entre as duas nanossondas-15 (*LCT-20* e *10A-LCT-20*), as maiores diferenças observam-se com o alvo que contém o polimorfismo (TT). Concluiu-se desde logo que a sequência poli-A não introduziu nenhuma vantagem no que diz respeito à discriminação, na medida em que as diferenças entre alvos são pequenas. O que efetivamente contribuiu para tal, são mesmo os 20 nucleótidos da sequência específica. A diferenciação de valores  $R(Abs)$  entre alvos é visivelmente superior para a nanossonda-15 (*LCT-20*) numa gama de concentrações situada entre os 9-18 ng/μL. Face às nanossondas-15

anteriores (*LCT-15* e *10A-LCT-15*), o facto de estas possuírem mais 5 nucleótidos complementares aos alvos, parece representar um aspeto favorável para a reação de hibridação.

Ainda assim, a baixas concentrações de DNA alvo (1,5-6 ng/μL) a percentagem de alvos hibridados continuou reduzida, acabando por ocorrer a agregação de ambas as nanossondas e consequentemente não ser possível considerar as diferenças registadas entre as R(Abs). Contudo, registou-se uma ligeira melhoria com a *10A-LCT-20* que pode estar relacionada com o facto de esta possuir uma sequência de 10A e a curvatura da AuNP ser favorável para que a sequência específica estivesse mais disponível. A saturação de DNA alvo à superfície da nanossonda persistiu para valores de concentração acima dos 21 ng/μL, inviabilizando de imediato a deteção, pois o excesso de DNA, como foi dito anteriormente, acaba por estabilizar a NP impedindo que esta agregue. Deste modo, embora se esperasse que a sonda *10A-LCT-20* fosse responsável por uma discriminação colorimétrica mais diferenciada, foi mesmo a *LCT-20* que deu origem a ensaios de deteção do SNP visíveis a “olho nu”. A gama de concentrações de DNA alvo, sob a qual o sistema operou com maior eficiência foi compreendida entre 9-15 ng/μL, corroborando os resultados obtidos com a sonda *10A-LCT-15*.

Segundo os parâmetros estabelecidos para que uma deteção seja validada, os valores de concentração à qual se alcançou a discriminação dos alvos foi de 12 e 15 ng/μL. Prova disso são as cores exibidas pelas soluções-teste à concentração de 12 ng/μL, confirmadas igualmente por espectrofotometria representadas na **figura 4.9**



**Figura 4. 9 – Ensaio colorimétrico usando a nanossonda *LCT-20*.** Espectros UV-Vis das soluções-teste: “Branco” (linha a azul), “Complementar” (linha a vermelho) e “SNP” (linha a roxo) medidos 15 minutos após a adição de NaCl 2M. Todas as soluções-teste continham a nanossonda *LCT-20* e as que continham amostras de DNA alvo, estas encontravam-se à concentração de 12 ng/μL. Respetivas fotografias das soluções-teste, nas quais se verifica a diferença de cores (azul-vermelho-roxo).

A deteção colorimétrica das amostras de DNA apresentou agregação diferencial suficiente para que fosse possível a distinção dos respetivos alvos. Na presença do alvo complementar, a sua

hibridação foi total relativamente à sequência *LCT-20* da nanossonda (solução-teste “complementar”). Esta situação conduziu a uma estabilização “adicional” por parte do fragmento, já que a partir de um certo número de moléculas de DNA à sua volta, a nanossonda foi capaz de resistir à força iónica que era imposta ao sistema e manter a sua estabilidade e cor vermelha características ( $R(Abs) > 1$ ). Já na presença do fragmento de 345 bp com o SNP, a hibridação decorreu de modo parcial (solução-teste “SNP”); tal foi devido à existência do desemparelhamento de um par de bases na extremidade 5’ da sequência *LCT-20* (um único polimorfismo: uma timina em vez de uma citosina), que criou um foco de destabilização da nanossonda, levando à diminuição das repulsões eletrostáticas e por conseguinte à agregação das nanossondas. No entanto, esta destabilização revelou não ser suficiente para que a nanossonda agregasse totalmente para valores  $R(Abs) < 1$ . O teste “SNP” em termos de razões de absorvância ficou situado no intervalo  $1 < R(Abs) < 1,1$  o que para efeitos de discriminação visual não é totalmente esclarecedor. No entanto, os dados espectroscópicos não deixam dúvidas, obteve-se à concentração de 15 ng/ $\mu$ L uma diferença máxima de valores entre a  $R(Abs)$  do teste “complementar” e a  $R(Abs)$  do teste “SNP” de cerca de 0,18.

## **NANOBIOSSENSOR COLORIMÉTRICO DE DNA USANDO NANOPARTÍCULAS NÃO ESFÉRICAS**

### **4.3.7 Síntese e caracterização das AuNS**

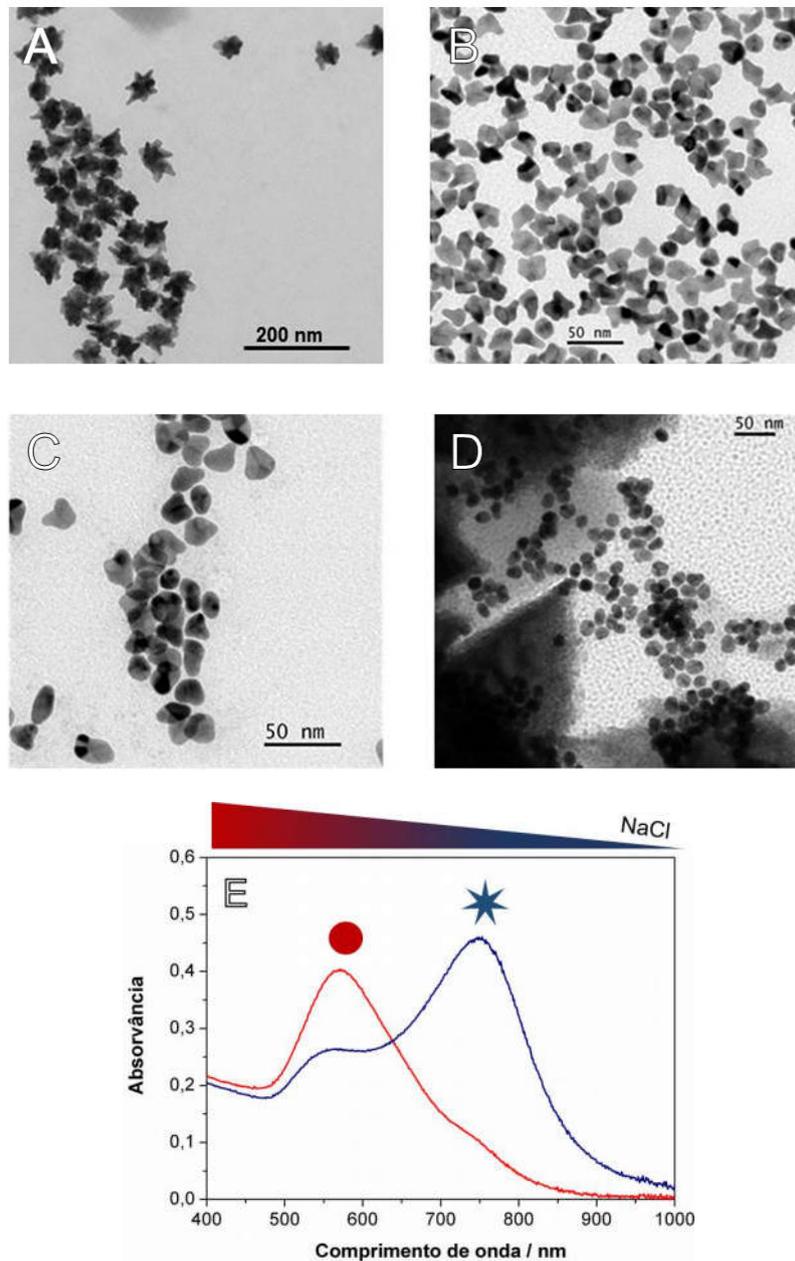
No âmbito do desenvolvimento de um biossensor colorimétrico mais sensível, recorreu-se ao uso de NP não esféricas. Selecionaram-se as nanoestrelas de ouro (AuNS), sendo a sua caracterização discutida no capítulo 3, secção 3.3.2.4.

### **4.3.8 Avaliação da estabilidade coloidal aplicada ao sistema colorimétrico**

Este novo sistema baseou-se no mesmo princípio colorimétrico descrito anteriormente (secção 4.3.2), ou seja, na razão de absorvâncias entre a banda LSPR relativo às AuNP na forma estável e a banda correspondente à forma agregada, definido por  $R(Abs)$ . Este parâmetro permitiu não só avaliar o efeito do sal nas AuNS/nanossondas-S, como também revelar o resultado da deteção.

Todavia, como se tratava de um coloide cujas NP apresentavam características morfológicas totalmente diferentes das AuNP-15, previa-se que as suas propriedades óticas fossem igualmente distintas. O coloide de AuNS na sua forma estável apresentava a cor azul e, por conseguinte, duas bandas LSPR que absorviam energia a dois comprimentos de onda distintos (550 e 746 nm). A banda longitudinal centrada a 746 nm era a que manifestava maior influência na cor, uma vez que qualquer alteração morfológica (por exemplo, degradação das pontas das estrelas) ou química (alteração do RI) era imediatamente detetada através do deslocamento desta banda plasmónica. Foi com base nestes dois aspetos que a utilização do sal de NaCl para a indução da agregação destas AuNP foi posta em causa. Numa primeira análise observou-se que a solução coloidal de AuNS (azul), na presença de concentrações crescentes de NaCl sofria alterações drásticas de cor, de azul para vermelho, tendo-se

levantando a hipótese que a morfologia das AuNP se poderia estar simultaneamente a modificar. Na **figura 4.10** apresentam-se as evidências que relacionam a alteração da morfologia com a cor das soluções de AuNS.

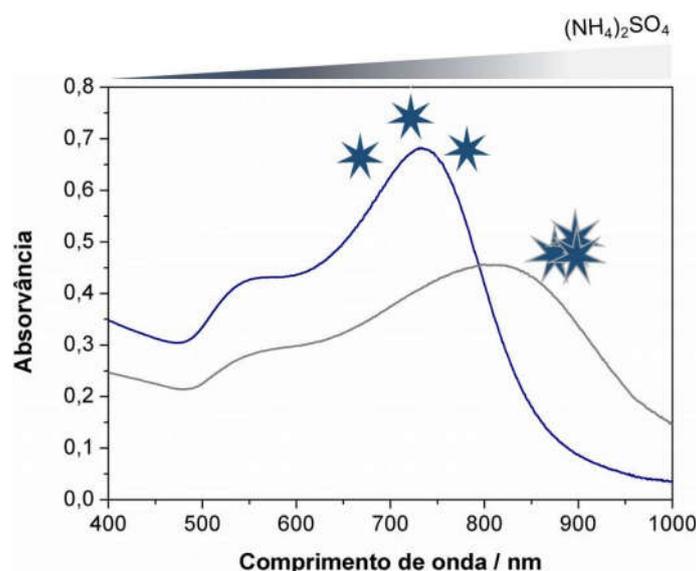


**Figura 4. 10 – Influência do aumento da concentração de NaCl na morfologia das AuNS.** Imagens de TEM representativas de 4 amostras de AuNS na presença de diferentes concentrações de NaCl (A) 0 M (B) 1 M (C) 2 M; (D) 3 M, nas quais é visível a alteração da morfologia das AuNS por oxidação das extremidades pontiagudas (A) até a sua transformação em esferas (D); espectros UV-Vis relativos às soluções coloidais A e D.

A suspeita da alteração da morfologia foi assim confirmada por TEM e por consulta da literatura, excluíram-se também todos os eletrólitos que contivessem halogenetos. De facto, relatou-se que este tipo de AuNS revestidas por PVP na presença de  $\text{Cl}^-$  sofrem oxidação, potenciada pelo  $\text{O}_2$  atmosférico.

Esta reação ocorre sobretudo ao nível das extremidades das estrelas conduzindo à sua degradação. A concentrações altas de  $\text{Cl}^-$  (3 M) a reação de oxidação ocorre de forma tão extensa, que as AuNS passam a esferas <sup>38</sup> (figura 4.10D). Espectrofotometricamente, a previsão confirmou-se através do deslocamento significativo da banda plasmónica para o azul, acompanhado do desaparecimento quase total da banda plasmónica longitudinal correspondente às pontas, passando a exibir apenas a transversal, relativa ao núcleo (figura 4.10E).

Deste modo, recorreu-se ao  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , um eletrólito de força iónica superior ao NaCl, que não alterava a morfologia da AuNS, mas cumpria devidamente a sua função de promover a agregação das AuNS <sup>39</sup> (figura 4.11)



**Figura 4. 11 – Agregação das AuNS com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .** Espectros UV-Vis com LSPR longitudinal correspondente à forma estável, representada pela linha azul ( $\lambda_{\text{máx}}= 746$  nm) a sofrer deslocamento para comprimentos de onda superiores, correspondente à forma agregada, representada pela linha cinzenta ( $\lambda_{\text{máx}} = 810$  nm).

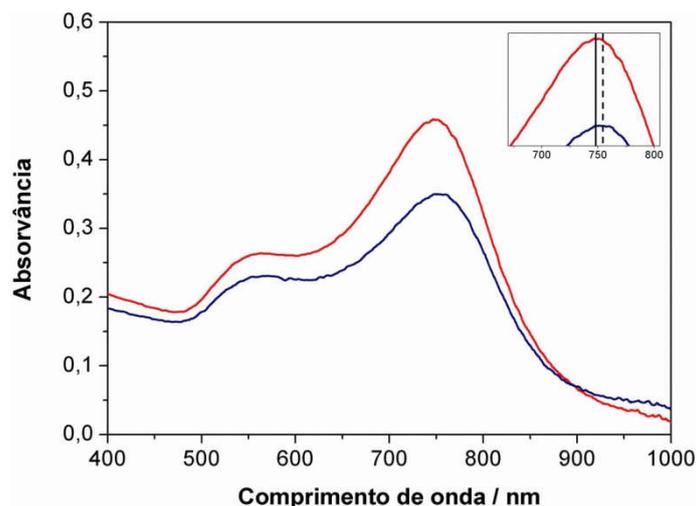
Assim, de acordo com a razão entre as absorvâncias a 746 e 810 nm, considerou-se uma vez mais que para  $R(\text{Abs}) < 1$  as AuNP/nanossondas se encontravam maioritariamente agregadas, traduzindo-se num coloide praticamente incolor (teste negativo). Para  $R(\text{Abs}) > 1,1$  as AuNP/nanossondas encontravam-se maioritariamente estabilizadas, traduzindo-se por sua vez num coloide de cor azul (teste positivo). Para valores  $1 < R(\text{Abs}) < 1,1$ , as absorvâncias apresentam uma baixa diferenciação colorimétrica entre as espécies presentes na amostra testada (coloide de cor cinza).

#### 4.3.9 Formação de nanossondas de nanoestrelas de ouro (nanossondas-S)

Antes de serem abordados os resultados relativos à formação das nanossondas-S, é necessário salientar que embora se soubesse o efeito que o NaCl causava na morfologia das AuNS, este foi usado no processo de *salt aging*, nomeadamente para promover a ligação ordenada dos oligonucleótidos à sua superfície metálica. Este aspeto não foi alterado pois é sabido que assim que os

oligonucleótidos entram em contacto com a AuNS, começam imediatamente a adsorver à superfície destas NP e ao fim de 2 horas a sua superfície estará à partida coberta e “protegida” da ação do sal por parte das moléculas de ssDNA tioladas.

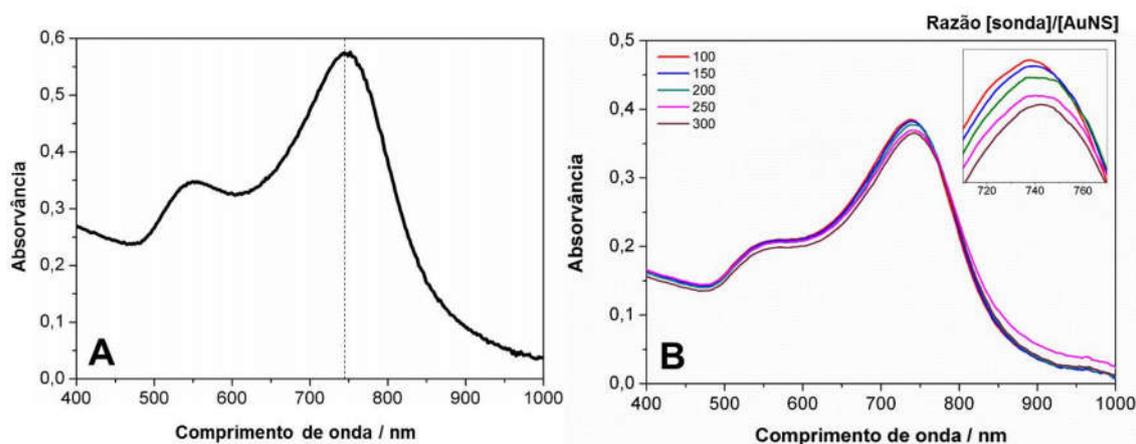
Inicialmente procedeu-se à funcionalização das AuNS com DNA em excesso, pelo que através da **figura 4.12**, a qual representa o antes e depois da funcionalização (acompanhada de *salt aging* com NaCl), se confirma que quando as AuNS possuem um elevado número de oligonucleótidos capaz de as estabilizar, a oxidação das pontas por parte do NaCl, nas concentrações usadas no processo de *salt aging*, é completamente evitada.



**Figura 4. 12 – Formação das nanossondas-S.** Espectros UV-Vis do coloide de AuNS (linha vermelha) e da nanossonda-S (linha azul), após funcionalização com (excesso) de sonda LCT-20 e seguida do processo de “*salt aging*”.

A principal alteração decorrente da substituição do revestimento original (PVP) das AuNS pela sonda LCT-20 foi o deslocamento de aproximadamente 6 nm da banda LSPR longitudinal. Embora não muito pronunciado, este deslocamento deveu-se à presença de oligonucleótidos em excesso, que ao estabilizar a AuNS contrariou a alteração da sua morfologia.

No entanto, testou-se a formação das nanossondas com diferentes razões (100, 150, 200, 250 e 300) de modo a perceber qual a razão mínima necessária para se obter uma nanossonda estável coloidal e morfologicamente. O resultado da funcionalização foi de novo avaliado por espectrofotometria UV-Vis (**figura 4.13**).

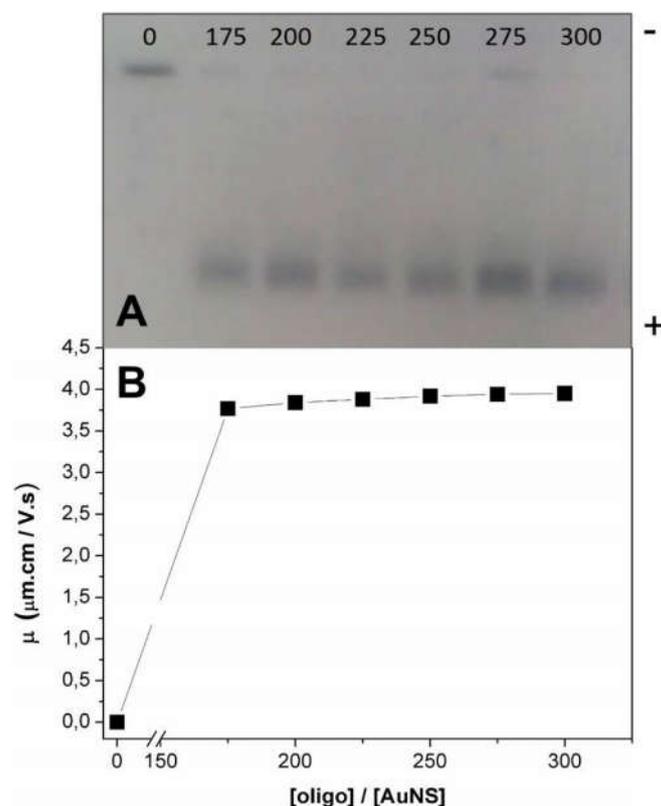


**Figura 4. 13 – Formação das nanossondas em forma de estrela.** Espectros UV-Vis do coloide de AuNS **(A)** antes da funcionalização e **(B)** depois da funcionalização usando diferentes razões [oligonucleótido]/[AuNP].

A alteração de revestimento e subsequente aumento da força iónica (até à concentração de 0,3 M) inerente a todo o processo de funcionalização, de um modo geral, parece não ter provocado alterações relevantes ao nível do espectro, uma vez que a banda longitudinal se mantém.

No entanto, por comparação com o espectro UV-Vis das AuNS antes da funcionalização (**figura 4.13A**), o qual exibia a LSPR a 746 nm verifica-se nos espectros das nanossondas às razões de 100 e 150 que ocorreram pequenos desvios para o azul, de cerca de 9 nm ( $\lambda_{LSPR} = 737$  nm) e 5 nm ( $\lambda_{LSPR} = 741$  nm), respetivamente. Muito provavelmente estes deslocamentos resultaram do facto de àquelas razões, o número de oligonucleótidos não ser suficiente para impedir que, ainda que de forma pouco pronunciada, ocorresse a degradação das pontas. A partir da razão 200 parece haver uma estabilização morfológica e coloidal das nanossondas, que se mantém às restantes razões (250 e 300). Relativamente às AuNS, o deslocamento promovido após a formação das nanossondas à razão de 200 é de cerca de 5 nm.

Ultrapassado o problema da estabilidade morfológica na formação das nanossondas, pretendeu-se otimizar a razão [oligonucleótido]/[AuNS] a ser aplicada nos ensaios de deteção, ou seja, qual o número máximo de oligonucleótidos que uma AuNS consegue adsorver à sua superfície. Para tal, recorreu-se à técnica de eletroforese em gel de agarose horizontal, sendo que se testaram razões compreendidas entre 175 até 300, com intervalos de 25 oligonucleótidos por cada nanossonda. Os resultados relativos à análise do gel, bem como a fotografia do mesmo apresentam-se na **figura 4.14**.



**Figura 4. 14** – Análise electroforética da mobilidade das nanosondas a diferentes razões [oligonucleótido]/[AuNS].

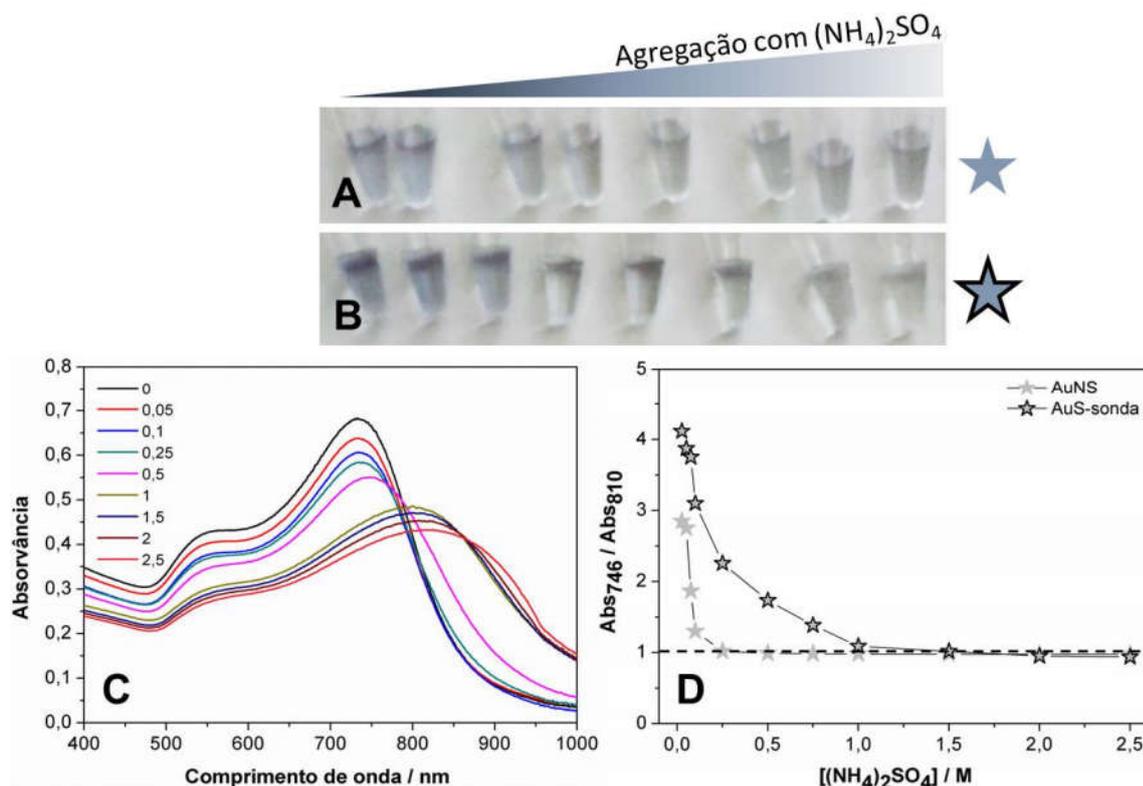
A utilização desta técnica permitiu avaliar a migração das nanosondas ao longo do gel, de acordo com a sua carga superficial e o tamanho da NP. Na ausência de ssDNA, as AuNS possuíam originalmente moléculas de PVP, constituídas por monómeros de carga neutra. Por outro lado, após a formação das nanosondas e à medida que a razão de oligonucleótidos por AuNS era aumentada, previa-se que a adição de cada biomolécula carregada negativamente fizesse aumentar a carga superficial relativa da AuNS.

Aplicado o potencial, no primeiro poço verifica-se que na ausência de oligonucleótidos, dada a carga neutra conferida pelo PVP, as AuNS não migraram e ficaram retidas no poço. As nanosondas, por sua vez, permaneceram estáveis e sua migração foi visível (**figura 4.14A**). Através da adsorção de moléculas de DNA, as AuNS foram adquirindo um maior número de cargas negativas á sua volta, fazendo com que estas se migrassem mais rapidamente na direção do eletrodo com carga oposta. Observou-se, portanto, uma migração gradualmente mais lenta à medida que a razão molar de oligonucleótidos relativamente a AuNS aumentava, atingindo-se um patamar à razão de 250 que se manteve até à razão 300 (**figura 4.14B**). Com base nos resultados obtidos constatou-se que a aplicação das nanosondas no gel de agarose foi bem-sucedida e que a razão [oligonucleótido]/[AuNS] a usar nos ensaios de deteção colorimétrica seria de 250.

#### 4.3.10 Estabilidade da nanossonda-S em função da força iônica e determinação da concentração mínima de sal para indução da agregação

O estudo da estabilidade das AuNS e da nanossonda-S foi efetuado em paralelo como meio de validação da formação da nanossonda e determinação da concentração mínima de sal necessária para induzir a sua agregação.

O aumento da força iônica traduziu-se em alterações nas propriedades óticas das AuNS, sendo que este fenómeno foi mais uma vez confirmado visualmente através da alteração de cores das soluções coloidais de AuNS e nanossonda-S na **figura 4.15A e 4.15B**, respetivamente. A cor das soluções varia entre o azul quando esta se apresenta estável e o cinza/ausência de cor na forma agregada. Analisou-se também estas soluções por espectrofotometria UV-Vis e a partir desses dados foi possível determinar as absorvâncias máximas registadas para a banda LSPR das nanossonda-S na forma estável ( $\lambda = 746$  nm) e a banda correspondente à forma agregada ( $\lambda = 810$  nm) e por fim, traçar um gráfico da razão entre elas em função da concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  apresentado na **figura 4.10D**.



**Figura 4. 15 – Estabilidade das AuNS e das nanossondas-S na presença de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .** Alteração visível a “olho nu” da cor dos coloides de AuNS (**A**) e das respetivas nanossondas formadas à razão [oligonucleótido]/[AuNS] de 250 (**B**), ambas na presença de um gradiente crescente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . (**C**) Análise espectrofotométrica das nanossondas, representadas em B. (**D**) Comparação da estabilidade coloidal entre AuNS e nanossondas, atendendo à razão de absorvâncias entre a absorvância da LSPR na forma estável ( $\lambda = 746$  nm) e na forma agregada ( $\lambda = 810$  nm).

Numa primeira análise verifica-se que contrariamente às AuNS, a nanossonda-S mantém a cor azul a concentrações mais baixas de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mostrando resistir à agregação; sendo que as AuNS a 0,25 M já apresentam  $R(\text{Abs})$  no limite dos valores para o qual se estabeleceu a agregação  $R(\text{Abs}) < 1$ , mantendo-se dessa forma para concentrações mais elevadas de sal.

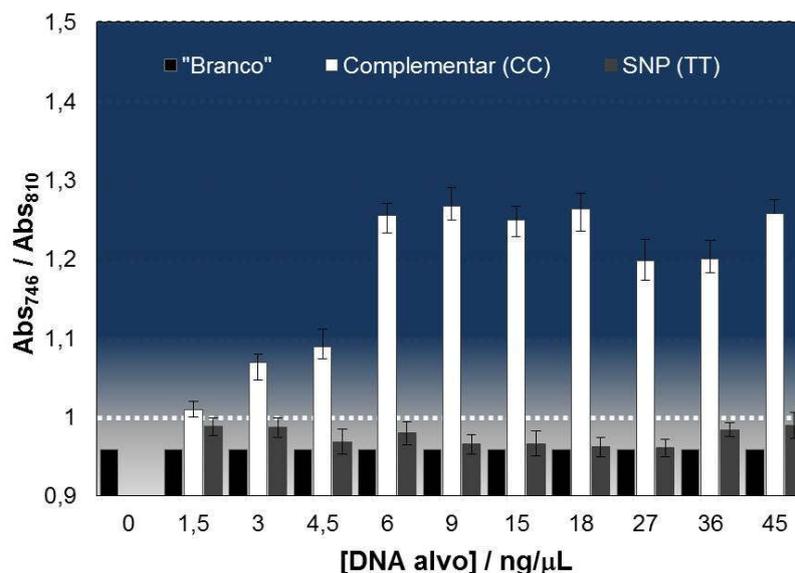
Através dos espectros da **figura 4.15C**, comprovou-se simultaneamente que o deslocamento e alargamento da banda LSPR centrada inicialmente a 746 nm, só se manifestou para valores de concentração de sal superiores a 1 M, pelo que até este valor a  $R(\text{Abs}) > 1$ , indicando que a maioria das nanossondas permaneceram estabilizadas. As nanossondas consideraram-se agregadas, segundo os valores de  $R(\text{Abs})$  apenas a partir dos 2 M, tendo-se definido este valor de concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , como o valor mínimo para induzir a agregação das nanossondas.

#### **4.3.11 Eventos de hibridação e deteção do SNP (C/T -13910) com a nanossonda-S**

Decorrido o estudo da eficiência de funcionalização das AuNS com a sonda *LCT-20* e da estabilidade da nanossonda, procedeu-se à caracterização da capacidade de deteção desta na presença dos mesmos alvos homozigóticos de DNA usados nos ensaios anteriores, segundo a abordagem *non-crosslinking*.

À semelhança da deteção com as nanossondas esféricas, cada ensaio consistiu na reação de hibridação de três soluções-teste: "**Branco**" que continha apenas a nanossonda, "**Complementar (CC)**", a nanossonda e o dsDNA alvo complementar e "**SNP (TT)**" a nanossonda e o dsDNA alvo que apresentava o polimorfismo de base única. Esperava-se que após o período de hibridação (posterior à desnaturação) e adição de sal, passados 15 minutos, as soluções-teste "Branco" e "SNP (TT)" perdessem a cor e a "Complementar" preservasse a cor azul.

Embora praticamente todos os ensaios de deteção tenham sido observados "a olho nu", efetuou-se a confirmação dos resultados por espectrofotometria UV-Vis, nos quais a banda LSPR longitudinal passou a absorver a cerca de 810 nm, observando-se simultaneamente um decréscimo da intensidade da ressonância plasmónica a 746 nm. Os resultados apresentados na **figura 4.16** dizem respeito à razão de absorvância  $R(\text{Abs})$  obtida para cada ensaio com a nanossonda-S na presença de diferentes concentrações de DNA (alvo complementar ou SNP), cujos valores variaram entre os 1,5 e os 45 ng/ $\mu\text{L}$ . Para além disso, de acordo com os critérios pré-estabelecidos na **secção 4.3.7**, ou seja, através do valor de  $R(\text{Abs})$ , é possível identificar no gráfico a coloração final do coloide, após a reação de hibridação a adição da  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]_{\text{min}}$  necessária para induzir a agregação.

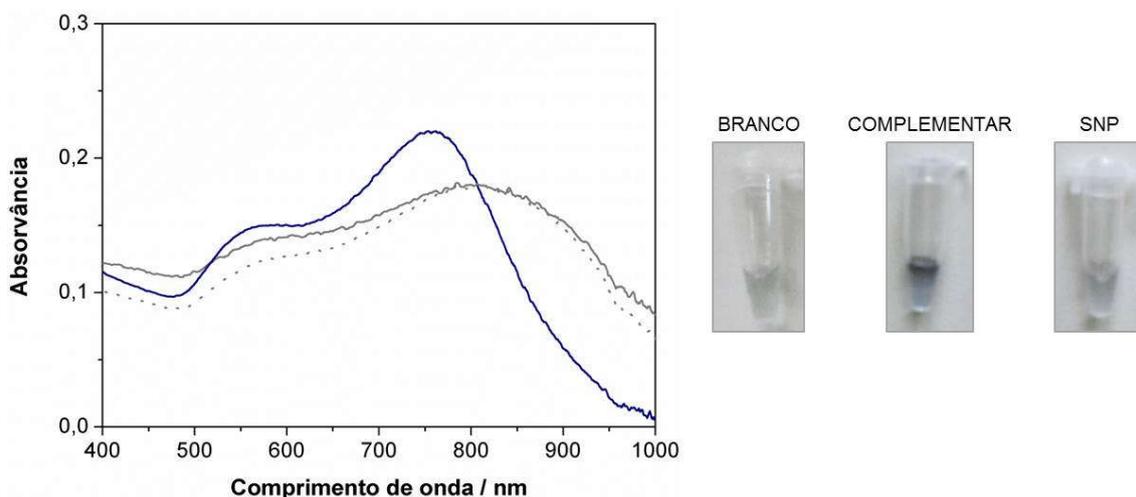


**Figura 4. 16 – Ensaio colorimétricos da nanossonda-S na presença de um gradiente de concentrações de DNA alvo.** Nanossonda-S preparadas com a sonda *LCT-20* à razão [oligonucleótido]/[AuNS] de 250. Eventos de hibridação na ausência e presença de produtos de *PCR* provenientes de amostras homocigóticas, cujas sequências são complementares (CC) ou apresentam na posição -13910 o polimorfismo C/T (TT). Gama de valores de concentração de DNA alvo estudados estavam compreendidos entre 1,5 e 45 ng/μL. Valores de  $R(Abs)$  para os ensaios efetuados com nanossonda a ~2,5 nM em TF pH=8. Indução de agregação alcançada através da adição de  $(NH_4)_2SO_4$  a 2 M. Leitura das absorvâncias efetuada 15 minutos após a adição de sal.

Os resultados obtidos nos ensaios colorimétricos demonstraram que ambas as amostras de DNA alvo hibridaram à nanossonda e que esta foi capaz de detetar o SNP em praticamente toda a gama de concentrações estudada. Os valores de concentração de DNA alvo, nos quais a deteção é colorimetricamente visível a “olho nu”, tornando este biossensor eficaz na deteção do SNP C/T -13910 estavam compreendidas entre 6 e 18 ng/μL.

A estas concentrações, as soluções-teste “Complementar (CC)” revelaram um resultado positivo ( $R(Abs) > 1$ ), manifestando-se na estabilização da nanossonda (cor azul) que ao hibridar com o alvo, tornaram-na resistente à sua suposta agregação. Por outro lado, as solução-teste “SNP (TT)” apresentam um resultado negativo ( $R(Abs) < 1$ ), demonstrando que a hibridação parcial da nanossonda ao alvo, devido ao facto de na posição do SNP as suas bases não serem complementares, não é suficiente para impedir a agregação da nanossonda.

Embora a discriminação dos alvos fosse evidente para o intervalo de concentrações acima mencionado, a diferenciação de valores  $R(Abs)$  entre alvos foi mais elevada para 9 ng/μL. Como tal são apresentados na **figura 4.17**, os espectros das soluções-teste relativos a este ensaio, bem como as cores das alíquotas resultantes, depois de decorrida a reação de hibridação e a adição de  $(NH_4)_2SO_4$ .



**Figura 4. 17 – Ensaio colorimétrico usando a nanossonda LCT-20.** Espectros UV-Vis das soluções-teste: “Branco” (linha contínua cinzenta), “Complementar” (linha contínua azul) e “SNP” (linha ponteadada cinzenta) medidos 15 minutos após a adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2M. Todas as soluções-teste continham a nanossonda LCT-20 (~2,5 nM em solução TF pH=8) e as que continham amostras de DNA alvo, estas encontravam-se à concentração de 9 ng/ $\mu\text{L}$ . Fotografias relativas às soluções-teste, nas quais se verifica a presença/ausência de cor.

A banda plasmónica longitudinal nos espectros das soluções-teste “Branco” e “SNP (TT)” sofreram ambas um deslocamento e alargamento muito pronunciado relativamente ao da solução-teste “Complementar (CC)” que, apenas sofreu um desvio para o vermelho, muito provavelmente promovido pela ligação de DNA alvo à superfície da nanossonda. Se por um lado, este ligeiro deslocamento pode estar relacionado a um eventual aumento de tamanho da AuNS, detetado espectralmente através de alguma dispersão de luz; o desvio observado para as restantes soluções-teste está relacionado com a destabilização total do coloide de nanossondas. O aspeto mais interessante neste ensaio colorimétrico, é precisamente o facto de a banda longitudinal das AuNS ser altamente sensível a alterações ao nível da sua superfície e sobretudo à distância interpartícula. Assim, à medida que o sal neutraliza as repulsões electrostáticas existentes entre as nanossondas, levando as nanossondas a aproximarem-se, o seu espectro modifica-se por completo. Neste caso, a agregação provocou o deslocamento das bandas, ao ponto das respetivas soluções (constituídas maioritariamente por nanossondas-S agregadas) passarem a absorver na região do IV. Esta situação fez com que as soluções testes “Branco” e “SNP (TT)” deixassem de absorver na região visível, e, por conseguinte, os nossos olhos passassem a ser incapazes de visualizar a cor da solução.

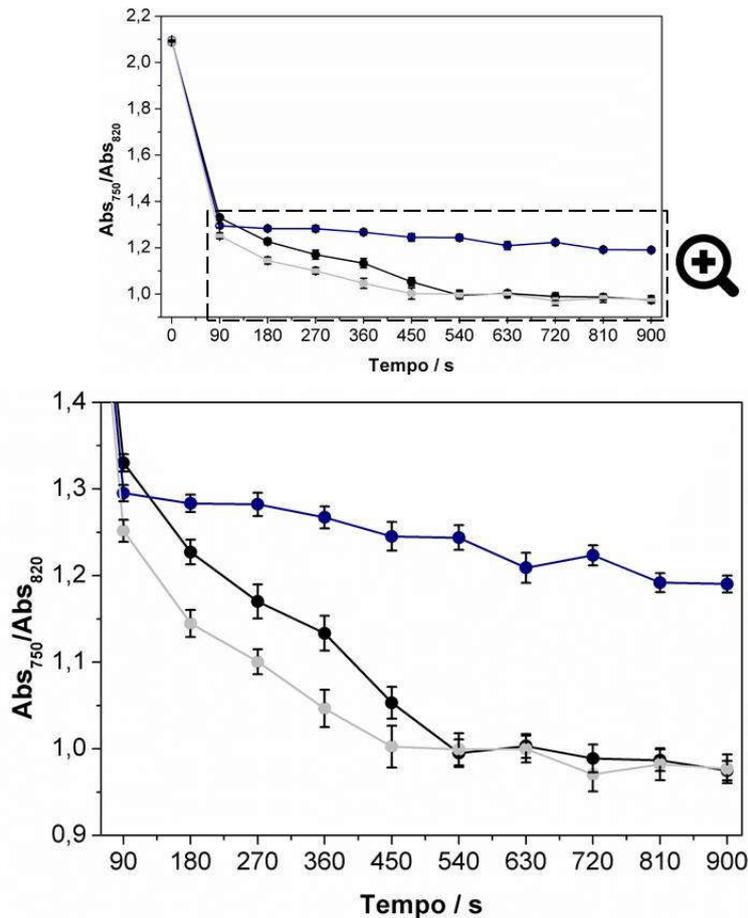
Esta abordagem representa assim, uma inovação para o ensaio, visto que o biossensor que se pretende desenvolver visa a deteção de dois alvos distintos, indicadores da presença/ausência de um SNP. A resposta deixa de ser baseada na diferença de cores (que envolve uma gama de cores intermédias) e passa a ser vista como um sistema de resposta “sim / não” associado respetivamente, à presença ou ausência de cor. Estes dados não só vieram confirmar a capacidade e eficácia da sonda LCT-20 na deteção de um polimorfismo de base única num fragmento de 345 bp, como corroborar a

teoria de que as NP não esféricas aplicadas a biossensores apresentam uma melhor resolução do que NP esféricas em métodos de detecção.

#### **4.3.12 Cinética do ensaio de detecção do SNP (C/T -13910) com a nanossonda-S**

Embora este ensaio colorimétrico envolvesse condições experimentais que compreendiam períodos de reação de cerca de 15 minutos, após a adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; como este era passível de ser acompanhado visualmente através da cor, verificou-se, durante esse mesmo período, que inicialmente a agregação era bastante brusca e que a determinada altura parecia estagnar, deixando de se registar alteração da cor, ou melhor, coloração na solução. O desaparecimento da cor era detetado antes dos 15 minutos terminarem, levantando-se a hipótese que o tempo de reação do ensaio pudesse ser de algum modo encurtado.

Por esta razão, efetuaram-se novamente ensaios colorimétricos às mesmas condições e concentrações e simultaneamente estudou-se a cinética associada à indução da agregação. Serão apresentados apenas os resultados relativos ao ensaio mais promissor, ou seja, à concentração de DNA alvo cuja detecção colorimétrica foi mais eficaz, sendo que a **figura 4.18** representa o gráfico da razão de absorvâncias entre a banda LSPR relativo às nanossondas na forma estável ( $\lambda = 750 \text{ nm}$ ) e a banda correspondente à forma agregada ( $\lambda = 820 \text{ nm}$ ) em função do tempo.



**Figura 4. 18 – Cinética do ensaio colorimétrico usando a nanossonda LCT-20. Representação gráfica da  $R(Abs)$  entre a absorvância a 750 nm e a 820 nm em função do tempo. Soluções-teste: “Branco” (linha preta), “Complementar” (linha azul) e “SNP” (linha cinzenta). Aquisição das absorvâncias para os dois comprimentos de onda de 90 em 90 segundos durante 15 minutos, após a adição de  $(NH_4)_2SO_4$  2M. Todas as soluções-teste continham a nanossonda LCT-20 (~2,5 nM em solução TF pH=8) e as que continham amostras de DNA alvo, estas encontravam-se à concentração de 9 ng/ $\mu$ L. As barras de erro referem-se a 3 repetições de cada ensaio.**

A análise do gráfico apresentado em destaque veio confirmar a hipótese levantada anteriormente, na medida em que de facto, o sal quando entra em contacto com o coloide provoca uma diminuição das repulsões eletrostáticas, conduzido a uma aproximação das nanossondas. Isto foi confirmado logo ao fim dos primeiros 90 segundos, independentemente da solução-teste (presença ou ausência de DNA alvo), uma vez que se registou um decréscimo na no valor da razão de absorvâncias.

No entanto, passado esse período o que se constatou foi que no caso da solução-teste “Complementar” as nanossondas pareciam estar estabilizadas o suficiente pelo DNA outrora hibridado e o efeito do sal acabou por não se manifestar, ou pelo menos, não de forma tão significativa como ocorre para as restantes duas soluções-teste; tendo a razão de absorvâncias mantido o seu valor praticamente constante ao longo dos 15 minutos, assim como a cor azul, bastante semelhante à sua cor inicial ( $t = 0$  s)

Já nas soluções-teste “Branco” e a “SNP (TT)” a razão de absorvâncias descem consecutivamente, até atingirem um patamar a partir dos 540 segundos, mantendo ambas sensivelmente as mesmas  $R(Abs)$  até ao fim da reação.

Este estudo cinético surgiu assim, para elucidar que não são necessários 15 minutos (900 s) para se detetar o SNP C/T -13910, pelo que ao fim de cerca de 9 minutos (540 s) a nanossonda já se encontra totalmente agregada. Este aspeto representa, uma vez mais, uma vantagem relativamente ao método colorimétrico à base de nanossondas esféricas; como já havia sido referido, o propósito do desenvolvimento deste biossensor é a sua implementação em sistemas *POC*, sendo que a diminuição dos tempos de reação representa um dos fatores-chave neste tipo de sistema (rapidez, baixo custo e simplicidade).

## 4.4 Conclusões e considerações finais

### ***Nanobiossensor colorimétrico de DNA usando nanopartículas esféricas de ouro***

Nos ensaios colorimétricos efetuados com as diferentes nanossondas verificou-se que, se por um lado com sondas demasiado pequenas, a hibridação não ocorre, por outro quando estas possuem um número de nucleótidos mais elevado, a percentagem de alvos hibridados aumenta, porém para ambos (“complementar” e “SNP”). Atendendo à dimensão dos alvos de DNA (fragmento de 345 bp) e, conseqüentemente, à quantidade hibridada ser de tal modo elevada, é expectável que os alvos acabem por estabilizar toda a superfície da nanossonda. Para o alvo complementar a situação não constituiu um problema, no entanto, na presença do alvo que possui o SNP, dado que a sua sequência só não hibrida num nucleótido, sendo a restante sequência perfeitamente complementar, esta incompatibilidade não é suficientemente significativa para conduzir à desestabilização com a conseqüente agregação da nanossonda.

Assim, no que diz respeito à deteção do SNP C/T -13910, apenas a sonda *LCT-20*, cuja sequência apresentava 20/20 nucleótidos complementares ao alvo foi capaz de detetar colorimetricamente o alvo que possuía o SNP (19/20). Ainda que as variações de cor das soluções-teste (“complementar” – vermelho; “SNP – roxo) não fossem totalmente esclarecedoras, ou seja, não fossem de acordo com o que se estaria à espera (“complementar” – vermelho; “SNP – azul), demonstraram uma diferenciação significativa ao nível da  $R(Abs)$  para que a deteção fosse validada espectrofotometricamente. Os ensaios com a sonda *LCT-20* apontaram como limite de deteção uma concentração alvo de 12 ng/ $\mu$ L, nos quais a esta concentração é possível a “olho nu” discriminar a presença do SNP através da diferença de cor entre o vermelho e roxo. Possivelmente se o alvo fosse mais pequeno, obter-se-ia uma maior diferenciação entre eles, pelo que nesta perspetiva, a fragmentação do alvo por digestão enzimática poderia representar uma solução para melhorar a eficácia e sensibilidade do método.

### ***Nanobiossensor colorimétrico de DNA usando nanopartículas não esféricas***

O sistema colorimétrico desenvolvido com base na utilização de nanossondas em forma de estrela recorreu à sonda que demonstrou os resultados mais promissores no sistema anterior, ou seja, a *LCT-20*. O sistema que usa AuNP não esféricas, para além de permitir a hibridação e deteção do SNP, apresenta uma vantagem relativamente ao problema da ambiguidade das cores resultantes após a adição do sal para o sistema baseado em AuNP esféricas (vermelho-roxo-azul). Nomeadamente, o biossensor baseado em AuNS opera de acordo com um sistema de resposta “sim / não” associado respetivamente, à presença ou ausência da cor azul, representando assim uma abordagem mais fidedigna para ser aplicada em dispositivos óticos. Relativamente ao nanobiossensor baseado em AuNP esféricas, este viu o seu limite de deteção diminuir (6-9 ng/ $\mu$ L), utilizando alvos de DNA (produtos de *PCR*) sem qualquer tipo de tratamento ou procedimento de purificação.

Como possível justificação para este melhor desempenho das AuNS relativamente às AuNP esféricas, pode apontar-se o facto da própria morfologia das AuNS apresentar **i)** uma superfície com razão de área por unidade de volume mais elevada, o que pode conduzir a uma quantidade superior de oligonucleótidos adsorvidos e por conseguinte, maior eficácia e limite de deteção mais baixo, **ii)** as diferentes alturas das protuberâncias, ou seja, das pontas faz com que uma determinada percentagem de oligonucleótidos esteja com a sua sequência específica mais disponível para a hibridação com os alvos, pelo que no caso das esferas, os oligonucleótidos como se organizam de forma semelhante às SAM, propiciando uma maior interação entre eles do que propriamente com os alvos, **iii)** a sensibilidade destas nanoestruturas é muito superior às esferas, pelo que qualquer alteração química, nomeadamente a indução da agregação resultante da incompatibilidade de um nucleótido na extremidade da nanossonda terá repercussões óticas ao nível da LSPR muito mais acentuadas.

## 4.5 Referências bibliográficas

1. Doria, G.; Conde, J.; Veigas, B.; Giestas, L.; Almeida, C.; Assunção, M.; Rosa, J.; Baptista, P. V. *Sensors* **2012**, 12, (2), 1657.
2. Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. *Anal Bioanal Chem* **2008**, 391, (3), 943-950.
3. Peixoto de Almeida, M.; Pereira, E.; Baptista, P.; Gomes, I.; Figueiredo, S.; Soares, L.; Franco, R., Chapter 13 - Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Miguel, V.; Ángela, I. L.-L., Eds. Elsevier: 2014; Vol. Volume 66, pp 529-567.
4. Eustis, S.; El-Sayed, M. A. *Chemical Society Reviews* **2006**, 35, (3), 209-217.
5. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (32), 15700-15707.
6. Khoury, C. G.; Vo-Dinh, T. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* **2008**, 2008, (112), 18849-18859.
7. Rodríguez-Oliveros, R.; Sánchez-Gil, J. A. *Opt. Express* **2012**, 20, (1), 621-626.
8. Barbosa, S.; Agrawal, A.; Rodríguez-Lorenzo, L.; Pastoriza-Santos, I.; Alvarez-Puebla, R. A.; Kornowski, A.; Weller, H.; Liz-Marzán, L. M. *Langmuir* **2010**, 26, (18), 14943-14950.
9. Park, Y. I.; Im, H.; Weissleder, R.; Lee, H. *Bioconjugate chemistry* **2015**, 26, (8), 1470-1474.
10. Kim, T.; Lee, C.-H.; Joo, S.-W.; Lee, K. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 318, (2), 238-243.
11. Cordray, M. S.; Amdahl, M.; Richards-Kortum, R. R. *Analytical Biochemistry* **2012**, 431, (2), 99-105.
12. Panchapakesan, B.; Book-Newell, B.; Sethu, P.; Rao, M.; Irudayaraj, J. *Nanomedicine (London, England)* **2011**, 6, (10), 1787-1811.
13. Dam, D. H. M.; Lee, H.; Lee, R. C.; Kim, K. H.; Kelleher, N. L.; Odom, T. W. *Bioconjugate chemistry* **2015**, 26, (2), 279-285.
14. Zhang, X.; Servos, M. R.; Liu, J. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, (17), 7266-7269.
15. Vo-Dinh, T.; Fales, A. M.; Griffin, G. D.; Khoury, C. G.; Liu, Y.; Ngo, H.; Norton, S. J.; Register, J. K.; Wang, H.-N.; Yuan, H. *Nanoscale* **2013**, 5, (21), 10127-10140.
16. Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (9), 1959-1964.
17. Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (14), 7238-7248.
18. Wolfbeis, O. S. *Chemical Society Reviews* **2015**, 44, (14), 4743-4768.
19. Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* **1996**, 382, (6592), 607-609.
20. Hill, H. D.; Millstone, J. E.; Banholzer, M. J.; Mirkin, C. A. *ACS Nano* **2009**, 3, (2), 418-424.
21. Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (24), 8313-8318.
22. Storhoff, J. J.; Mirkin, C. A. *Chemical Reviews* **1999**, 99, (7), 1849-1862.
23. Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. *Chemical Reviews* **2005**, 105, (4), 1547-1562.
24. Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Schatz, G. C. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (19), 4640-4650.
25. Chauhan, S. K.; Mukherji, S. *Materials Technology* **2015**, 30, (sup5), B167-B177.
26. Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (27), 8102-8103.
27. Sato, Y.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, 62, (1), 71-76.
28. Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *Nucleic Acids Research* **2005**, 33, (1), e4.
29. Bruno, V.; Diana, M.; João, P.; Isabel, P.; Isabel, C.; Miguel, V.; Pedro, V. B. *Nanotechnology* **2010**, 21, (41), 415101.
30. Doria, G.; Franco, R.; Baptista, P. *Nanobiotechnology, IET* **2007**, 1, (4), 53-57.
31. Baptista, P. V.; Koziol-Montewka, M.; Paluch-Oles, J.; Doria, G.; Franco, R. *Clinical Chemistry* **2006**, 52, (7), 1433-1434.
32. Carlos, F. F.; Flores, O.; Doria, G.; Baptista, P. V. *Analytical Biochemistry* **2014**, 465, 1-5.

33. Doria, G.; Baumgartner, B. G.; Franco, R.; Baptista, P. V. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *77*, (1), 122-124.
34. Baptista, P.; Doria, G.; Henriques, D.; Pereira, E.; Franco, R. *Journal of Biotechnology* **2005**, *119*, (2), 111-117.
35. Veigas, B.; Pedrosa, P.; Carlos, F. F.; Mancio-Silva, L.; Grosso, A. R.; Fortunato, E.; Mota, M. M.; Baptista, P. V. *Journal of Nanobiotechnology* **2015**, *13*, (1), 1-7.
36. Larginho, M.; Canto, R.; Cordeiro, M.; Pedrosa, P.; Fortuna, A.; Vinhas, R.; Baptista, P. V. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2015**, *15*, (10), 1355-1368.
37. Wang, G.; Akiyama, Y.; Takarada, T.; Maeda, M. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22*, (1), 258-263.
38. Kedia, A.; Kumar, P. S. *RSC Advances* **2014**, *4*, (9), 4782-4790.
39. Salis, A.; Ninham, B. W. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, (21), 7358-7377.

## **C**apítulo V.

Desenvolvimento de um Nanobiossensor LSPR para a Detecção de Eventos de Hibridação de DNA utilizando Nanotriângulos de Ouro em Substratos de Vidro Borossilicato



## 5.1 Breve introdução ao capítulo

O crescente aumento no recurso ao diagnóstico molecular, provocado pela sequenciação da informação genética, trouxe a necessidade de desenvolver dispositivos de análise simples, rápidos, pouco dispendiosos e reprodutíveis em massa. Nas últimas décadas tem-se vindo a verificar um avanço significativo no desenvolvimento de biossensores óticos para a deteção e identificação de espécies de interesse biológico, como é o caso do DNA <sup>1</sup>.

Dadas as características e propriedades físico-químicas únicas de alguns nanomateriais metálicos, em especial as nanopartículas de ouro (AuNP), estas têm demonstrado ser bastante promissoras enquanto transdutores óticos em diversos sistemas de deteção biológica. Para além das propriedades óticas, as AuNP são também ótimas plataformas de ligação para biomoléculas, garantindo a estabilidade e atividade das mesmas após a imobilização, sendo uma das grandes vantagens na aplicação em sensores <sup>2-5</sup>.

### 5.1.1 Ressonância Plasmónica de Superfície Localizada (LSPR)

A característica responsável pelas propriedades óticas em biossensores com base em NP metálicas, nomeadamente em AuNP, é a ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR).

A LSPR das AuNP produz coeficientes de absorção e dispersão excepcionalmente elevados numa ampla gama de comprimentos de onda, que se situam sobretudo na zona do visível. Isto acontece devido ao facto da LSPR variar de acordo com fatores relacionados maioritariamente com aspetos morfológicos. O seu ajuste (dimensão e forma) é possível através de processos de síntese, permitindo não só definir a intensidade e posicionamento da LSPR, como também obter maior sensibilidade em métodos de deteção ótica <sup>6</sup>. Para além de fatores intrínsecos, tais como a composição, tamanho e morfologia das AuNP, a LSPR depende também da distância interpartículas e do índice de refração (RI) do meio que as rodeia. Se por um lado, são os fatores intrínsecos que determinam a sensibilidade das NP, é precisamente o ambiente químico, mais concretamente o RI que permite avaliar esse parâmetro.

Contrariamente ao que acontece quando se considera o colóide (AuNP em solução), o espetro de extinção de apenas uma AuNP isolada, medido através da microscopia de campo escuro, por exemplo, resulta num sinal com muito menos interferências do fundo ("*background*"), reduzindo assim a influência da proximidade interpartícula e o problema da heterogeneidade da amostra.

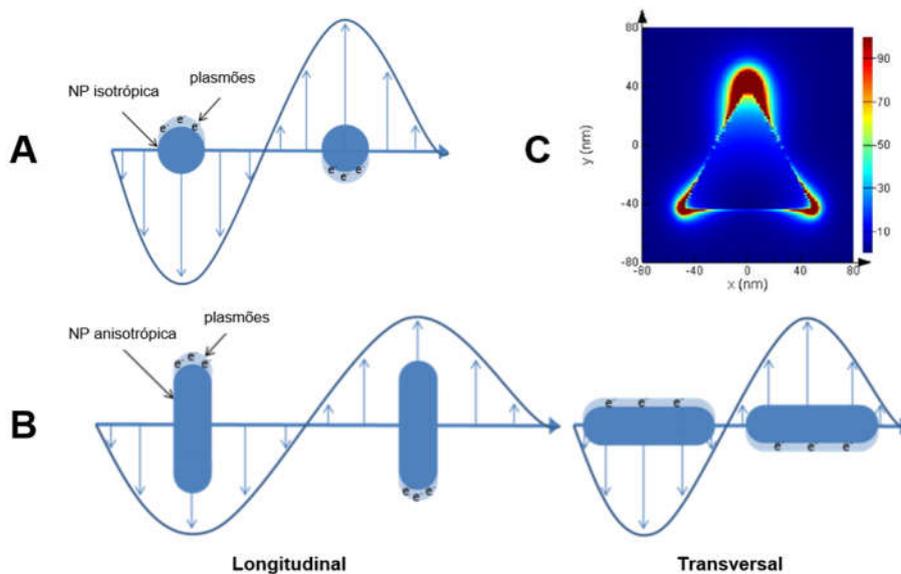
A abordagem "localizada" é caracterizada pelo facto dos campos magnéticos gerados em redor da AuNP serem extremamente intensos e altamente confinados, influenciando a intensidade da LSPR. Sendo assim a largura total a meia altura (*FWHM*) do pico da banda, em média, muito menor do que a que se observa em solução, tal permite que as AuNP individuais possam ser utilizadas em biossensores mais sensíveis. Alguns estudos apontam para que a luz dispersa gerada por uma única NP seja cerca de cinco a seis ordens de grandeza superior à gerada por uma molécula de corante de fluorescência ou *quantum dots* <sup>7-9</sup>.

### 5.1.2 Nanopartículas de ouro não esféricas

As AuNP não esféricas, das quais as placas triangulares (ou “nanotriângulos”) de ouro, AuNT, são um dos exemplos, apresentam propriedades físico-químicas particularmente interessantes relativamente às AuNP esféricas. A sua geometria e rácio área de superfície-volume elevado, conduzem a momentos dipolares fortes que conseqüentemente irão absorver radiação em diferentes comprimentos de onda distintos. Estas características específicas tornam as LSPR das NP não esféricas mais sensíveis a mudanças no RI do que as esféricas, uma vez que a magnitude dos campos induzidos é superior, devido aos seus momentos dipolares serem mais fortes <sup>10</sup>.

Se por um lado, uma AuNP esférica exibe uma ressonância dipolar com modos longitudinais e transversais degenerados devido à sua simetria esférica (**figura 5.1A**); quando se aumenta a razão dimensional numa NP não esférica, os modos transversal e longitudinal são divididos (**figura 5.1B**). No caso dos AuNT, devido a esta anisotropia são observados dois picos de ressonância plasmónica no seu espetro de extinção, ao mesmo tempo que, a largura da banda LSPR longitudinal diminui, à medida que os vértices são mais pronunciados.

Por interação com a luz, este efeito de anisotropia faz com que os campos dipolares de um AuNT se concentrem nos “*hotspots*”, mais concretamente nos vértices, devido à sobreposição das frequências LSPR dos plasmões, induzindo uma amplificação do campo elétrico <sup>11-13</sup> (**figura 5.1C**).



**Figura 5. 1** – Esquema representativo da Ressonância Plasmónica de Superfície Localizada (LSPR) numa NP esférica (**A**); LSPR numa NP não esférica, com respetivos modos longitudinal e transversal (**B**) (exemplo de um *nanorod*). Imagens adaptadas do sítio: <http://nanohybrids.net/pages/plasmonics> (**C**) Campos eletromagnéticos dipolares a evidenciar os chamados “*hotspots*” (representados a vermelho), localizados especialmente nos vértices das NP <sup>13</sup>.

Atendendo aos fatores que caracterizam a LSPR, nomeadamente a composição, morfologia e tamanho, a sensibilidade do biossensor é manifestamente mais elevada para NP com as seguintes características: **i)** composição de prata; **ii)** morfologias anisotrópicas (triangular ou em forma de estrela) e **iii)** maiores dimensões <sup>6</sup>.

No entanto, dado que a prata no seu estado elementar, sob condições atmosféricas é altamente instável e, por conseguinte, bastante suscetível à oxidação, este facto terá implicação direta na estabilidade morfológica das próprias AgNP não esféricas.

Assim, a exposição destas AgNP à luz e ao O<sub>2</sub> presente no ar/água ou em qualquer meio envolvente, promove ao longo do tempo a oxidação do metal. Esta ocorre ao nível dos átomos posicionados mais à superfície, sobretudo nos locais designados por “*hotspots*”, levando na maioria das vezes a uma alteração da morfologia <sup>14</sup>. Esta situação é bastantes vezes impeditiva do recurso a AgNP não esféricas para estudos que impliquem a sua interação com o ar e a luz <sup>15-16</sup>. As NP metálicas cujo desempenho e características são mais semelhantes às de prata, nomeadamente em termos de sensibilidade de deteção, são as NP de ouro (AuNP). Além disso, as AuNP são termodinamicamente mais estáveis do que as de prata, principalmente quando o biossensor opera sob condições atmosféricas.

### **5.1.3 Funcionalização das AuNP com oligonucleótidos**

O facto das AuNP apresentarem uma enorme afinidade por biomoléculas e dada a dependência da LSPR no ambiente químico das AuNP, as interações que ocorrem à superfície são o princípio-base da deteção. Os deslocamentos da LSPR dependem de interações de origem física (p. ex. adsorção direta de oligonucleótidos) mas sobretudo de interações químicas, do tipo ligação de hidrogénio (p. ex. hibridação entre duas cadeias de DNA) e do tipo covalente (p. ex oligonucleótidos modificados com tióis). Todas as interações mencionadas pressupõem a funcionalização das AuNP com as respetivas biomoléculas.

Em biossensores baseados em DNA, quando é efetuada a troca de revestimento original das AuNP (proveniente da síntese) por oligonucleótidos, esta alteração é acompanhada por mudança do índice de refração e consequentemente, pelo deslocamento da banda LSPR. No entanto, visto que a grande maioria dos biossensores são ainda desenvolvidos em solução, uma das limitações associada à funcionalização é a manutenção da estabilidade coloidal das AuNP, após a troca de revestimentos.

A carga superficial das AuNP é resultado da presença de agentes de revestimento ou redução (quando o agente redutor desempenha as duas funções em simultâneo, p. ex citrato de sódio), podendo ser negativa ou positiva. Quanto maior for, em termos absolutos, a carga superficial das NP, mais fortes serão as repulsões eletrostáticas que estabilizem as NP, evitando a sua aproximação e consequentemente evitando a ocorrência de agregação. Em solução, quando a carga dos elementos envolvidos na funcionalização é oposta, o fenómeno de coalescência é praticamente incontornável.

Um exemplo relativo a esta situação, são os AuNT utilizados neste biossensor, cujo revestimento original é o brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), um tensoativo carregado

positivamente, vulgarmente utilizado em sínteses de NP não esféricas. Assim, no processo de funcionalização, os AuNT em solução ao entrarem em contato com moléculas ssDNA (carga negativa), e uma vez que as suas cargas são opostas, estas acabam por anular-se, ocorrendo agregação dos AuNT.

De forma a contornar esta situação, recorre-se à deposição das AuNP em substratos ou plataformas de suporte, cujos materiais podem variar entre o vidro borossilicato <sup>17</sup> ou IT <sup>18</sup>, cobre ou silício <sup>19</sup>. A escolha do material dos substratos deverá estar de acordo com o tipo de AuNP, características do mesmo, assim como o tipo de aplicação que se pretende desenvolver.

Dado que os substratos serão usados para estudos óticos e em microscopia (de campo escuro e AFM), também as suas características deverão garantir que as análises e medições sejam efetuadas nas melhores condições. Desta forma, devem manter-se estáveis e resistentes a diferentes temperaturas e meios reacionais, sem que se degradem física e quimicamente. Em diversas situações são requeridos adicionalmente pré-tratamentos e/ou ativação da superfície dos substratos, de modo, a garantir uma melhor e mais eficaz adesão das AuNP ao substrato. Por isso, embora possam variar de acordo com o tipo de substrato, quando se utiliza substratos de vidro borossilicato é comum recorrer-se a reações de silanização para fixar quimicamente as AuNP a estas plataformas <sup>20</sup>. Caso contrário, embora ocorram interações eletrostáticas entre as AuNP e o vidro, estas podem não ser suficientemente fortes para manter a adesão das AuNP ao vidro ao longo das diferentes etapas que vão compreender a preparação deste biossensor.

Em suma, a imobilização das AuNP em substratos, não só impede que estas interajam entre si, inviabilizando a ocorrência de agregação, como também permite uma análise individual e sequencial de cada AuNP. Além disso, a possibilidade de se funcionalizarem estes AuNT com DNA, depositados num substrato permitiu que se efetuassem medições de dispersão usando a microscopia de campo escuro, fazendo deste biossensor ainda mais sensível a pequenas alterações no ambiente químico das AuNP, nomeadamente na deteção eventos de hibridação com alvos complementares <sup>21</sup>.

### **5.1.3.1 Aspetos relacionados com a funcionalização**

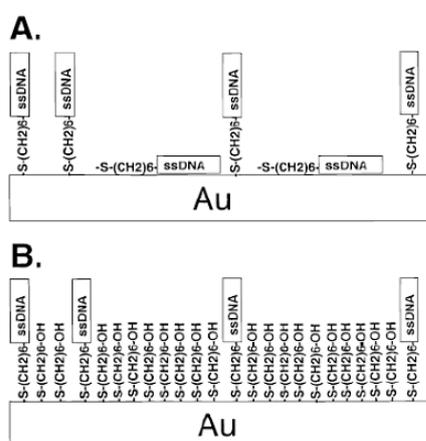
Após a imobilização das AuNP, sobretudo os AuNT que correspondem a placas triangulares, uma das suas duas faces fica assente no substrato, ficando a outra disponível para a funcionalização <sup>22</sup>. Esta última, dado que é praticamente plana, assemelha-se a um convencional filme de ouro. Esta configuração induz assim o mesmo tipo de comportamento característico, por parte dos oligonucleótidos, no que diz respeito à sua deposição em superfícies metálicas.

A funcionalização dos AuNT com os oligonucleótidos leva à formação de uma monocamada auto-montada (SAM), sendo que uma das grandes vantagens deste modo de empacotamento o facto de se prevenir a adsorção não específica das moléculas de DNA, tanto aquando da funcionalização da superfície como aquando da hibridação com o DNA alvo <sup>23, 24</sup>.

Geralmente, a funcionalização de AuNP com oligonucleótidos tiolados é dividida em duas etapas. Numa primeira fase, ainda que modificadas com tiol, as biomoléculas carregadas

electrostaticamente, começam por adsorver espontaneamente à superfície das AuNP. Entretanto num processo de auto-organização, as moléculas de DNA rearranjam-se, acabando por formar uma SAM, na qual as ligações são essencialmente de natureza covalente. Estas ligações covalentes, mais especificamente designadas por dativas, entre o ouro e o enxofre ocorrem devido à existência de um grupo tiol presente numa das extremidades dos oligonucleótidos.

Além disso, em biossensores de DNA é comum efetuar-se um procedimento adicional proposto por inicialmente por Herne e Tavlov<sup>25</sup>. Este procedimento consiste na exposição da superfície da AuNP, após a incubação dos oligonucleótidos, a uma solução de um alcanotiol, o 6-mercaptohexanol (6-MCH). O objetivo da utilização deste agente de bloqueio é evitar que os oligonucleótidos tiolados interajam entre si ou se liguem inespecificamente à superfície do AuNT através do azoto das bases nucleicas, em vez de se ligarem através do enxofre (**figura 5.2**). A ocorrência da ligação não específica dos oligonucleótidos à superfície metálica afeta a sua acessibilidade para que possam hibridar corretamente na presença de um alvo complementar de DNA<sup>26, 27</sup>.



**Figura 5. 2** – Representação esquemática da formação da SAM numa superfície de ouro apenas com oligonucleótidos tiolados (**A**) e após incubação com o agente de bloqueio 6-MCH (**B**). Esquema adaptado da referência<sup>28</sup>.

#### 5.1.4 Biossensores LSPR com base no índice de refração

Nos biossensores LSPR, ao invés das alterações de cor das AuNP se manifestarem ao nível da estabilidade da solução coloidal (sensores de agregação); como se trata de um biossensor cuja abordagem é inteiramente focada em AuNP isoladas, o recurso à microscopia de campo escuro e a câmaras CCD permite uma avaliação individual através do deslocamento da banda LSRP, resultado de pequenas alterações no RI induzidas no meio que envolve a AuNP.

Os grupos de investigação de Feldman<sup>12</sup>, Schultz<sup>8</sup> e Van Duyne<sup>29-30</sup> foram pioneiros no desenvolvimento deste tipo de biossensor “localizado”, aplicado a proteínas, anticorpos e DNA. Atualmente estes biossensores já apresentam limites de deteção (*LOD*) comparáveis a outros poderosos métodos de deteção, como é o caso da fluorescência, no entanto, sem o inconveniente da

interferência do *background*. Para além disso, a sua implementação em sistemas de deteção de biomoléculas em tempo real, também já foi alcançada com sucesso.

Regra geral, o deslocamento da banda de ressonância plasmónica para comprimentos de onda maiores, após a ligação de biomoléculas à superfície da AuNP está relacionado com a sensibilidade e área de superfície total das AuNP (determinadas através de fatores intrínsecos previstos após a síntese), bem como com a quantidade de moléculas ligadas <sup>31</sup>.

Assim, de acordo com a literatura, AuNP com morfologias irregulares, em particular as que apresentam extremidades mais pontiagudas, demonstram melhor desempenho do que as convencionais AuNP esféricas. Para que este tipo de premissa possa ser validado, estabeleceram-se alguns parâmetros que permitem determinar a capacidade de deteção destas AuNP plasmónicas enquanto biossensores, nomeadamente a sensibilidade e o indicador de mérito, FoM (de *figure of merit*, em inglês) <sup>31</sup>.

A sensibilidade de uma AuNP expressa em nm/RIU,  $m$  é determinada através do ajuste linear dos deslocamentos do pico LSPR ( $\Delta\lambda_{max}$ ) em função das alterações de RI ( $\Delta n$ ), como indica a **equação 1**. Por sua vez, o indicador de mérito, FoM depende da sensibilidade da AuNP, sendo o quociente entre esta e a largura a meia altura da banda de ressonância plasmónica ( $fwhm$ ) como elucida a (**equação 2**).

$$\Delta\lambda_{max} = m\Delta n \quad (1)$$

$$FOM = \frac{m}{fwhm} \quad (2)$$

#### 5.1.4.1 Biossensores LSPR para hibridação de DNA

O DNA é particularmente apropriado para aplicações em sensores dada a sua interação robusta e específica entre as cadeias complementares através do emparelhamento das suas bases azotadas (C-G e A-T). Os sensores de DNA convertem o princípio de Watson-Crick, designado por hibridação, num sinal analítico passível de ser interpretado. De entre os biossensores LSPR desenvolvidos com base em eventos de hibridação com DNA, destacam-se os de interação:

- PNA/DNA: constituídos por ácidos nucleicos peptídicos (PNA) <sup>32, 33</sup> que intervêm na deteção de polimorfismos de base única (SNP) presentes em genes, por exemplo, responsáveis por doenças neurodegenerativas <sup>30, 34</sup> e inflamatórias <sup>35</sup>;

- DNA/DNA: envolvidos na deteção e monitorização de reações de PCR em tempo real <sup>36</sup> e mais recentemente na deteção LSPR por micro-espectroscopia campo escuro na hibridação de nanossondas (AuNP revestidas com oligonucleótidos) com alvos de DNA complementares.

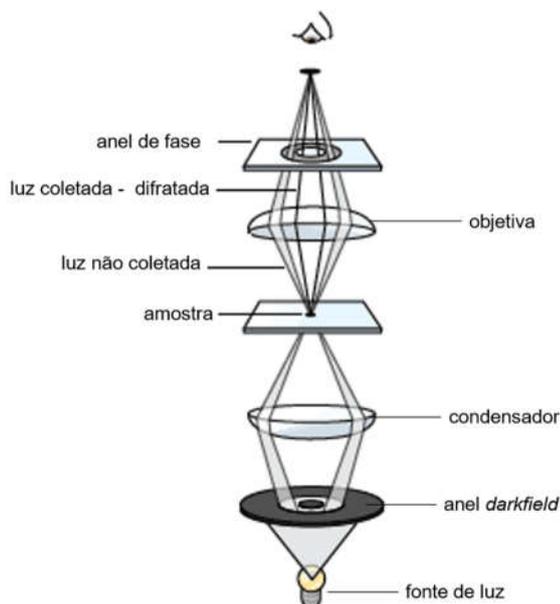
Resumidamente neste último, o oligonucleótido ligado à superfície da AuNP funciona como uma nanossonda <sup>1</sup>. A ligação do oligonucleótido à superfície da AuNP induz uma primeira mudança na

ressonância plasmônica (comparativamente à ressonância da AuNP com o seu revestimento original). Por conseguinte, a hibridação com um alvo de DNA (por exemplo, fragmento de um produto de *PCR*) desencadeia numa segunda fase, a resposta efetiva do biossensor. Esta resposta traduz-se numa segunda mudança na ressonância plasmônica, caso o alvo apresente alguma complementaridade de sequência de nucleótidos, dada a existência de uma maior quantidade de DNA à superfície.

### 5.1.5 Princípio da Microscopia de campo escuro (*DFM*, do inglês *Dark Field Microscopy*)

A microscopia de campo escuro é uma das técnicas de microscopia ótica mais utilizadas em estudos que envolvem materiais biológicos (p. ex. fluidos animais ou vegetais, culturas de células) assim como em ciências dos materiais, às escalas micro e/ou nano (p. ex. suspensões coloidais) <sup>21, 37-41</sup>. É uma técnica de contraste que não requer o uso de corantes e que permite fundamentalmente através da incidência de luz numa amostra induzir a dispersão de luz. O princípio da DFM explica que a luz que é coletada pela lente da objetiva não é a transmitida diretamente, mas sim a luz difratada que é dispersa através da amostra.

Resumidamente de acordo com o diagrama da **figura 5.3**, uma fonte de luz com a capacidade de produzir um espectro de emissão contínuo ilumina o condensador. Por sua vez, um anel *darkfield* situado por baixo da lente do condensador, delimita o feixe de luz, permitindo que apenas a luz que passa através de uma borda existente nesse anel, se concentre e incida diretamente sobre a amostra.



**Figura 5.3** – Esquema representativo do princípio da microscopia de campo escuro (*DFM*).

Ao incidir na amostra, em vez de a atravessar totalmente, a luz é dispersa pela amostra (NP ou células) dentro das lâminas de vidro. A luz transmitida diretamente é omitida e apenas a luz que é dispersa pela amostra alcança a lente da objetiva. A objetiva de baixa abertura numérica é empregue de maneira a restringir a reflexão da luz transmitida, mantendo os ângulos formados pelo anel *darkfield*.

A luz difratada é então coletada e analisada pelo espectrofotômetro. A imagem e a dispersão de luz difratada são capturadas pela câmara CCD. Por fim, o espectro de dispersão (espectro LSPR) da AuNP é obtido por conversão do sinal através de programas de tratamento de imagem.

## 5.2 Metodologia Experimental

### 5.2.1 Materiais e equipamentos

- Espectrofotômetro UV-Visível *Varian Cary 50 Bio*
- *Acton Research SpectraPro 2300i Micro Spectrometer* (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) acoplado a uma câmara com sensores CCD arrefecida por um dispositivo *Peltier*
- Microscópio ótico *Axio Imager Z1m* (Carl Zeiss Micro-imaging, Göttingen, Germany)
- Espectrofotômetro UV-Visível *Nanodrop ND-1000* (Nanodrop Technologies, EUA)
- Refratômetro Digital *PAL-RI Atago*
- Sistema de água ultrapura
- Centrifuga Sigma *UniCen DR15* (Rotor *eppendorf* 12024-H)
- Plataforma de agitação/vibração *Biosan MR-12*
- Agitador térmico *Biometra TS1*

#### 5.2.1.1 Reagentes químicos usados na preparação de soluções

Tabela 5. 1 – Reagentes químicos utilizados e respectivos fabricantes

Reagente	Fabricante
Glucose	
Di-hidrogenofosfato de potássio ( $H_2KPO_4$ )	
Hidrogenofosfato de potássio ( $HK_2PO_4$ )	
Citrato trissódico ( $C_6H_5Na_3O_7$ )	Sigma-Aldrich
Solventes (etanol, acetona, metanol)	
6-Mercapto-1-hexanol ( $HS(CH_2)_6OH$ )	
Tampão SSC 20x concentrado (citrato de sódio 0,3 M em NaCl 3M)	

### 5.2.1.2 Oligonucleótidos usados nos ensaios

Tabela 5. 2 – Sequências nucleótídicas dos oligonucleótidos sintéticos envolvidos na funcionalização das AuNP e na reação de hibridação. Destaques em *itálico* correspondem a sequência poli-A e parte sublinhada à sequência complementar ao oligonucleótido “*sem-SNP*”.

Oligonucleótido-sonda	Sequência Nucleótídica (5'- HS → 3')	Fabricante
<b>sem-SNP</b>	AAAAAAAAAAGTTTCCTTTGAGGCCAGGGA	
<b>SNP5</b>	AAAAAAAAAAGGGCCTACATTATCTTATC	STAB-Vida,
<b>SNP10</b>	AAAAAAAAAAGGCCAGGGCCTACATTATC	Portugal
<b>SNP20</b>	AAAAAAAAAAGTTTCCTTTGAGGCCAGGGC	
Alvo	Sequência Nucleótídica (5'→3')	Fabricante
<b>Complementar</b>	<u>TCAAGGAAACTCCGGTCCCTTTCCCATCAA</u> GCCCTAGGGCTCCTCGTGCC	Eurofins MWG Operon
<b>Não-complementar</b>	TTCCCATCAAGCCCTAGGGCTCCTCGTGCC TGCTGGGAGTTGTAGTCTGA	(Ebersberg, Alemanha)

### 5.2.1.3 Amostras clínicas de DNA

Na secção 2.2.1.4 do capítulo 2 é referido o tipo de amostras de DNA selecionadas e nas secções de 2.2.2 a 2.2.6 inclusive, estão descritos os procedimentos envolvidos no processamento das amostras, nomeadamente desde a extração à amplificação; purificação, validação da reação de PCR por eletroforese em gel de agarose e por fim, quantificação de DNA através de espectrofotometria de UV-visível. As amostras consistem em fragmentos com cerca de 345 bp de tamanho, relativas ao gene *LCT* responsável pela intolerância à lactose.

## 5.2.2 Procedimentos

### 5.2.2.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

Para efeito de posterior comparação, dois tipos de NP com morfologias distintas foram sintetizados, nomeadamente nanoesferas de ouro cujo diâmetro rondava os 80 nm (AuNP-80) e nanotriângulos de ouro com 90 nm de aresta (AuNT). As NP foram depositadas em substratos de vidro, visualizadas e localizadas por microscopia de campo escuro, assim como o seu espectro traçado por espectroscopia de ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR).

De acordo com as especificações do equipamento, nomeadamente em termos de poder ampliação do microscópio, resolução da câmara e alcance do espectrofotómetro, foi necessário estabelecer alguns aspetos, nomeadamente no que diz respeito às dimensões das NP. As AuNP deveriam ter um tamanho acima dos 50 nm (no mínimo) para que pudessem ser simultaneamente observadas através do microscópio e a sua imagem capturada. Para além disso, a gama de comprimentos de onda do espectrofotómetro deveria estar confinada ao intervalo de valores entre 300-

800 nm, daí que o tamanho das AuNP tivesse que rondar valores compreendidos entre os 70 e 100 nm, sendo que 100 nm será o tamanho máximo para que a sua banda de LSPR esteja compreendido na gama de comprimentos de onda acima mencionado.

Os procedimentos relativos à síntese de AuNP-80 e AuNT estão descritos no **capítulo 3**, nas secções **3.2.2.2** e **3.2.2.5**.

### 5.2.2.2 Medição do índice de refração das suspensões coloidais

Preparou-se de forma rigorosa, uma série de oito soluções com percentagens variáveis de glucose, nomeadamente desde 0% até 80% (w/w) com incrementos de 10% entre cada. A estas concentrações estão associados índices de refração com valores tabelados a oscilarem entre  $n=1,333$  e  $1,420$ <sup>42</sup>, os quais foram medidos utilizando um refratómetro digital *PAL-RI*. As soluções de glucose de concentrações variáveis foram usadas como referência para se traçar uma reta de calibração, indispensável para posteriormente calcular o índice de refração (RI) dos coloides. Todas as medições foram efetuadas a temperatura controlada, previamente definida nos 25 °C.

Quanto à medição do RI da mistura (AuNP + glucose), os procedimentos foram os mesmos para ambas as suspensões coloidais, à exceção da preparação das amostras por centrifugação, que foi diferente mediante a morfologia das AuNP, como indica a **tabela 5.3**.

**Tabela 5. 3** – Condições de centrifugação para a preparação da amostra (de acordo com as características de cada AuNP)

Designação	Morfologia	Dimensões	rotações / rpm	Tempo / min
AuNP-80	Esférica	Ø 80 nm	6000	5
AuNT	Triangular	90 nm (aresta) 17 nm (espessura)	6000	10

Assim, para tubos de 1,5 mL pipetaram-se 800 µL de cada um dos coloides (AuNP-80 e AuNT) e de acordo com as suas características procedeu-se à centrifugação para remoção do citrato e do CTAB, respetivamente. As condições estão mencionadas na tabela abaixo. Após a centrifugação, procedeu-se à remoção do sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com as soluções de glucose a concentrações variáveis. Por fim, deixou-se a mistura incubar por 1 hora. Os índices de refração das soluções coloidais foram medidos à mesma temperatura (25 °C) das soluções puras de glucose e traçou-se o respetivo espectro de UV-Vis. A sensibilidade associada às diferentes morfologias foi determinada através da representação gráfica do  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorção – LSPR (para o caso dos AuNT, o correspondente à banda longitudinal) em função do valor RI medido para cada concentração de glucose.

### 5.2.2.3 Preparação dos chips de vidro borossilicato

Os *chips* foram fabricados a partir de vidro borossilicato em salas limpas e selados com uma folha adesiva para ficarem protegidos do pó e para facilitar o transporte. Por isso requerem alguns procedimentos antes da sua utilização, nomeadamente, a remoção da camada protetora (solúvel), limpeza e ativação da superfície.

O pré-tratamento dos *chips* envolve numa primeira fase, a sua colocação em suportes e posterior imersão em solventes orgânicos (acetona, metanol, etanol) e água Milli-Q por períodos de 10 minutos em banho de ultrassons. Uma vez secos com N<sub>2</sub>, os *chips* são colocados numa câmara sujeitos a uma corrente de plasma (neste caso de O<sub>2</sub>) por 1 h, a 50 W e 5 Pa, levando à destruição da camada superficial mais externa. De seguida procedeu-se a uma reação de silanização, recorrendo-se a uma solução 1% de APTES (3-aminopropiltriétoxissilano) em 1 mM de ácido acético, a qual se deixou reagir com a superfície dos *chips* por 10 min. A reação foi interrompida após a passagem dos *chips* da solução para um gobelé com água Milli-Q; o mesmo foi colocado 5 min no banho ultrassons. Por fim, e depois de secos em fluxo de N<sub>2</sub>, foram armazenados numa caixa de Petri sob atmosfera inerte de argon <sup>4</sup>.

Nos *chips* foram previamente gravadas grelhas microestruturadas através de processos fotolitográficos. Esta grelha servirá de suporte para as NPs, bem como de referencial para a sua posterior localização. O facto de esta conter em cada quadrícula, letras e números torna assim possível a sua identificação. Esta condição é essencial sobretudo porque se prevê um estudo comparativo das propriedades óticas das AuNPs isoladas ao longo de 3 etapas, que por sua vez, implicam a manipulação do *chip* fora do equipamento (microscópio).

### 5.2.2.4 Deposição dos coloides nos chips de vidro

Antes da deposição das AuNPs nos *chips* é necessário centrifugar alíquotas dos diferentes coloides, não só para concentrar as amostras, mas sobretudo para remover eventuais artefactos produzidos durante as respetivas sínteses. Os coloides resultam de diferentes processos de síntese e dadas as condições reacionais, as suas concentrações serão sempre díspares e no caso do coloide de AuNT, este apresenta algumas AuNP esféricas, além de um excesso de CTAB em solução. Assim, apenas a solução de AuNT foi sujeita a centrifugação por 10 min a 7500 rpm, da qual foi rejeitado o sobrenadante e adicionaram-se 50 µL de água Milli-Q para ressuspender o sedimento. Esta ressuspensão foi imediatamente transferida para o *chip* e este colocado em agitação numa plataforma de vibração durante 1 hora à temperatura ambiente (T<sub>amb</sub>) para adsorção dos AuNT ao vidro (no caso das AuNP-80, 50 µL da solução de AuNP foram diretamente depositados, sem centrifugação prévia). Após esse período, o *chip* é passado por água Milli-Q e seco num fluxo controlado de N<sub>2</sub>. A eficácia da

---

<sup>4</sup> No caso de não serem utilizados de imediato, a superfície dos *chips* armazenados deve ser reativada antes da deposição das NPs, ou seja, mergulhá-los por 10 min em água Milli-Q e em banho de ultrassons será suficiente.

deposição e adesão das AuNPs ao *chip* foi também testada a cada passo experimental, relativamente à influência da temperatura, das alterações químicas e das lavagens do *chip*.

#### **5.2.2.5 Preparação dos *chips*-sonda**

##### **5.2.2.5.1 Funcionalização das AuNP imobilizadas no *chip* com oligonucleótidos tiolados**

As AuNP uma vez imobilizadas no *chip* funcionarão como sensores cujas alterações ao nível da superfície serão estudadas por micro-espectroscopia. Para o efeito, preparou-se uma solução de cada um dos oligonucleótidos listados na **tabela 5.2**, à concentração de 1 mM, utilizando-se para isso uma solução tampão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M). O *chip* com as AuNPs adsorvidas foi totalmente mergulhado em 500  $\mu\text{L}$  da solução e deixado a incubar à  $T_{\text{amb}}$  por um período de cerca de 15-16 horas (durante a noite).

##### **5.2.2.5.2 Incubação com 6-Mercaptohexanol (6-MCH)**

Após a funcionalização com os oligonucleótidos, é comum neste tipo de sistema, que se proceda a uma incubação adicional com um tiol de cadeia curta, de forma a evitar que as cadeias de DNA interajam entre si, impedindo a sua acessibilidade na hibridação<sup>25-28</sup>. Optou-se por utilizar o 6-mercaptoetanol (6-MCH), cuja função é juntamente com os oligonucleótidos, criar uma monocamada mista de 6-MCH/DNA.

Prepararam-se duas soluções de 6-MCH 1 mM e 5 mM e de cada uma delas, retiraram-se alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  para um tubo, nos quais se mergulharam os *chips*-sonda, deixando-se incubar por 1 hora. Os *chips*-sonda foram secos com  $\text{N}_2$  e usados imediatamente após a sua preparação.

##### **5.2.2.6 Hibridação dos *chips*-sonda com alvos de DNA**

As condições experimentais relacionadas com a hibridação dos *chips*-sonda com DNA-alvo foram numa primeira fase testadas e otimizadas para amostras sintéticas (fragmentos de dimensões mais reduzidas), passando-se apenas para a utilização de produtos de *PCR* provenientes de amostras clínicas (fragmentos de maiores dimensões), numa fase final.

Na otimização da hibridação foram utilizados os *chips*-sonda de AuNT, e no sentido de comparar o desempenho de AuNP não esféricas (AuNT) com o das AuNP esféricas, recorreu-se a AuNP-80 e amostras clínicas.

##### **5.2.2.6.1 Hibridação com alvos de ssDNA sintético**

Foram preparadas duas soluções de DNA sintético de cadeia simples (ssDNA) à concentração de 1 mM, com sequências complementar e não complementar ao oligonucleótido presente no *chip*-

sonda. Os oligonucleótidos liofilizados foram dissolvidos em água Milli-Q. Nos ensaios de hibridação utilizou-se uma solução de NaCl 3 M em citrato de sódio 0,3 M (pH 7), preparada comercialmente e designada por tampão de hibridação SSC 20x. Dado que a concentração dos sais presentes na solução tampão em reações de hibridação vai ditar o rigor na deteção de sequências de DNA, as hibridações decorreram em meios salinos com diferentes concentrações: NaCl 0,3 M em citrato de sódio 0,03 M (2x) e NaCl 0,75 M em citrato de sódio 0,075 M (5x), respetivamente. Para a reação de hibridação mergulhou-se o *chip*-sonda em 500 µL da solução de ssDNA sintético a 1 µM e deixou-se incubar por 3 horas; testaram-se duas temperaturas, 25 °C e 37 °C.

Na lavagem dos *chips*-sonda teve-se o cuidado de diminuir gradualmente a força iónica, ou seja, passou-se primeiro o *chip* com uma solução de SSC 2x, depois com uma 0,2x e só no fim com água Milli-Q, de forma a remover apenas o DNA que não hibridou ou que não ligou especificamente. Por fim, os *chips* foram secos sob fluxo de N<sub>2</sub>.

#### **5.2.2.6.2 Hibridação com alvos de dsDNA provenientes de amostras clínicas**

Dado o caráter de dupla cadeia (dsDNA) dos produtos *PCR* é importante que para que o DNA hibride, este seja previamente desnaturado e fique na sua configuração em cadeia simples (ssDNA).

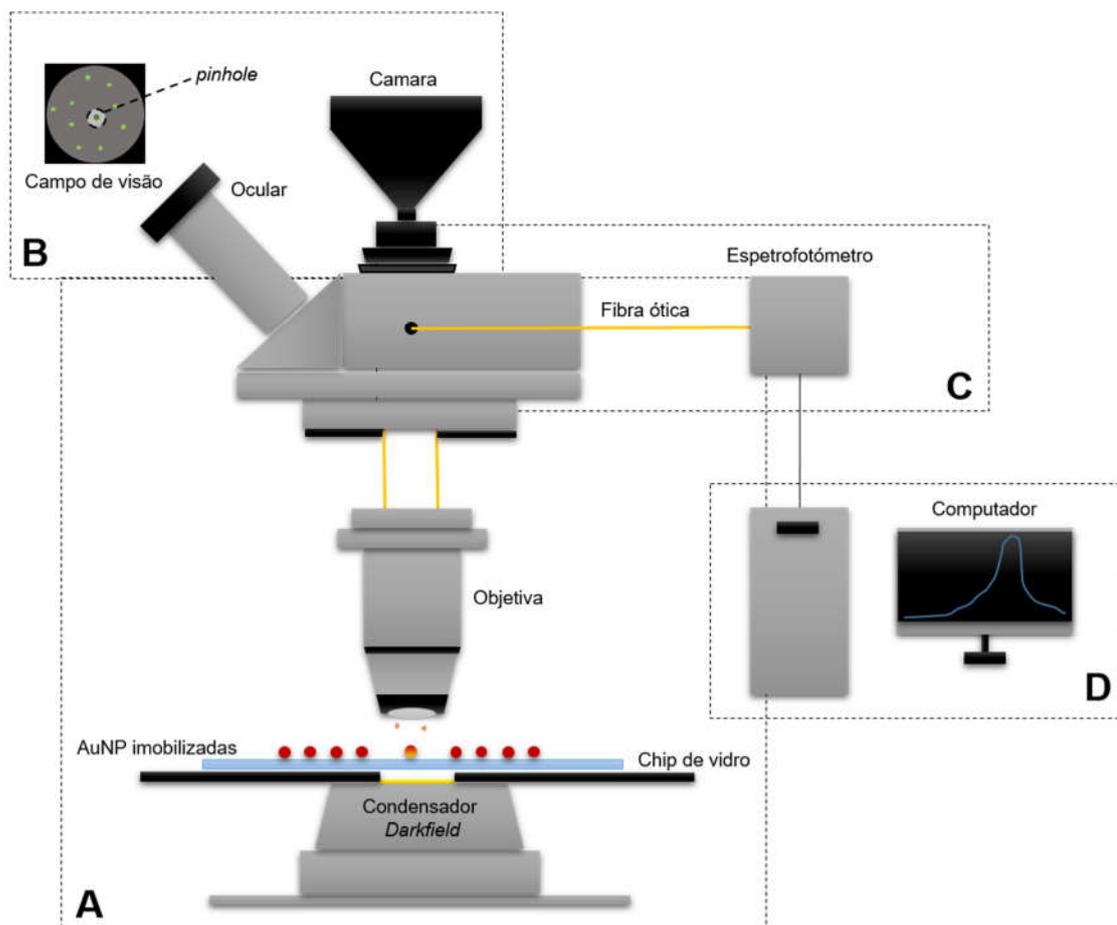
Assim, prepararam-se soluções dos dois tipos de produtos de *PCR* (alvo complementar e não complementar) à concentração de 1 mM utilizando a solução tampão SSC 2x, mediram-se alíquotas de 500 µL para tubos que foram colocados num termociclador, à temperatura de 90 °C por 10 min. Imediatamente findo esse período, os tubos foram imersos num banho de gelo por 10 min e os *chips*-sonda mergulhados na solução de ssDNA e deixados a incubar por 3 horas a temperatura fixa e constante de 20 °C. Por fim, o *chip* foi lavado com a solução tampão SSC 0,2 x e água Milli-Q e seco com N<sub>2</sub>. O mesmo procedimento foi repetido para ambas as amostras de alvo complementar e não complementar.

#### **5.2.2.7 Aquisição e análise de espetros**

Após colocar-se o *chip* de vidro com AuNP imobilizadas no microscópio *Axio Imager Z1m* em modo *darkfield* (**figura 5.4A**), a sua superfície inferior é atravessada por luz, proveniente de uma lâmpada de halogénio e tungsténio com espectro contínuo e temperatura de cor de 3200 K.

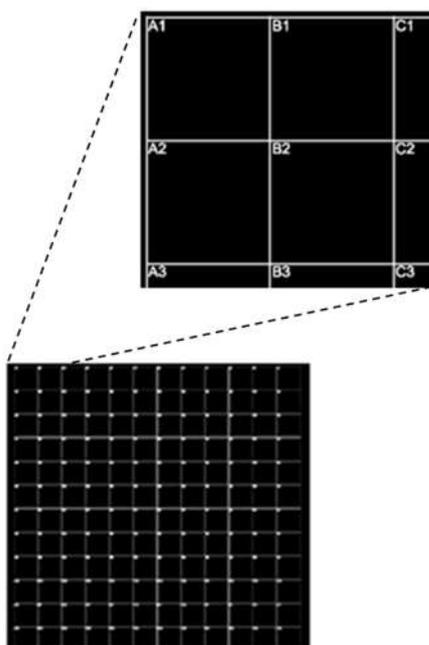
Uma vez iluminada a amostra e dado que se trata de experiências em modo *darkfield*, a sua configuração bloqueia a luz que é diretamente transmitida, enquanto a que é coletada através de um *pinhole*, é detetada pelo espectrofotómetro, sob a forma de luz dispersa. Este orifício é coplanar com o tubo de lentes (objetiva), ou seja, pode ser visto tanto na imagem real através da ocular, como na imagem ampliada através da câmara (**figura 5.4B**), correspondendo na imagem real a um diâmetro de 150 µm. A fase representada na **figura 5.4C** assinala o percurso da luz dispersa até ao espectrofotómetro, o qual é permitido através de uma fibra ótica multimodo, com uma grelha de 150

linhas por mm. Por fim, a última fase **(D)** envolve a chegada da informação relativa à quantidade de luz dispersa ao espectrofotómetro, que é transmitida e convertida num sinal.



**Figura 5. 4** – Esquema representativo dos equipamentos envolvidos e respetivos arranjos experimentais, na caracterização das propriedades óticas de AuNPs isoladas (p. ex. AuNP-80): Microscópio ótico **(A)** e câmara CCD **(B)** para a observação e captura de imagem em modo *darkfield* de uma zona específica do *chip* com a amostra; Espectrofotómetro UV-Vis **(C)** para aquisição do sinal LSPR de cada AuNT (luz dispersa), por intermédio do *pinhole* e da fibra ótica, e por fim, processamento do sinal para obtenção do espectro de cada NP no computador **(D)**.

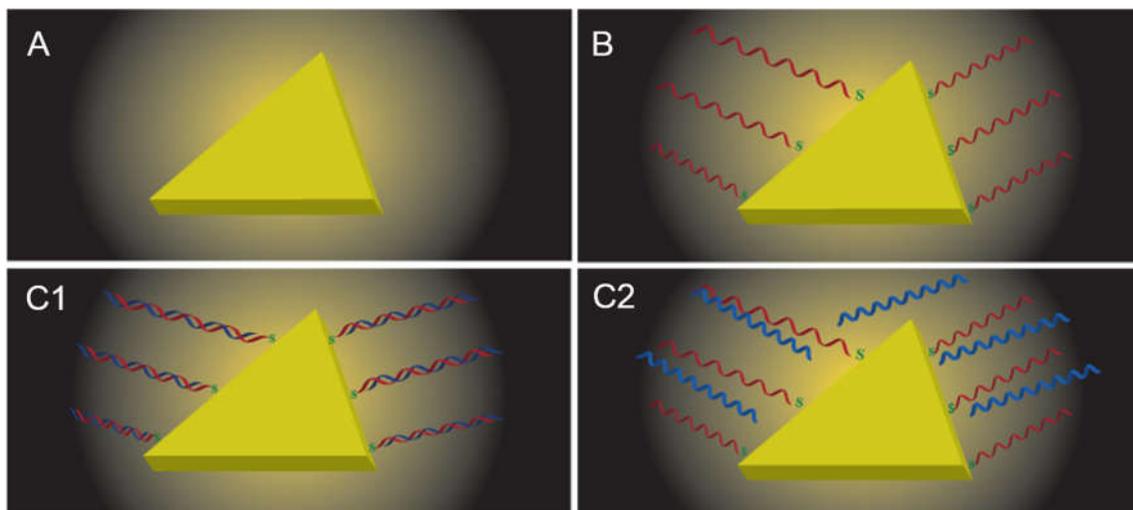
Após a colocação do *chip* no microscópio, verifica-se que este apresenta em baixas ampliações uma grelha uniforme, como a que está representada na **figura 5.5**, com pequenos compartimentos totalmente planos numerados no canto superior esquerdo, com uma letra e um número (destaque da **figura 5.5**). Estes elementos referenciais serão altamente importantes no acompanhamento de AuNP previamente seleccionadas, uma vez que permitem que a sua realocação seja facilitada e imediata nas etapas subsequentes, daí que se teve o especial cuidado de seleccionar AuNP que estivessem posicionadas junto da referência de cada compartimento.



**Figura 5. 5** – Exemplo de uma imagem da grelha de cobre gravada do *chip*, visto ao microscópio com uma ampliação 20x. Em destaque, outra imagem do mesmo *chip*, desta vez com uma ampliação de 50x, onde é possível visualizar os compartimentos quadrados da grelha, com letras e números no canto superior esquerdo.

Por sua vez, cada experiência compreendeu três etapas e, por conseguinte, a aquisição do mesmo número de espectros para cada AuNP isolada. Embora os procedimentos aplicados em cada etapa sejam os mesmos para qualquer AuNP estudada, representou-se a título de exemplo na **figura 5.6**, as alterações que decorrem à superfície de um AuNT ao longo da experiência.

Proceder-se-á a uma avaliação comparativa das propriedades óticas do AuNT isolado, que corresponde numa fase inicial ao que está ilustrado na **figura 5.6**, ou seja, a um AuNT depositado no *chip*, cuja superfície é revestida com o agente de revestimento utilizado na síntese (CTAB); de seguida, à formação da nanossonda, isto é, depois da sua superfície ter sido funcionalizada com o oligonucleótido tiolado e com MCH (**figura 5.6B**), e por fim, depois de ter ocorrido a hibridação do alvo com essa nanossonda, seja com um alvo complementar (**figura 5.6 C1**) ou não complementar (**figura 5.6 C2**).



**Figura 5. 6** – Representação esquemática de um AuNT nas diferentes etapas que abrangem cada experiência. **(A)** Seleção de um AuNT revestido com CTAB; **(B)** Formação da nanossonda, funcionalização desse mesmo AuNT com um oligonucleótido tiolado; **(C)** Avaliação da ocorrência de hibridação com a nanossonda, dependendo se o alvo é complementar **(C1)** ou não complementar **(C2)**, respetivamente.

Contudo, foi necessário atender a alguns aspetos, nomeadamente, ao facto do mesmo *chip* estar sujeito a diferentes etapas de procedimentos; de em todas essas etapas, as condições de medição serem ajustadas e do equipamento sofrer desgaste com o uso (p. ex.: fonte de luz), e desses fatores eventualmente poderem interferir à posteriori na comparação dos dados. Na tentativa de contornar a situação, adotou-se um procedimento para a sua análise <sup>1</sup>, no qual para se obter o espectro de uma NP, seja qual for a sua morfologia, para além da medição da intensidade de luz dispersa pela NP ( $I_{NP}$ ), outros três aspetos têm que ser considerados; nomeadamente, a contribuição da intensidade do background ( $I_{BG}$ ), da interferência da fonte de luz ( $I_{FL}$ ) e da *dark current* do CCD ( $I_{DC}$ ), ou seja, da baixa corrente elétrica que flui através de dispositivos fotossensíveis, como é o caso deste espectrofotómetro.

Estes parâmetros irão corrigir o valor de intensidade de luz que a AuNP efetivamente dispersa, de acordo com a seguinte equação:

$$I = (I_{NP} - I_{BG}) / (I_{FL} - I_{DC})$$

Todas as medições decorreram com as AuNP depositadas no *chip* em contacto direto com o ar atmosférico, no qual para cada amostra, foram analisadas entre 10 a 12 AuNP. Após seleção de cada AuNP, foi adquirido o seu espectro numa gama de comprimentos de onda de 400-850 nm. Efetuou-se um ajuste a uma função gaussiana a todos os picos dos espectros através do *software Origin 8.0* e uma normalização da sua intensidade, a fim de determinar com precisão, deslocamentos de comprimento de onda, etapa para etapa.

## 5.3 Resultados e Discussão

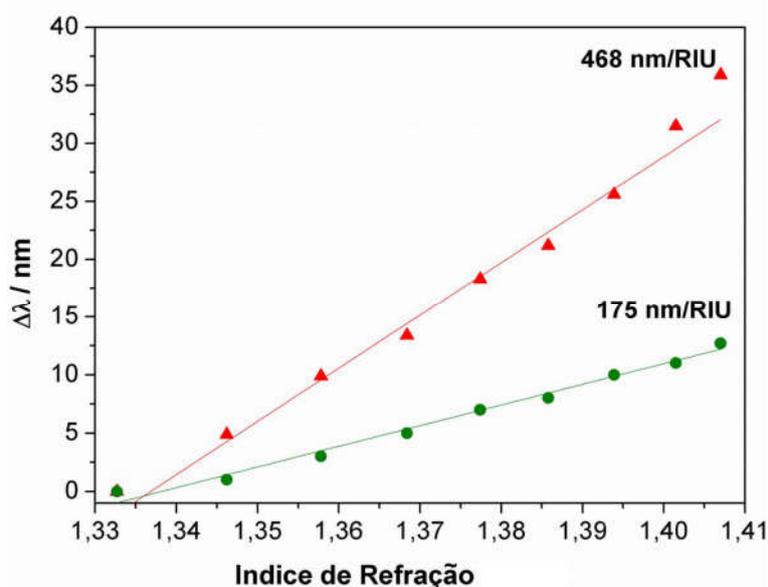
### 5.3.1 Síntese e caracterização das nanopartículas

Os resultados relativos à síntese das AuNP-80 e AuNT foram discutidos no **Capítulo 3**, nomeadamente nas secções **3.2.2.2 e 3.2.2.5**.

### 5.3.2 Determinação da sensibilidade de cada um dos coloides através da medição dos índices de refração

Em sensores plasmónicos, são as AuNP que, quando sujeitas a alterações no seu ambiente químico, vão funcionar como transdutores de sinais através da alteração do seu índice de refração (RI), sendo capazes de monitorizar eventos de ligação molecular, assim, para além da caracterização das AuNP propriamente ditas, um dos principais fatores a considerar quando as AuNP são usadas como biossensores plasmónicos, é a sensibilidade do sensor,  $S$ . Este fator é avaliado de acordo com o tipo de NP, que por sua vez pode variar conforme o material, tamanho e morfologia.

Dado que as AuNP sintetizadas para o desenvolvimento deste biossensor são ambas de ouro (AuNP-80 e AuNT) e têm aproximadamente a mesma dimensão, apenas se estudou a influência da morfologia. Determinou-se a sensibilidade dos dois tipos de AuNP através da medição dos valores de RI em função da % de glucose presente na solução, traçando-se posteriormente o seu espectro LSPR. A **figura 5.7** representa a mudança em termos espectrais, nomeadamente o deslocamento da banda LSPR, que ocorre após a alteração no RI das AuNP.



**Figura 5.7** – Representação gráfica dos valores de RI medidos em função dos deslocamentos da banda LSPR. A sensibilidade resulta do ajuste linear dos dados ( $S = \text{declive}$ ) nos dois tipos de AuNP cujas dimensões são aproximadamente iguais. As AuNP-80 têm 80 nm de diâmetro e são representadas por ●, enquanto os AuNT são representados por ▲ e têm 80 nm de comprimento de aresta.

Ao gradiente de concentração de glucose considerado (0 - 80 %) correspondem valores de RI crescentes ( $1,333 \leq n \leq 1,407$  RIU) que provocaram comportamento de ambas as AuNP em termos óticos bastante diferente, nomeadamente o respetivo posicionamento da banda plasmónica. Para o cálculo dos deslocamentos considerou-se a diferença entre o  $\lambda$  da banda SPR das AuNP após o contacto com soluções a uma determinada % glucose e a correspondente situação inicial (em meio aquoso).

Através do gráfico da **figura 5.7** imediatamente se percebe que os AuNT são bastante mais reativos à glucose do que as AuNP-80, isto é, por cada incremento de 10% na concentração de glucose, os deslocamentos promovidos são visivelmente maiores no caso dos AuNT. Quando ambas as AuNP são redispersas em água Milli-Q (0% glucose), o RI não altera o seu valor  $n = 1,333$  RIU, visto que provêm de um coloide cujo solvente é água, como tal a banda plasmónica não sofre qualquer deslocamento. Por outro lado, quando a solução que apresenta 80% glucose ( $n = 1,407$  RIU), entra em contacto com as AuNP, ocorre em simultâneo uma alteração do RI e um deslocamento na ordem dos 36 e 13 nm, para a amostra de AuNT e AuNP-80, respetivamente. Após a regressão linear dos dados obtidos para cada AuNP, corroboraram-se as afirmações anteriores por determinação analítica da sensibilidade de cada AuNP através dos declives das retas obtidas. De facto, obteve-se para esse declive um valor cerca de 3x superior para os AuNT (468 nm/RIU) relativamente às AuNP-80 (175 nm/RIU).

Na qualidade de biossensores, as AuNP para além da sensibilidade, podem ser caracterizadas por um outro parâmetro que avalia a sua capacidade de deteção, o indicador de mérito, (FoM). Este parâmetro foi determinado numericamente através do quociente entre o valor da sensibilidade e a largura a meia altura da banda LSPR, sendo que este cálculo resulta em valores de FoM de 1,13 e 5,86 para as AuNP-80 e AuNT, respetivamente.

As diferenças registadas entre AuNP, quer ao nível da sensibilidade como da capacidade de deteção, podem ser explicadas graças a determinadas características morfológicas dos AuNT, que conduzem à existência de “*hot-spots*”. Ao contrário da geometria esférica das AuNP-80, as arestas e sobretudo, os vértices dos AuNT destacam-se por serem locais de maior reatividade. Quanto mais definidos os seus vértices forem, isto é, mais pontiagudos, maior a sua capacidade de deteção/ligação de biomoléculas. Este facto por sua vez, reflete-se num estreitamento e aumento da intensidade da LSPR, que terá influência no valor de indicador de mérito. Assim se justifica a criteriosa caracterização que foi efetuada na seleção dos AuNT. A escolha de AuNT com vértices pontiagudos em detrimento dos truncados (morfologia mais próxima da esférica) é determinante no sentido em que, é essencialmente em redor dos vértices que o campo elétrico gerado é intensificado.

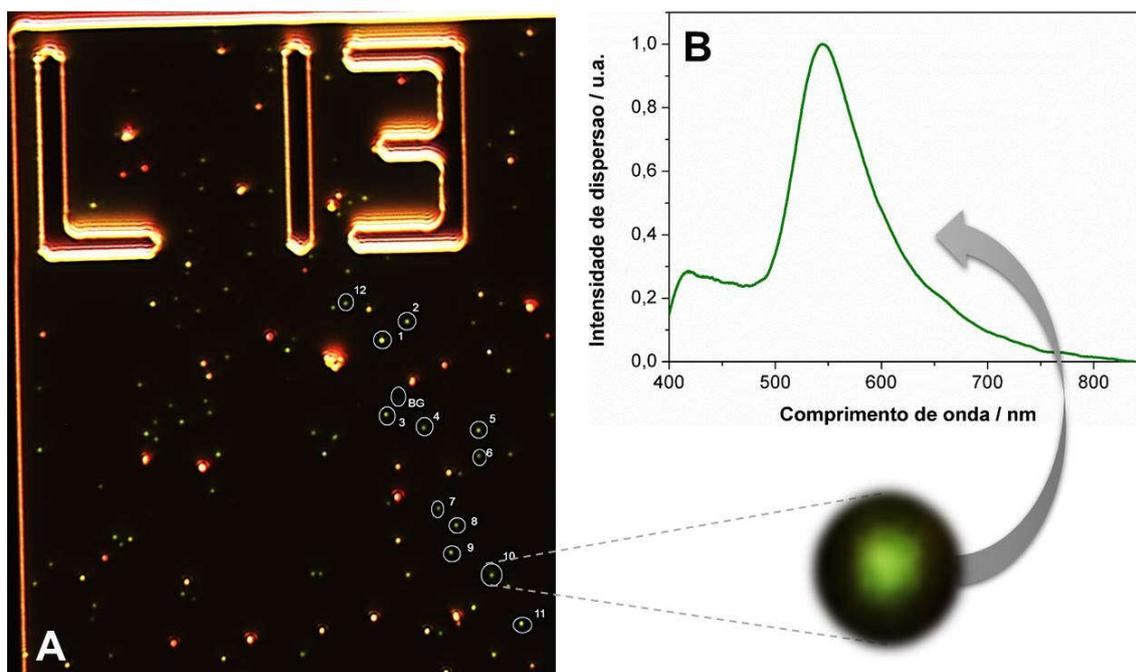
Em suma, verifica-se que há uma forte influência da morfologia no desempenho de um biossensor com base em AuNP, sendo que os AuNT apresentam maiores probabilidades de serem bem-sucedidos enquanto plataformas de deteção dos sucessivos eventos de ligação de DNA.

### 5.3.3 Aquisição e caracterização de espectros LSPR das AuNP

A aquisição dos espectros LSPR de ambos os tipos de AuNP envolveram numa primeira fase, a seleção individual das AuNP. Para esta seleção e de acordo com indicações prévias, escolheu-se uma zona do *chip* que fosse representativa de toda a extensão na grelha, mais propriamente, relativamente à concentração de AuNP. Seguidamente, selecionou-se arbitrariamente uma zona junto de um referencial (letra e número) e fez-se uma análise por AFM usando o próprio *chip* como suporte, com o objetivo de verificar a morfologia das AuNP presentes nessa zona. Depois de confirmada a geometria e tamanho, os traçaram-se os respetivos espectros de UV-Vis. Constatou-se que os pontos de luz de cor verde, correspondiam às AuNP-80 e os pontos de luz vermelhos, correspondiam aos AuNT. Apenas se selecionaram as AuNP que correspondiam às características pretendidas, no que diz respeito ao tamanho e morfologia.

#### 5.3.3.1 Nanoesferas de ouro (AuNP 80 nm)

Os *chips* cujas amostras depositadas correspondiam a coloides de AuNP-80 apresentavam-se bastante homogéneas e bem dispersas na imagem captada pelo microscópio ótico, relativamente à concentração por nm<sup>2</sup> de grelha, tendo-se confirmado através de AFM que a população predominante era efetivamente de esferas. As únicas diferenças observadas entre as AuNP da amostra era o diâmetro, variando entre os 70 e os 90 nm, aliás informação comprovada pelas imagens provenientes de TEM (ver histograma das AuNP-80 na **figura 3.1C** do **Capítulo 3**). Estas diferenças de tamanho observaram-se diretamente através do microscópio ótico, ou seja, da cor dos pontos de luz. Verificou-se que no caso das AuNP esféricas, as cores dos pontos de luz podem ir do verde ao laranja (**figura 5.8A**), sendo que o verde está normalmente associado a AuNP-80 e o laranja a mais do que uma só AuNP (proximidade entre NP) ou na maioria das vezes, a aglomerados de AuNP, já que em ambas as situações se verifica uma maior dispersão de luz.



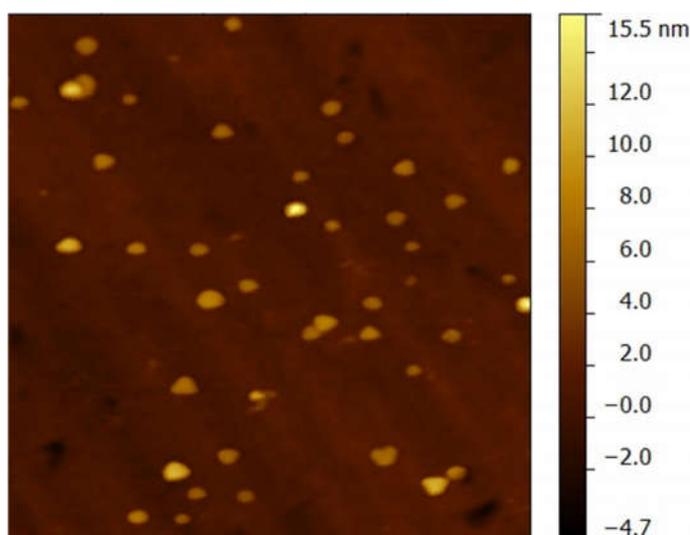
**Figura 5.8 – A.** Imagem de microscópio capturada pela câmara CDD de uma zona do *chip* no qual foi depositado uma amostra de coloide AuNP-80. A seleção das AuNP foi feita usando a objetiva de 100x, sendo que os pontos luminosos marcados com um círculo correspondem a AuNP esféricas com diâmetros a rondarem os 80 nm. Destaque para a AuNP-80 n° 10, onde é visível a cor verde, característica de AuNP-80. Para efeitos de obtenção de um espectro individual, atendeu-se à contribuição do *background* medido na zona interna ao círculo branco “BGD” correspondente. **B.** Espectro representativo (AuNP-80 n° 10) após o procedimento de análise, no qual o valor da intensidade de dispersão é corrigido, através da eliminação de interferências (tais como a do fundo, da fonte de luz e a *dark current* do equipamento).

Depois de confirmadas as características das AuNP, mediram-se individualmente os espectros das AuNP-80 numeradas de 1 a 12. Inicialmente mediu-se a intensidade de luz que estas AuNP dispersavam; de seguida a do fundo, subtraindo-se o seu valor ao da intensidade de luz dispersa pela AuNP. Por fim, mediu-se a intensidade da interferência da fonte de luz e a *dark current* do equipamento, no sentido de serem eliminados e assim se obter o valor de luz dispersa real. Como resultado disso, para a AuNP-80 n° 10, obteve-se o espectro LSPR da representado na **figura 5.8B**, espectro esse semelhante ao do coloide (em solução), com banda a rondar os 550 nm <sup>43</sup>.

É importante mencionar que a superfície do *chip* foi ativada através da silanização com APTES em meio ácido. Atendendo ao facto que o revestimento das AuNP-80 são moléculas de citrato de sódio, este procedimento não só permitiu a adesão rápida das AuNP-80 à superfície (menos de 10 minutos), como garantiu que as AuNP se mantivessem fixas no mesmo local onde foram depositadas, resistindo a todas as intervenções às quais estiveram sujeitas nas diferentes etapas (lavagens, colocação no microscópio, etc.).

### 5.3.3.2 Nanotriângulos de ouro (AuNT)

No caso dos *chips* cujas amostras correspondiam a coloides de AuNT observaram-se alguns aspetos que as diferenciavam da amostra de AuNP-80; nomeadamente, através do microscópio ótico verificou-se uma maior heterogeneidade em todo o *chip*, tanto ao nível da localização/disposição das AuNP, como da sua morfologia. Na maioria das vezes, observou-se uma maior concentração de AuNT na zona central do *chip*, possivelmente devido à evaporação da gota nessa mesma zona, situação que impossibilitava em alguns casos, a aquisição de espetros. Não obstante, haviam zonas no *chip* onde a amostra se apresentava bem dispersa e passível de se analisar por AFM, resultado disso é a imagem da **figura 5.9**.

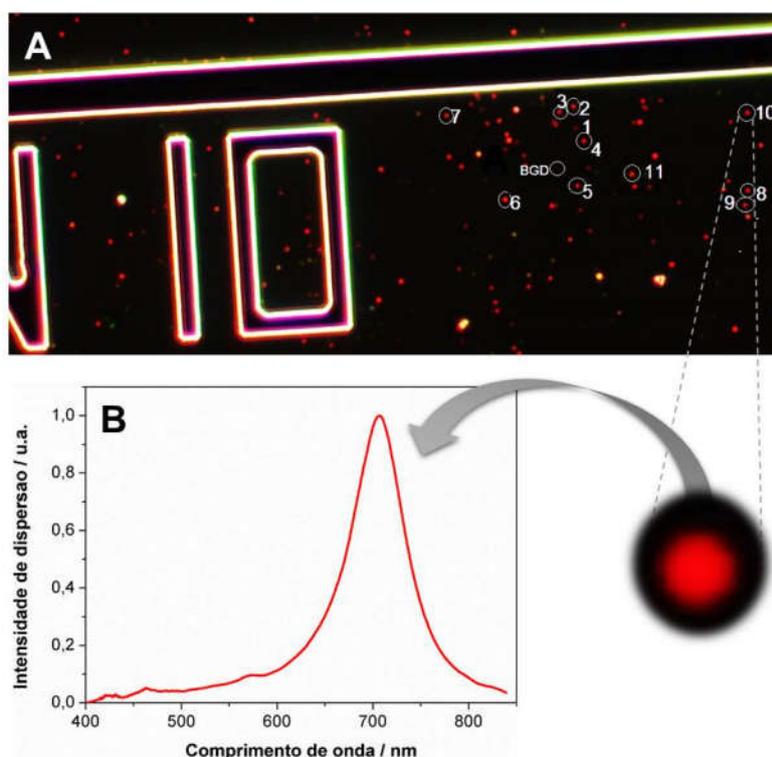


**Figura 5.9** – Imagem de AFM (modo intermitente) de uma zona selecionada do *chip* (grelha N10), onde é possível observar inúmeros AuNT imobilizados. Alguns AuNT apresentam uma morfologia mais pontiaguda, enquanto outros apresentam vértices truncados.

Através da análise da respetiva zona por AFM, concluiu-se que a sua informação está de acordo com a de TEM (ver **figura 3.3A** do **Capítulo 3**), comprovando a existência de alguma variedade no que diz respeito às características dos AuNT. Esta variedade reflete-se pouco em termos de tamanho, sendo sobretudo ao nível das características morfológicas que se verificam as diferenças mais significativas. Embora quase todas as NPs analisadas fossem AuNT, alguns apresentavam-se truncados, sendo que esses não foram considerados para estudos posteriores. Estas diferenças morfológicas dificultaram o processo de seleção dos AuNT, já que ao microscópio ótico, os pontos de luz apresentavam a mesma cor vermelha, surgindo assim numa primeira fase, a necessidade de recorrer à técnica de AFM para atestar quanto à integridade morfológica dos AuNT a estudar.

Todavia, com base na **figura 5.10A** pode afirmar-se que um dos aspetos positivos no pré-tratamento da amostra foram as centrifugações. Estas foram bastante eficazes na remoção de esferas que são formadas durante a síntese, uma vez que praticamente não se deteta a presença de pontos

de luz verdes. Os pontos de luz laranja dizem apenas respeito a AuNP que estão demasiado próximas, dispersando uma maior quantidade de luz.



**Figura 5. 10 – A.** Imagem de microscópio capturada pela câmara CDD de uma zona do *chip* no qual foi depositado uma amostra de coloide AuNT. A seleção das AuNP foi feita usando a objetiva de 100x, sendo que os pontos luminosos marcados com um círculo branco correspondem a AuNP triangulares com arestas de 90 nm. Destaque para o AuNT nº 10, onde é visível a cor vermelha, característica de AuNT com 90 nm de aresta. Para efeitos de obtenção de um espectro individual, atendeu-se à contribuição do *background* medido na zona interna ao círculo branco “BGD” correspondente. **B.** Espectro resultante após um procedimento de análise, no qual o valor da intensidade de dispersão é corrigido, através da eliminação de interferências (tais como a do fundo, da fonte de luz e a *dark current* do equipamento).

O procedimento para a aquisição dos espectros de UV-vis foi semelhante ao anteriormente usado, obtendo-se um espectro LSPR para o AuNT nº 10 tal como o representado na **figura 5.10B**. A razão pela qual este difere do espectro em solução, é que em solução, na interação dos AuNT com a luz (ondas eletromagnéticas), ocorre em ambas as direções, transversal e longitudinal; enquanto quando se encontram depositados numa superfície, apenas o modo longitudinal é considerado. Assim, em vez de duas bandas SPR a comprimentos de onda de 540 e 750 nm (ver **figura 3.3D** do **Capítulo 3**), correspondentes ao modo transversal e longitudinal, o espectro LSPR apresenta apenas uma banda a rondar os 700-740 nm.

### 5.3.4 Preparação dos *chips*-sonda

Após a identificação das AuNP, pretendeu-se modificar a sua superfície através da funcionalização com DNA, mais concretamente com os oligonucleótidos *sem-SNP*, *SNP5*, *SNP10* e *SNP20*. Este processo não exigiu condições experimentais diferentes das atmosféricas (p. ex. temperatura, pressão), sendo que ao longo do tempo a fisiossorção inicial deu lugar à quimiossorção.

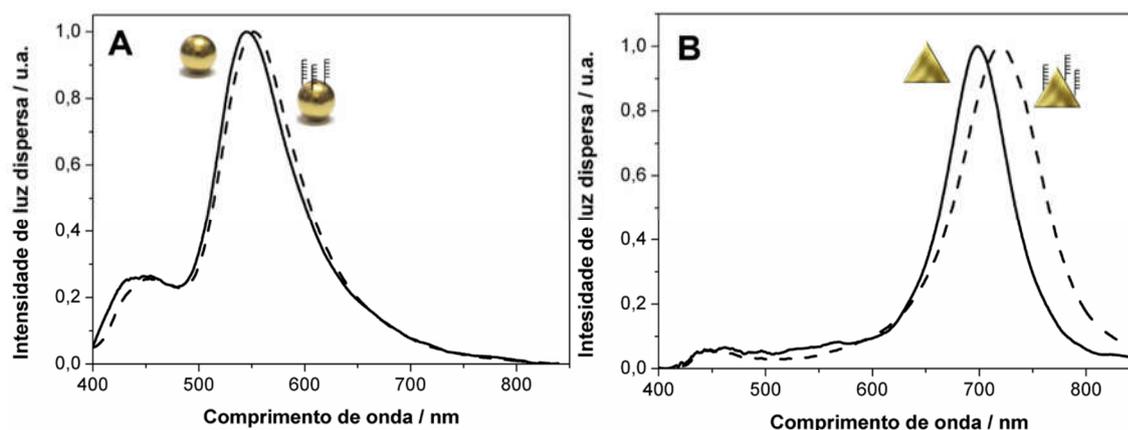
Os oligonucleótidos mencionados na **tabela 5.2**, para além da modificação –SH no C6 da extremidade 5' responsável pela ligação, apresentavam imediatamente a seguir uma sequência de 10 adeninas (A) na mesma extremidade. A sua inserção tem como objetivo promover o impedimento estérico, isto é, prevenir as interações intermoleculares ou intramoleculares entre moléculas de DNA, dada a sua proximidade e estrutura espacial. Na ausência da sequência poli-A a hibridação não ocorre, uma vez que os oligonucleótidos têm tendência a enrolar-se sobre si próprios e/ou a aderir à superfície da NP, impedindo a sequência de estar devidamente acessível para a hibridação <sup>44-48</sup>.

A julgar pelo comportamento das AuNP em solução, previa-se que para as AuNP-80 a funcionalização, ou seja, a troca de revestimentos ocorresse com sucesso. O citrato de sódio é um ligando bastante lábil e a sua interação com a superfície do Au é meramente eletrostática. Além disso, devido ao facto das cargas de ambos os agentes de revestimento serem negativas, no momento da troca, as repulsões eletrostáticas permanecem asseguradas e é garantida a estabilidade coloidal das AuNP-80.

Contudo, o mesmo comportamento não era de esperar para os AuNT, uma vez que quando se tentam funcionalizar com oligonucleótidos em solução, a solução coloidal acaba por agregar, imediatamente ou passado algum tempo (dependendo do pH). O CTAB, enquanto agente de revestimento está ligado ao AuNT, apresentando uma extremidade carregada positivamente. Na presença de moléculas de ssDNA (carga negativa), estas passam a interagir eletrostaticamente com as moléculas de CTAB. Quando tal sucede, as repulsões entre NP diminuem drasticamente, neutralizando a carga superficial até ao ponto dos AuNT não conseguirem manterem-se estáveis em solução.

De maneira a contornar o problema da agregação, a funcionalização efetuou-se em AuNT previamente imobilizados num *chip* (substrato de vidro) através da sua face inferior, deixando disponível a face superior para funcionalização com as sondas de oligonucleótidos. Embora o CTAB esteja igualmente adsorvido electrostaticamente ao AuNT, a sua interação não é tão fraca quanto a do citrato de sódio, e como, para além disso, forma micelas a partir de uma determinada CMC (entre 0,92 e 1,0 mM) <sup>49</sup> é normal que a troca de revestimentos ocorra mais lentamente. A funcionalização deu-se à  $T_{amb}$ , de forma a garantir que a estrutura formada pelas moléculas de CTAB em redor da AuNP se desorganize, ao ponto do oligonucleótido tiolado poder penetrar e alcançar a superfície do AuNT, formando assim a ligação dativa entre o S e a superfície de Au.

A título de exemplo, apresentam-se na **figura 5.11**, espetros referentes à funcionalização dos dois tipos de AuNP, esféricas (A) e não esféricas (B), onde é evidente em ambos os casos um deslocamento da banda LSPR para comprimentos de onda superiores.



**Figura 5.11 – A.** Espectros LSPR representativos de uma AuNP-80 cujo revestimento antes da funcionalização era citrato de sódio (linha contínua) e depois da funcionalização, **oligonucleótido *sem-SNP*** (linha a tracejado). **B.** Espectros LSPR representativos de um AuNT cujo revestimento antes da funcionalização era **CTAB** (linha contínua) e depois da funcionalização, **oligonucleótido *sem-SNP*** (linha a tracejado). Condições da funcionalização das AuNP imobilizadas no *chip*: período de incubação de 15 horas à  $T_{amb}$  numa solução de  $1 \mu\text{M}$  de oligonucleótido *sem-SNP*.

Embora na **figura 5.11A** se verifique que após a funcionalização das AuNP-80 ( $S=175 \text{ nm/RIU}$ ), a troca de revestimento de citrato de sódio para o oligonucleótido *sem-SNP* provoca em média, um deslocamento de cerca de 8 nm; a troca do CTAB pelo mesmo oligonucleótido em amostras de AuNT ( $S=468 \text{ nm/RIU}$ ) é detetada por um deslocamento de cerca de 15 nm, o dobro do observado para as esferas. Esta diferença deve-se essencialmente à existência dos “hotspots” na geometria dos AuNT (vértices pontiagudos e das arestas), onde se gera um maior confinamento dos campos eletromagnéticos, aumentando nessas zonas a reatividade e consequentemente, a sensibilidade a variações do índice de refração local.

Assim, depois de alterada a superfície de ambas as AuNP, os desvios da banda de LSPR vêm confirmar simultaneamente a alteração de revestimento e a formação de uma nanossonda AuNP-oligonucleótido sonda.

#### 5.3.4.1 Otimização da formação do *chip*-sonda usando apenas AuNT

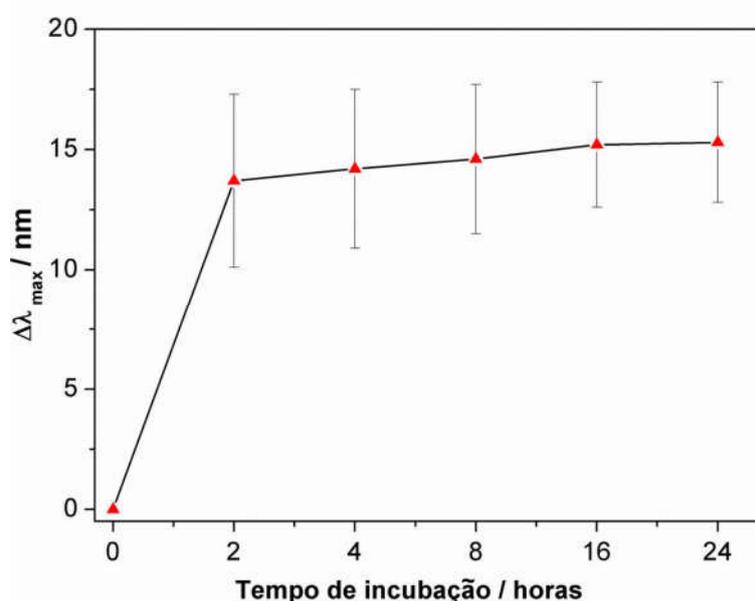
A etapa de preparação dos *chips*-sonda não pode estar dissociada da etapa de hibridação, daí que com o intuito de testar a eficácia dos mesmos na deteção específica de DNA alvo, procedeu-se a algumas otimizações que envolveram diferentes tempos de incubação e a variação da concentração de 6-MCH. Apesar destes fatores estarem incluídos na fase de preparação dos *chips*-sonda, os aspetos relativos ao sucesso da hibridação serão discutidos nesta seção. Para além disso, só constarão os dados relativos às otimizações do *chip*-sonda utilizando AuNT, sendo que as condições provenientes dessa otimização serão posteriormente aplicadas às AuNP-80 e finalmente serão comparados os resultados para os dois sistemas.

### 5.3.4.1.1 Tempo de incubação com oligonucleótidos tiolados

Depois de mergulhar o *chip* com os AuNT imobilizados, na solução de oligonucleótido *sem*-SNP 1  $\mu\text{M}$ , as moléculas tioladas de ssDNA começaram a adsorver à superfície dos AuNT.

A funcionalização foi acompanhada através da aquisição de espectros de 10-12 AuNT aos tempos de incubação  $t = 2, 4, 8, 16$  e 24 horas, tendo-se verificado através da **figura 5.12** que, ao fim de 2 horas de incubação à  $T_{\text{amb}}$ , a adsorção de moléculas tioladas de ssDNA provocou um deslocamento da banda SPR para comprimentos de onda superiores.

O valor médio obtido rondava os 14 nm ( $\Delta\lambda_{\text{max}} = 13,7 \pm 3,6$  nm) não sendo muito diferente dos registados nos tempos seguintes, já que ao fim de 24 horas de incubação o valor praticamente não se alterou ( $\Delta\lambda_{\text{max}} = 15,4 \pm 2,8$  nm).



**Figura 5. 12 – Deslocamentos da plasmônica de ressonância ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ) em função do tempo de incubação.** Os valores no gráfico correspondem a uma média de 10-12 AuNT analisados, após a funcionalização à  $T_{\text{amb}}$  com uma solução de oligonucleótido *sem*-SNP 1  $\mu\text{M}$ .

Atendendo a estes resultados preliminares, tudo indicava que a superfície do AuNT já se encontraria totalmente revestida ao fim de 2 horas, tendo-se optado por testar este *chip*-sonda num ensaio de hibridação. Verificou-se, no entanto, que após a hibridação não só não ocorria deslocamento, como a banda LSPR voltava à sua posição inicial, isto é, o seu comprimento de onda máximo coincidia com o obtido na sua caracterização inicial para AuNT ainda na presença de CTAB.

Após este resultado, questionou-se quanto à eficácia da ligação oligonucleótido-AuNT e concluiu-se que tal como em outros trabalhos que envolvem a funcionalização de AuNP com DNA, este processo compreende duas etapas: na primeira (ao fim de 2 horas) as moléculas tioladas de ssDNA estão de facto depositadas à superfície, no entanto, a adsorção é ainda de natureza electrostática,

devido às cargas opostas dos agentes de revestimento, positiva no CTAB e negativa no ssDNA. Na segunda etapa, ambas as moléculas passam por um rearranjo lento, durante o qual o oligonucleótido se liga através do grupo tiol à superfície do AuNT.

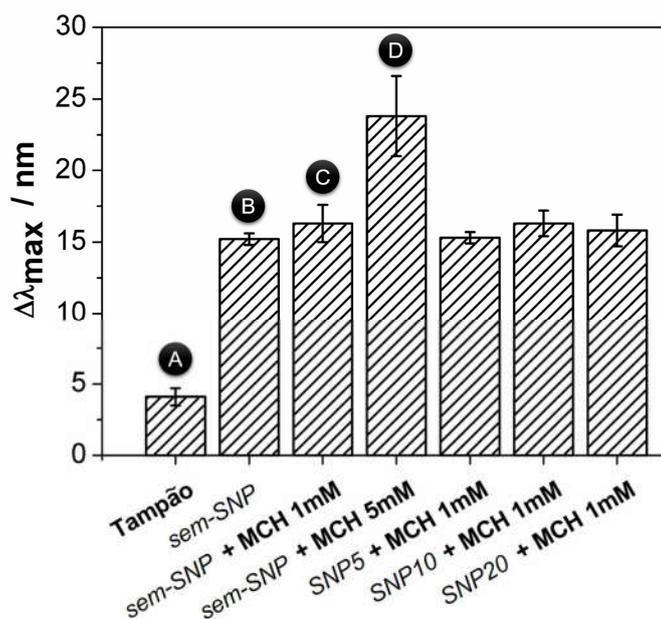
Aparentemente, a adsorção electrostática não é suficientemente forte para suportar as condições experimentais da etapa da hibridação, levando à remoção do oligonucleótido. Ao contrário da adsorção, a interação dativa embora ocorra de forma lenta é mais eficaz, atingindo um patamar ao fim das 16 horas, garantindo-se assim que toda a superfície está revestida de ssDNA.

#### 5.3.4.1.2 Incubação com o alcanotiol 6-MCH

Antes de se averiguar a importância da incubação com 6-MCH após a funcionalização dos AuNT, deve ter-se em consideração que devido à elevada sensibilidade que estas AuNP manifestam, é de esperar que qualquer alteração na sua superfície conduza a deslocamentos da banda plasmónica.

A solução onde foi mergulhado o *chip* continha o oligonucleótido *sem-SNP* diluído em tampão fosfato à concentração de 1 M. Assim, de forma a avaliar isoladamente a contribuição de cada um destes componentes, procedeu-se à incubação em paralelo de dois *chips* (A e B) durante 16 horas; respetivamente um com tampão fosfato 1 M e outro com o oligonucleótido *sem-SNP* 1  $\mu$ M diluído em água. A **figura 5.13** resume a influência de todos os componentes intervenientes nas diferentes fases da preparação dos *chip*-sondas usados na otimização do biossensor.

Passado o período de incubação, registou-se para o *chip*-sonda A, um deslocamento de cerca de 4 nm ( $\Delta\lambda_{\max} = 4,1 \pm 0,6$  nm), que comparativamente ao valor obtido para o *chip*-sonda B de cerca de 15 nm ( $\Delta\lambda_{\max} = 15,2 \pm 2,8$  nm), nas mesmas condições, é um valor considerado baixo (cerca de 30%), sendo apenas referido como controlo.



**Figura 5. 13 – Deslocamentos de ressonância plasmônica ( $\Delta\lambda_{\max}$ ) em função dos elementos intervenientes na funcionalização dos AuNT. Condições experimentais:** 16 horas de incubação em solução de tampão fosfato 1 M (A); solução aquosa de oligonucleótido *sem-SNP* 1  $\mu$ M (B); *chip*-sonda B após incubação com solução de 6-MCH 1 mM (C); *chip*-sonda B após incubação com solução de 6-MCH 5 mM (D). As restantes barras à direita correspondem aos desvios causados após a funcionalização com os oligonucleótidos alterados na posição 5 (*SNP5*), 10 (*SNP10*) e 20 (*SNP20*), às mesmas condições mencionadas para o *chip*-sonda B. Cada barra representa o valor médio de  $\Delta\lambda_{\max}$  nas medições efetuadas a 10-12 AuNT.

De acordo com a cinética da funcionalização, ao fim de 16 horas o *chip*-sonda B demonstrava estar totalmente revestido e, por conseguinte, apto para a hibridação. Desta forma ter-se-á procedido a um ensaio de hibridação com DNA alvo sintético com sequência complementar, tendo-se chegado à conclusão que esta não ocorria, devido à ausência de deslocamento. Por esse motivo, repetiu-se o processo usando os *chips*-sonda C e D, os quais foram sujeitos, para além da incubação com o oligonucleótido *sem-SNP*, a uma incubação adicional com uma solução de 6-MCH de 1 e 5 mM, respetivamente.

A função deste alcanotiol é formar uma monocamada mista 6-MCH/DNA que impeça a adsorção inespecífica de cadeias ssDNA à superfície das AuNP. Este processo ocorre através da remoção dos oligonucleótidos que estejam adsorvidos por zonas de contacto cujas interações são muito fracas<sup>50</sup>, melhorando simultaneamente a acessibilidade dos oligonucleótidos imobilizados para as sequências alvo complementares e consequentemente a eficácia dos eventos de hibridação.

Analisando-se os respetivos deslocamentos presentes na **figura 5.13**, observou-se que à concentração mais alta (*chip*-sonda D, MCH a 5 mM), o valor obtido foi bastante elevado ( $\Delta\lambda_{\max} = 23,8 \pm 2,8$  nm) comparativamente ao do *chip*-sonda B, existindo provavelmente um excesso de 6-MCH à superfície do AuNT. Em contrapartida no caso do *chip*-sonda C (MCH de 1 mM), embora se verifique

um deslocamento superior aos 15,3 nm do *chip*-sonda B ( $\Delta\lambda_{\max} = 16,3 \pm 3,1$  nm), o valor parece ser mais aceitável, dado que para todos os efeitos, o RI mudou. Levantou-se assim a hipótese de que à concentração de 5 mM, o rácio MCH/DNA seria demasiado superior ao desejado e em vez de se formar uma monocamada mista, poder-se-ia estar a remover oligonucleótidos.

Esta hipótese foi confirmada depois do ensaio de hibridação, uma vez que à concentração de 5 mM, a hibridação ocorria, no entanto, o deslocamento era reduzido quando comparado com o observado para a concentração mais baixa de 6-MCH 1 mM (ver **figura 5.15** seguidamente, na **secção 5.3.5.1.1**).

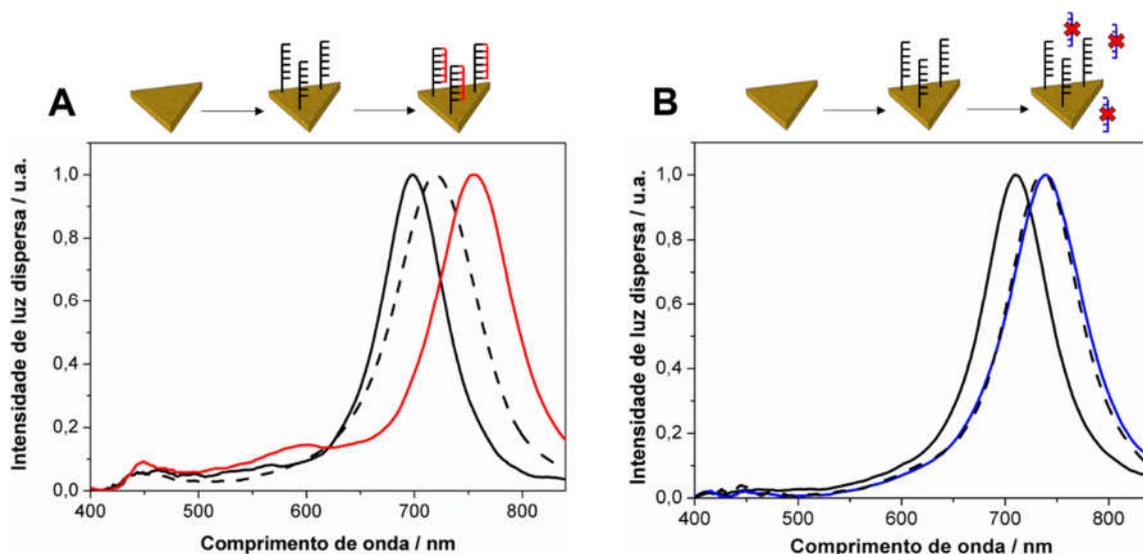
Outro aspeto a referir é o facto de, independentemente da sequência dos oligonucleótidos (bases diferentes nas posições 5, 10 e 20), o RI não sofre qualquer alteração. Como se trata do mesmo “meio”, à mesma concentração, o impacto da alteração de 1/20 bases não é suficiente para contribuir para que a luz disperse num ângulo distinto. Os valores de  $\Delta\lambda_{\max}$  correspondentes rondam todos os 15-16 nm, concluindo-se, portanto, que apenas a natureza e concentração de um novo constituinte no ambiente químico da NP faz mudar o RI.

Em suma, a presença de iões fosfato, oligonucleótidos e do 6-MCH é detetada pelos AuNT, isto é, sempre que se muda o meio de refração. Para além disso, a concentração dos mesmos pode ser igualmente monitorizada através dos deslocamentos provocados.

### **5.3.5 Hibridação dos *chips*-sonda com alvos de DNA**

A forma de avaliar o método proposto para a deteção de sequências específicas de DNA foi através da análise do comprimento de onda da banda LSPR, antes e depois da reação de hibridação, mais concretamente, verificar se ocorre deslocamento. Para o efeito, atendeu-se ao comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) da banda LSPR característica da nanossonda e, de acordo com a natureza da amostra, espera-se uma resposta do tipo “sim” ou “não”, associado ao facto de a hibridação ter ocorrido ou não.

De acordo com os esquemas da **figura 5.14**, prevê-se que no caso do alvo de DNA ser complementar à nanossonda imobilizada no *chip*, a ligação ao ser específica com a sequência de bases de interesse, contribui para um desvio para o vermelho. Isto ocorre devido ao aumento da quantidade de DNA à superfície do AuNT fazer com que esta disperse mais luz (espectro da **figura 5.14A**). Em contrapartida, se o alvo de DNA é não complementar, não ocorre emparelhamento em nenhuma zona da sequência, inviabilizando a alteração da ressonância plasmónica (**figura 5.14B**).



**Figura 5. 14 – Representação esquemática de um ensaio de deteção e respetivos espectros LSPR.** Deslocamentos da ressonância plasmónica relativos ao *chip*-sonda C (oligonucleótido *sem-SNP* 1  $\mu$ M + 6-MCH 1 mM) na presença de DNA alvo de sequência complementar (A) e não complementar (B). A linha contínua a preto em ambas as figuras corresponde ao espectro dos AuNT revestidos por CTAB; a linha tracejada ao espectro LSPR do *chip*-sonda C antes da hibridação; a linha **vermelha** em A corresponde ao espectro depois da hibridação com o alvo complementar (1  $\mu$ M) e a linha **azul** em B corresponde ao espectro depois da hibridação na presença do alvo não complementar (1  $\mu$ M). A reação de hibridação ocorreu à  $T_{amb}$  durante 3 horas usando o tampão SSC (2x).

### 5.3.5.1 Hibridação dos *chips*-sonda com ssDNA sintético

#### 5.3.5.1.1 Otimização das condições de rigor na reação de hibridação (e da concentração de 6-MCH) com *chips*-sonda de AuNT

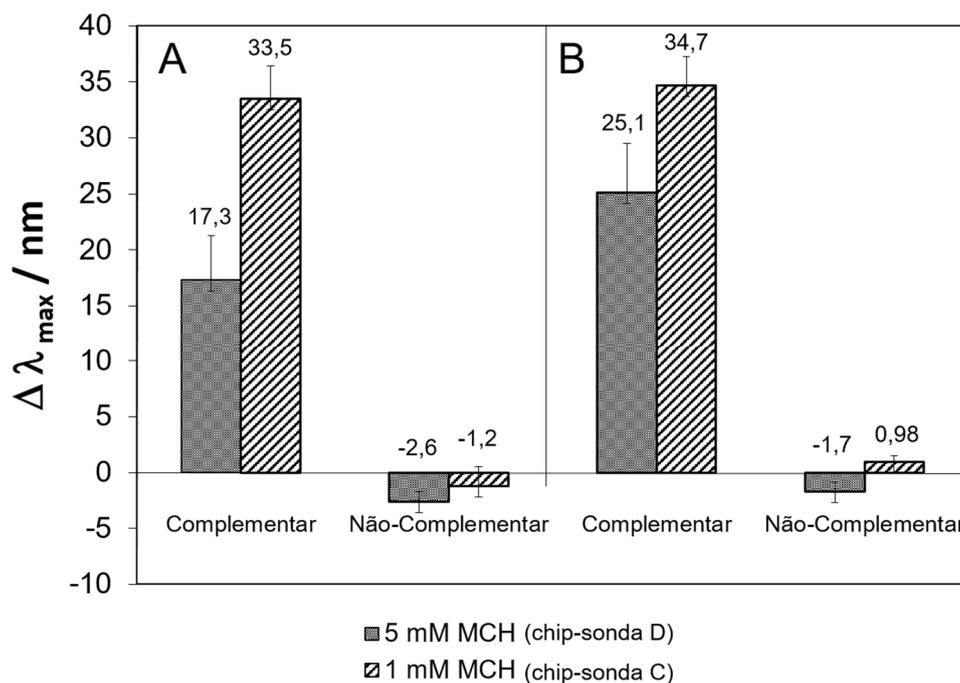
As condições de rigor de hibridação influenciam o desempenho de uma reação de hibridação. Em situações em que é necessário um alto desempenho, isto é, hibridações com elevado rigor, como é o caso, a temperatura a que decorre a hibridação, bem como o tempo incubação com o alvo de DNA e a concentração de sais envolvidos são fatores que devem ser testados. Embora o alcanotiol 6-MCH não faça parte dos parâmetros de avaliação do rigor em eventos de hibridação, uma vez que se está a desenvolver um biossensor com recurso a AuNP, a sua utilização revela um elevado impacto no seu desempenho, ou seja, na discriminação dos alvos complementar e não-complementar.

Nesse sentido recorreram-se apenas aos alvos sintéticos (ssDNA) e só após otimização das condições experimentais é que se procedeu aos ensaios com as amostras de produtos de *PCR* (dsDNA), provenientes de amostras clínicas.

Como os alvos utilizados nesta fase de otimização são oligonucleótidos sintéticos com 50 bp, ou seja, moléculas de DNA de cadeia simples, o passo de desnaturação foi ignorado. Como tal, procedeu-se apenas à variação controlada da temperatura para dois valores, 37  $^{\circ}$ C e 25  $^{\circ}$ C ( $T_{amb}$ ),

respetivamente. Em questões de temperatura, (**anexo V**, nas **tabelas A5.1 e A5.2**) concluiu-se que não só a hibridação com ssDNA alvo ocorreu sem qualquer limitação a  $T_{amb}$ , como provocou deslocamentos mais consistentes com ambos os alvos (especialmente com o não-complementar) ao fim de 3 horas.

Adicionalmente, efetuaram-se ensaios nos quais se procedeu à variação das concentrações de tampão SSC e 6-MCH, respetivamente. Os resultados obtidos apresentam-se no gráfico comparativo da **figura 5.15**.



**Figura 5. 15 – Efeito das condições de rigor durante a reação de hibridação e da concentração de MCH.** Deslocamentos de ressonância plasmónica ( $\Delta\lambda_{max}$ ) calculados depois da reação de hibridação com alvos ssDNA complementares e não complementares à  $T_{amb}$ , por um período de incubação de 3 horas. **(A)** SSC 5x concentrado; **(B)** tampão SSC 2x concentrado. Cada barra corresponde à aquisição e análise de espectros UV-Vis de 12 AuNT.

Com base nos resultados apresentados gráfico anterior constata-se que é, inequivocamente, através da concentração mais baixa de 6-MCH (1 mM) que o biossensor fornece respostas com maior discriminação dos alvos.

Quando se comparam os valores de deslocamento provocados pela ligação do alvo ssDNA complementar, verifica-se que uma menor concentração de MCH induz em média um deslocamento superior, cerca de mais de 10 nm. Estas diferenças manifestam-se sobretudo na presença do alvo complementar, indicando que uma maior quantidade de ssDNA está a ligar-se à nanossonda. Em contrapartida, não se verificam diferenças significativas quanto aos alvos não complementares, estando ambos muito próximos de zero.

No que diz respeito à concentração de sais, nomeadamente de cloreto e citrato de sódio, (tampão SSC) embora ocorra simultaneamente hibridação e discriminação dos alvos em ambos os ensaios (A e B), de acordo com os valores obtidos, é na presença de uma concentração mais baixa de tampão SSC (2x concentrado) que a hibridação apresenta melhor desempenho.

Este desempenho é superior devido ao facto de se verificar um maior deslocamento da banda plasmónica, consequência da ligação complementar de mais cadeias de ssDNA (maior concentração de DNA, maior alteração do RI). Por outro lado, na presença do alvo de ssDNA não-complementar não se regista qualquer alteração, em termos de comprimento de onda da banda plasmónica. A explicação para o sucedido é o facto de não ao não existir complementaridade das sequências envolvidas, a hibridação não ocorre.

O *chip*-sonda C é, portanto, o transdutor cujas características revelam, no geral, um melhor desempenho na hibridação e discriminação dos alvos complementar e não-complementar, tal como confirmado tanto pelas evidências aqui apresentadas, como pelas já referidas anteriormente (**figura 5.13** da secção **5.3.4.1.2**). As condições da hibridação cujos resultados foram mais promissores, incluíam temperatura e tempo de incubação dos alvos ssDNA, de 25 °C e 3 horas, respetivamente, assim como um meio salino 2x concentrado em tampão SSC.

#### **5.3.5.2 Hibridação dos chips-sonda C (AuNT e AuNP-80) com produtos PCR provenientes de amostras clínicas**

Otimizadas as condições envolvidas na preparação do *chip*-sonda C de AuNT, assim como as de hibridação, na deteção de alvos de ssDNA de 50 bp, procedeu-se seguidamente à sua aplicação na deteção de eventos de hibridação com alvos de produtos de PCR (dsDNA). Este processo foi repetido também para *chips*-sonda de AuNP-80 nas mesmas condições do *chip*-sonda C.

Com o intuito de uma posterior comparação do desempenho de ambos os biossensores (AuNT e AuNP-80), todos os procedimentos e condições experimentais foram escrupulosamente repetidos em cada caso. A única alteração efetuada, foi a inserção de mais um passo, nomeadamente a desnaturação dos fragmentos de dsDNA. No entanto, esta desnaturação ocorreu de forma independente ao sistema, não interferindo ou prejudicando assim a ocorrência ou sucesso da hibridação.

Com base na **tabela 5.4**, onde constam os resultados obtidos nas deteções envolvendo produtos de PCR, é evidente o sucesso da hibridação com ambos os biossensores. As sucessivas lavagens dos *chips*-sonda garantem que todos os fragmentos de DNA não hibridados são removidos da superfície das AuNP.

**Tabela 5. 4** – Deslocamentos de ressonância plasmónica ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ) após a reação de hibridação dos *chip*-sondas (preparados às mesmas condições do *chip*-sonda C para ambas as AuNP) com produtos de *PCR*, com sequência complementar (C) e não complementar (NC). Condições de hibridação previamente otimizadas (3 horas a 25 °C com SSC 2x e 1 mM de MCH). Cada valor representa a média de valores obtidos para 10-12 AuNT.

<i>Chip</i> -Sonda	DNA alvo Produto <i>PCR</i> (dsDNA)	$\Delta\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$
<b>AuNT</b>	C	21,6 ± 2,8
	NC	-0,4 ± 0,1
<b>AuNP-80</b>	C	13,5 ± 2,1
	NC	-3,2 ± 1,4

Se por um lado, o *chip*-sonda de AuNT discrimina especificamente os dois alvos, o *chip*-sonda de AuNP-80 também o faz, embora o desvio provocado na presença do alvo complementar seja cerca de metade do valor obtido para o primeiro. A total ausência de desvios observados na hibridação com o alvo não complementar atribui características de elevada especificidade e seletividade a ambos os biossensores. A discrepância verificada ao nível dos desvios obtidos nos ensaios com o mesmo alvo complementar pode estar relacionada com o facto das AuNP, dada a sua morfologia distinta, apresentarem diferentes sensibilidades ao RI do meio. Ao existir uma maior concentração dos campos magnéticos dipolares nos vértices dos AuNT, leva a que se dê a sobreposição de várias ressonâncias plasmónicas, tornando neste caso a banda plasmónica longitudinal dos AuNT bastante mais sensível a alterações ao seu meio do que as AuNP-80 que apenas apresentam uma banda LSPR.

Para além disso, procedeu-se à comparação do desempenho do mesmo *chip*-sonda na presença de alvos de origens e dimensões diferentes. A deteção de DNA com alvos de origem sintética (50 bp) ou com produtos de *PCR* (345bp) revelou que hibridação é mais eficaz na presença do DNA sintético, uma vez que causou um maior deslocamento. As diferenças observadas revelaram um maior desvio da ressonância plasmónica provocado na presença de DNA alvo sintético (35 nm), possivelmente devido ao facto do oligonucleótido presente no *chip*-sonda e o alvo sintético possuírem sensivelmente do mesmo tamanho. Ao passo que o produto de *PCR* provocou um desvio de 20 nm, como é cerca de 17x o tamanho do oligonucleótido, este facto poderá causar um impedimento estérico que dificulta a ocorrência da hibridação.

### **5.3.5.3 Influência da alteração e localização de um nucleótido não compatível na sonda complementar ao alvo, na eficiência da deteção de eventos de hibridação (*chips*-sonda de AuNT)**

A preparação dos *chips*-sonda com os oligonucleótidos alterados foi realizada de acordo com as condições experimentais otimizadas estabelecidas para o oligonucleótido *sem-SNP*, dadas as semelhanças anteriormente observadas nos deslocamentos de ressonância plasmónica (ver **figura 5.13** da secção **5.3.4.1.2**).

Os oligonucleótidos apresentavam alterações efetuadas em laboratório, em três locais diferentes, nomeadamente: SNP5 (junto da extremidade terminal 5', perto do enxofre e, portanto, da superfície do AuNT); SNP10 (a meio da sequência) e SNP20 (na última base, junto da sua extremidade 3' terminal).

Com base num estudo exaustivo da eficiência do *chip*-sonda de AuNT na deteção de eventos de hibridação, utilizaram-se três *chips*-sonda com as sequências mencionadas, ao mesmo tempo que se tentou averiguar de que forma o seu posicionamento tem influência na hibridação com alvos complementares sintéticos (50 bp). Os resultados obtidos relacionados com este estudo comparativo estão apresentados na **tabela 5.5**.

**Tabela 5. 5 – Deslocamentos de ressonância plasmónica ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ) após reação de hibridação das nanossondas com alvos complementares de DNA sintético.** As sequências das sondas foram alteradas num nucleótido, localizado na posição 5, 10 e 20; aplicação das condições de hibridação previamente otimizadas. Cada valor representa a média de valores obtidos para 10-12 AuNT.

Sondas	$\Delta\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$
<b>SNP5</b>	4,1 $\pm$ 2,7
<b>SNP10</b>	11,7 $\pm$ 4,1
<b>SNP20</b>	34,7 $\pm$ 2,4

No ensaio com o *chip*-sonda formado por AuNT funcionalizados com o oligonucleótido SNP5 observou-se um deslocamento médio da ressonância plasmónica de 4,1  $\pm$  2,7 nm, indicando uma hibridação pouco eficiente, ou seja, a quantidade de ssDNA que ligou foi demasiado baixa. A existência de um nucleótido incompatível com o alvo, tão perto da extremidade 5' (junto à superfície do AuNT) conduz à não-complementaridade de mais de 75% da sequência alvo. De facto, das 20 bases complementares presentes no alvo, a probabilidade de as 4 primeiras ligarem especificamente é muito menor, pois como se trata de uma SAM hibridação do resto da sequência é dificultada.

Com a alteração a meio da sequência, na posição 10, a reação conduz a uma maior percentagem de moléculas ssDNA hibridadas, traduzindo-se num deslocamento de ressonância médio de 11,7  $\pm$  4,1 nm. Este valor sendo que é um pouco mais do dobro do anterior, está em acordo com o maior número de bases que se ligam ao alvo.

Por último, quando o SNP está localizado na base da extremidade 3' (mais afastado do AuNT) não se regista praticamente qualquer diferença entre o valor de deslocamento de ressonância obtido com o oligonucleótido alterado e o oligonucleótido totalmente complementar (32,4  $\pm$  2,6 nm e 34,7  $\pm$  2,6 nm, respetivamente). Deste modo, a existência de um nucleótido incompatível nesta posição não parece afetar a hibridação com o alvo de ssDNA, na medida em que 19/20 bases ligam especificamente.

## 5.4 Conclusões e considerações finais

A formação e utilização de *chips*-sonda usando AuNT para a detecção de eventos de hibridação foi alcançada com sucesso. Após várias etapas de otimização das condições experimentais inerentes à sua preparação, concluiu-se que a funcionalização deve compreender períodos de incubação à temperatura ambiente de no mínimo 16 horas. Isto porque ao fim de 2 horas, embora tudo indicasse que a superfície já se encontrava totalmente revestida e saturada em oligonucleótidos, dado que ao longo do tempo (até 24 horas) não se registaram desvios de ressonância plasmónica significativos; quando se procedeu à reação de hibridação e à análise dos resultados, percebeu-se através dos espetros LSPR que não só não tinha ocorrido a hibridação, como todos os oligonucleótidos tinham sido completamente removidos da superfície. Ao fim de 2 horas, os oligonucleótidos não estavam ligados pelo grupo tiol, apenas electrostaticamente adsorvidos à superfície, ao passo que ao fim de 16 horas, para além da interação já apresentar um caráter covalente-dativo, os oligonucleótidos possivelmente estariam mais organizados ao redor dos AuNT.

A incubação adicional do *chip* contendo os AuNT funcionalizados numa solução de 6-MCH foi imprescindível para ocorrer detecção e discriminação das sequências de DNA. O alcanotiol tem aqui o papel de promover a formação de uma SAM mista alternada. Esta SAM “mista” impediu que os oligonucleótidos interagissem inespecificamente entre si, o que poderia ter constituído um obstáculo à reação de hibridação, uma vez que estas não teriam as suas sequências disponíveis para os alvos. A determinação da concentração de 6-MCH ideal correspondeu à quantidade mínima de moléculas que não causasse desvios, ou seja, não provocasse alterações significativas no RI dos AuNT. A concentração só ficou estabelecida, após validação através de ensaios de hibridação com *chips*-sonda, tendo-se chegado à conclusão que a incubação numa solução de 6-MCH 1 mM, não só melhorava o desempenho da detecção como a discriminação dos alvos, fossem eles sintéticos ou produtos de *PCR*.

Em suma, as condições de preparação do *chip*-sonda que provocaram maiores deslocamentos de ressonância plasmónica, ou seja, que revelaram uma maior eficiência na detecção, refletida na percentagem de alvos hibridados, foram: **16 horas de incubação com oligonucleótido 1  $\mu$ M + 1 hora de incubação com 6-MCH 1 mM**. As condições da hibridação cujos resultados foram mais promissores incluíam **temperatura (25 °C)** e tempo de **incubação 3 horas com os alvos ssDNA**, assim como um meio salino **2x concentrado em tampão SSC**.

Embora os processos de otimização envolvidos na preparação dos *chips*-sonda e do seu desempenho na detecção de DNA em eventos de hibridação tenham sido apenas realizados para os AuNT, a aplicação dos parâmetros experimentais estabelecidos para esta morfologia foi estendida também às AuNP-80. Apesar dos resultados terem sido ambos favoráveis e promissores, na medida em que foi possível detetar e discriminar os alvos de DNA, os deslocamentos causados ao nível da banda de ressonância plasmónica das AuNP-80 foram de menor valor absoluto, relativamente aos dos AuNT. O facto do desempenho dos *chips*-sonda à base de AuNT ter sido superior aos seus homólogos de AuNP-80, veio de facto confirmar as expectativas geradas em volta do presente estudo, nomeadamente no que diz respeito à vantagem da utilização de NP não esféricas em detrimento das esféricas. Trabalhos semelhantes desenvolvidos com NP de geometria triangular <sup>157, 202, 213, 214</sup>

suportaram a teoria, demonstrando que este tipo de AuNP adequa-se melhor a sistemas de biorreconhecimento em superfície. A sensibilidade ao RI destes biossensores depende sobretudo da existência de extremidades pontiagudas ou bem definidas na sua superfície, ou seja, de zonas onde há uma maior interação entre ressonâncias plasmónicas, que por sua vez, originam campos eléctricos mais fortes. Portanto, quanto menos truncados fossem os vértices dos AuNT e menos curvas as suas arestas, mais sensíveis estas nanoestruturas demonstraram ser enquanto transdutores óticos. Os resultados obtidos na detecção das sequências de DNA foram também corroborados pelos valores de sensibilidade estimados em solução, para ambas as AuNP. Estes indicaram através da medição do RI de misturas de cada tipo de AuNP com glucose, que às mesmas concentrações de glucose, os deslocamentos de ressonância plasmónica causados com os AuNT eram em média 3x superiores aos registados com as AuNP-80.

A detecção específica de sequências de DNA em eventos de hibridação com os *chips*-sonda à base de AuNT ocorreu favoravelmente tanto com os alvos de DNA sintético como com os produtos de *PCR*. Contudo, verificou-se uma maior percentagem de alvos hibridados na presença de alvos sintéticos, face aos produtos de *PCR*. O estabelecimento de ligações não específicas causadas pelo tamanho do produto *PCR* pode estar na base do problema, uma vez que há uma maior probabilidade de emparelhamento em zonas que não sejam a de interesse. Por fim, concluiu-se também que a existência de SNP estrategicamente colocados na sequência da sonda, afetou a detecção das sequências específicas de DNA. Assim, quanto mais junto da superfície do AuNT estava posicionado o SNP, mais a reação de hibridação foi inibida. Em contrapartida, quando o SNP estava na extremidade oposta à superfície do AuNT, parece não ter comprometido a detecção, sendo que o desvio obtido foi sensivelmente o mesmo do que foi observado para a sequência totalmente complementar, ou seja, sem qualquer alteração.

Embora este biossensor tenha dado origem a resultados altamente promissores e o mecanismo da hibridação de sequências de DNA esteja bem estudado e otimizado, o próprio sistema nanotecnológico, ou seja, a plataforma de biorreconhecimento, carece ainda de aperfeiçoamento técnico. A análise (seleção e aquisição dos espectros) foi quase toda efetuada manualmente, sendo que para se obter uma quantidade de dados que fosse estatisticamente relevante, os processos requerem demasiado tempo. Neste momento, enquanto técnica de biodeteção à escala de uma empresa é ainda muito dispendiosa em termos de equipamento e acima de tudo, como foi mencionado, de tempo. No entanto, atendendo à rápida expansão e evolução tecnológica e ao facto de se caminhar no sentido de automatizar os processos de análise de dados, estes poderão ser alguns bons argumentos para se usar este tipo de sistema, muitas vezes integrado em dispositivos com funções complementares, possíveis soluções para biossensores de DNA ou de um outro componente bioquímico (enzimas, proteínas...).

## 5.5 Referências bibliográficas

1. Schneider, T.; Jahr, N.; Jatschka, J.; Csáki, A.; Stranik, O.; Fritzsche, W. *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, 15, (4), 1-10.
2. Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. *Chemical Reviews* **2012**, 112, (5), 2739-2779.
3. Jans, H.; Huo, Q. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, (7), 2849-2866.
4. Doria, G.; Conde, J.; Veigas, B.; Giestas, L.; Almeida, C.; Assunção, M.; Rosa, J.; Baptista, P. V. *Sensors* **2012**, 12, (2), 1657.
5. Peixoto de Almeida, M.; Pereira, E.; Baptista, P.; Gomes, I.; Figueiredo, S.; Soares, L.; Franco, R., Chapter 13 - Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Miguel, V.; Ángela, I. L.-L., Eds. Elsevier: 2014; Vol. Volume 66, pp 529-567.
6. Csáki, A.; Thiele, M.; Jatschka, J.; Dathe, A.; Zopf, D.; Stranik, O.; Fritzsche, W. *Engineering in Life Sciences* **2015**, 15, (3), 266-275.
7. Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E. *Analytical Biochemistry* **1998**, 262, (2), 137-156.
8. Schultz, S.; Smith, D. R.; Mock, J. J.; Schultz, D. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, 97, (3), 996-1001.
9. Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (14), 7238-7248.
10. Millstone, J. E.; Hurst, S. J.; Métraux, G. S.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. *Small* **2009**, 5, (6), 646-664.
11. Beeram, S. R.; Zamborini, F. P. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, (33), 11689-11691.
12. Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jäckel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, J. *Advanced Materials* **2010**, 22, (16), 1805-1825.
13. Hao, E.; Schatz, G. C. *The Journal of Chemical Physics* **2004**, 120, (1), 357-366.
14. Chun, A. L. *Nature Nanotechnology* **2009**.
15. Aherne, D.; Charles, D. E.; Brennan-Fournet, M. E.; Kelly, J. M.; Gun'ko, Y. K. *Langmuir* **2009**, 25, (17), 10165-10173.
16. Thiele, M.; Götz, I.; Trautmann, S.; Müller, R.; Csáki, A.; Henkel, T.; Fritzsche, W. *Materials Today: Proceedings* **2015**, 2, (1), 33-40.
17. Nguyen, A. H.; Lee, J. U.; Sim, S. J. *Journal of Optics* **2015**, 17, (11), 114022.
18. Sabine, S.; Vera, G. P.; Mael, M.; Rabah, B. *Nanotechnology* **2008**, 19, (19), 195712.
19. Li, Y.; Shi, W.; Gupta, A.; Chopra, N. *RSC Advances* **2015**, 5, (61), 49708-49718.
20. Fang, Y.; Hoh, J. H. *Nucleic Acids Research* **1998**, 26, (2), 588-593.
21. Hu, M.; Novo, C.; Funston, A.; Wang, H.; Staleva, H.; Zou, S.; Mulvaney, P.; Xia, Y.; Hartland, G. V. *Journal of materials chemistry* **2008**, 18, (17), 1949-1960.
22. Miranda, A.; Malheiro, E.; Skiba, E.; Quaresma, P.; Carvalho, P. A.; Eaton, P.; de Castro, B.; Shelnut, J. A.; Pereira, E. *Nanoscale* **2010**, 2, (10), 2209-2216.
23. Bhatt, N.; Huang, P.-J. J.; Dave, N.; Liu, J. *Langmuir* **2011**, 27, (10), 6132-6137.
24. Das, J.; Huh, C.-H.; Kwon, K.; Park, S.; Jon, S.; Kim, K.; Yang, H. *Langmuir* **2009**, 25, (1), 235-241.
25. Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, (38), 8916-8920.
26. Tong, P.; Shao, Y.; Chen, J.; He, Y.; Zhang, L. *Analytical Methods* **2015**, 7, (7), 2993-2999.
27. Li, K.; Huang, J.; Shi, G.; Zhang, W.; Jin, L. *Analytical Letters* **2011**, 44, (16), 2559-2570.
28. Nasef, H.; Beni, V.; Özalp, V.; O'Sullivan, C. *Anal Bioanal Chem* **2010**, 396, (7), 2565-2574.
29. Sherry, L. J.; Jin, R.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Nano Letters* **2006**, 6, (9), 2060-2065.
30. Haes, A. J.; Hall, W. P.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P. *Nano Letters* **2004**, 4, (6), 1029-1034.
31. *Nanoplasmonic Sensors*. 1 ed.; Springer-Verlag New York: Springer, 2012; p 314.

32. Endo, T.; Kerman, K.; Nagatani, N.; Takamura, Y.; Tamiya, E. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, (21), 6976-6984.
33. Wang, J. *Biosensors and Bioelectronics* **1998**, *13*, (7–8), 757-762.
34. Haes, A. J.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, (7), 2264-2271.
35. Poesi, C.; Albertini, A.; Ghielmi, S.; Cassani, G.; Corti, A. *Cytokine* **1993**, *5*, (6), 539-545.
36. Ha Minh, H.; Tsuyoshi, N.; Masato, S.; Shohei, Y.; Yuzuru, T.; Eiichi, T. *Japanese Journal of Applied Physics* **2008**, *47*, (2S), 1337.
37. Dubochet, J.; Ducommun, M.; Zollinger, M.; Kellenberger, E. *Journal of Ultrastructure Research* **1971**, *35*, (1), 147-167.
38. Sperling, R. A.; Rivera Gil, P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, (9), 1896-1908.
39. West, J. L.; Halas, N. J. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2003**, *5*, (1), 285-292.
40. Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, (6), 2115-2120.
41. Hu, R.; Yong, K.-T.; Roy, I.; Ding, H.; He, S.; Prasad, P. N. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, (7), 2676-2684.
42. Yunus, W. M. b. M.; Rahman, A. b. A. *Appl. Opt.* **1988**, *27*, (16), 3341-3343.
43. Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. *Langmuir* **2011**, *27*, (17), 11098-11105.
44. Yao, G.; Pei, H.; Li, J.; Zhao, Y.; Zhu, D.; Zhang, Y.; Lin, Y.; Huang, Q.; Fan, C. *NPG Asia Mater* **2015**, *7*, e159.
45. Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, (24), 8313-8318.
46. Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Langmuir* **2002**, *18*, (17), 6666-6670.
47. Zhang, X.; Liu, B.; Servos, M. R.; Liu, J. *Langmuir* **2013**, *29*, (20), 6091-6098.
48. Huber, M.; Wei, T.-F.; Müller, U. R.; Lefebvre, P. A.; Marla, S. S.; Bao, Y. P. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, (18), e137.
49. Linke, D., Chapter 34 Detergents: An Overview. In *Methods in Enzymology*, Richard, R. B.; Murray, P. D., Eds. Academic Press: 2009; Vol. Volume 463, pp 603-617.
50. Kuralay, F.; Campuzano, S.; Wang, J. *Talanta* **2012**, *99*, 155-160.

# **C***apítulo VI.*

Discussão geral e  
perspetivas futuras



Foi apresentada no **capítulo 2** uma proposta de otimização do protocolo vigente de sequenciação de *Sanger* utilizado pela STAB-Vida na determinação de genótipos associados ao SNP C/T-13910, responsável pela IL. Das amostras clínicas disponíveis em cartões FTA, com genótipos previamente identificados, selecionaram-se exemplares de ambos os tipos, homocigóticos (CC ou TT) e heterocigóticos (CT). As alterações efetuadas ao protocolo anterior basearam-se na utilização de diferentes concentrações de *primers* na reação de amplificação por *PCR* e no seu uso direto na reação de sequenciação. O resultado final correspondeu na totalidade às expectativas, uma vez que a aplicação da técnica de *PCR* assimétrico conduziu à formação do fragmento de dsDNA que continha o SNP C/T-13910. Precisamente por ser uma reação assimétrica, o produto desta reação para além do fragmento, inclui ainda uma determinada quantidade de um dos *primers* (não consumido) que servirá para dar início à reação de sequenciação, sem necessitar de purificar o produto. Após a análise dos fluorogramas foi possível confirmar através da reatribuição do genótipo que a reação de sequenciação direta tinha ocorrido com sucesso. Uma vez que os fragmentos de *PCR* seriam posteriormente utilizados como alvos de dsDNA nos sistemas nanotecnológicos, esta otimização não só foi vantajosa no decurso do trabalho, como para a empresa que, após a sua implementação, poderá ver os custos associados ao teste genético da IL decrescerem cerca de 12% (menos 1 €/análise, face ao protocolo anterior).

Para o desenvolvimento dos sistemas nanotecnológicos propostos recorreu-se ao uso de AuNP enquanto transdutores óticos. Visto que um dos grandes objetivos deste projeto de doutoramento foi averiguar o desempenho dos nanobiossensores baseado na morfologia da AuNP, no **capítulo 3** sintetizaram-se através de reações de redução química, AuNP esféricas com diferentes tamanhos (15 e 80 nm) e AuNP não esféricas (nanotriângulos e nanoestrelas). Embora os métodos químicos utilizados para a sua obtenção tenham sido baseados em procedimentos descritos na literatura; os relativos à síntese das AuNP esféricas, uma vez que se encontram otimizados, foram implementados e escalados para maiores volumes com sucesso. Em contrapartida, os métodos adotados para a síntese das AuNP não esféricas que derivam de abordagens que visam um crescimento mediado por *seeds*, necessitaram de alguns ajustes às condições descritas, de modo a obterem-se AuNP com as características e dimensões pretendidas. Aspectos como a reprodutibilidade e repetibilidade entre sínteses foram assegurados através do controlo preciso **i)** do tamanho das *seeds* e da agitação (homogeneização), **ii)** do pH das soluções e intensidade de luz, para as sínteses de AuNS e AuNT, respetivamente. Em contexto laboratorial, o aumento de escala destas reações químicas foi alcançado com êxito. Praticamente todos os métodos abordados neste trabalho requerem processos mecânicos que garantam a homogeneização das misturas reacionais, o que tem implicações diretas na redução do ouro e conseqüentemente, na formação das AuNP. A agitação, por exemplo, que contribui bastante para a diminuição da polidispersão de tamanhos e para o crescimento controlado das AuNP, é um dos fatores essenciais para assegurar a reprodutibilidade das sínteses. No entanto, sabe-se que o aumento da potência de agitação gera calor, calor esse que, ao ser transferido para a solução, faz aumentar a temperatura do meio reacional constituindo assim uma limitação na sua implementação. De facto, variações na temperatura reacional podem causar alterações das características das nanopartículas obtidas ou podem até mesmo impedir a ocorrência da reação.

Com as AuNP ao dispor, desenvolveram-se no **capítulo 4** dois nanobiossensores em solução utilizando AuNP esféricas (AuNP-15) e AuNP em forma de estrela (AuNS), com o objetivo de comparar o seu desempenho na deteção do SNP C/T -13910. Este estudo surgiu na sequência de um trabalho anteriormente desenvolvido para a STAB-Vida, no qual se elaborou um biossensor colorimétrico com base na agregação de AuNP esféricas, segundo um método *non-crosslinking*. Através da alteração das propriedades óticas das AuNP decorrente da adição de um eletrólito, o biossensor desenvolvido permitiu detetar ácidos nucleicos (SNP e mutações) em amostras humanas. No presente trabalho recorreu-se à mesma abordagem, adequando o sistema para o alvo da IL.

As AuNP (AuNP-15 e AuNS) depois de funcionalizadas com oligonucleótidos tiolados (nanossondas-15 e nanossondas-S) foram usadas para detetar e discriminar entre amostras de DNA (produtos de *PCR*) homozigóticas, complementares às que continham o SNP. Durante a caracterização e otimização das nanossondas concluiu-se que tanto as nanossondas-15 como as nanossondas-S com sequências nucleótídicas maiores (20 bases) e razões [oligonucleótido: AuNP] de 1:150 e 1:250, respetivamente apresentam melhor eficiência de discriminação. Os resultados de cada ensaio foram obtidos em menos de 4 horas, incluindo a preparação da amostra por amplificação por *PCR*. As vantagens mais relevantes do uso de AuNS neste tipo de biossensor colorimétrico face às AuNP-15 são a sensibilidade associada às AuNP não esféricas e o facto de as cores da nanossonda-S antes e depois da agregação, na gama de comprimentos de onda nos quais estes ensaios foram efetuados, permitirem um tipo de resposta menos ambígua do que a apresentada com as AuNP-15 (vermelho-lilás-rosa). As LSPR correspondentes às extremidades pontiagudas das AuNS, como absorvem em comprimentos de onda muito próximos do infravermelho, apresentam uma ressonância plasmónica muito mais forte, conferindo-lhes maior sensibilidade. Este aspeto foi validado através da deteção colorimétrica “a olho nu” para menores concentrações de DNA alvo (6-9 ng/ $\mu$ L). Para além disso, na presença do alvo com o SNP C/T -13910, a nanossonda-S que apresentava cor azul na ausência de sal agrega, o que faz com que a LSPR se desloque para comprimentos de onda fora da gama do visível (~810 nm), traduzindo-se numa solução incolor. Este fenómeno remete para a criação de um sistema colorimétrico de resposta “sim / não” associado respetivamente, à presença ou ausência da cor azul, representando assim uma abordagem mais fidedigna para ser aplicada em dispositivos óticos, face à homóloga com AuNP esféricas.

Embora os resultados com a nanossonda-S sejam bastante promissores na deteção de amostras homozigóticas, até se alcançar a sua implementação num sistema *POC* é imperativo avaliar a possibilidade de detetar de igual modo, amostras heterozigóticas. Este método colorimétrico pode ainda beneficiar da adaptação de instrumentos de deteção no infravermelho ou mesmo da utilização adicional de outro tipo de morfologia de AuNP, nomeadamente de um sistema com multissondas. O estabelecimento das condições de preparação das nanossondas-S e dos parâmetros inerentes aos ensaios de deteção resultaram da aplicação das suas homólogas otimizadas para as nanossondas-15. Como tal, este novo sistema beneficiaria de uma otimização mais específica às características das AuNS, de modo a se alcançar maior especificidade, diminuição dos *LOD* e do tempo decorrido desde o processamento da amostra até à validação do teste. Para validar completamente este estudo é

igualmente necessário efetuar-se um estudo estatístico com base em testes “cegos”, isto é, nos quais não se sabe qual o genótipo de cada amostra.

Nos últimos meses deste projeto avançou-se, ainda que de forma bastante preliminar, com a tentativa de transposição destes testes colorimétricos (utilizando as nanossondas-15) em solução para dispositivos de microfluídica digital. Esta parceria com o CENIMAT/I3N (Professor R. Igreja) teve como objetivo testar a estabilidade coloidal das nanossondas no dispositivo-protótipo através da agregação destas com sal e ainda a indução do movimento das gotas na mesma, a fim de avaliar a viabilidade da transposição do teste para uma plataforma de microfluídica digital. Para a avaliação da agregação, embora tenham sido propostos três tipos de medidas distintas: colorimétrica (RGB), impedância e ângulo de contacto, a medição do ângulo de contacto revelou ser a mais promissora.

Entretanto, devido ao facto de se terem enfrentado inúmeras dificuldades na funcionalização de nanotriângulos de ouro (AuNT) com oligonucleótidos em solução, desenvolveram-se no âmbito de uma parceria com o laboratório de Nanobiofotónica do IPHT, Alemanha (Professor W. Fritzsche), dois nanobiossensores de DNA em *chips* de vidro de borossilicato. No **capítulo 5**, o processo de funcionalização e de deteção, inicialmente com alvos sintéticos e posteriormente com os produtos de *PCR*, foi avaliada com base no fenómeno de LSPR por alteração do índice de refração. A principal vantagem da utilização dos AuNT (catiónicos) depositados e imobilizados em *chips* é que relativamente a estarem dispersos em solução, a agregação causada pela neutralização da carga superficial por parte dos oligonucleótidos (aniónicos) é completamente impedida. Depois de otimizadas as condições envolvidas na preparação dos *chips*-sonda com AuNT, estas foram aplicadas aos análogos *chips*-sonda de AuNP-80. Selecionaram-se as condições que provocaram maiores deslocamentos de ressonância plasmónica, ou seja, que revelaram uma maior eficiência na deteção, refletida na percentagem de alvos hibridados. Deste modo, incubaram-se as AuNP com o oligonucleótido tiolado durante 16 horas e 1 hora mais com uma solução de 6-MCH a 1 mM. Por sua vez, as condições da hibridação cujos resultados foram mais promissores incluíam temperatura (25 °C) e tempo de incubação 3 horas com os alvos, assim como um meio salino 2x concentrado em tampão SSC.

O facto do desempenho dos *chips*-sonda à base de AuNT ter sido superior aos seus homólogos de AuNP-80 corroborou os valores estimados para a sensibilidade de ambas as morfologias. Para além disso, quando comparados com o estudo que deu origem a este trabalho, obtiveram-se para os *chips*-sonda de AuNT (~30 nm), desvios da LSPR cerca de 6x maiores do que os obtidos nos *chips*-sonda usados (~5 nm), os quais eram constituídos por AuNP esféricas adquiridas comercialmente. Se por um lado, atendendo às características morfológicas e óticas, a utilização de AuNT nestes biossensores em chip é vantajosa em termos de sensibilidade; por outro, o facto da homogeneidade dos AuNT obtidos em solução ainda ser um fator limitante em processos de síntese de AuNP não esféricas, fez com que houvesse a necessidade de caracterizar e confirmar previamente os seus detalhes estruturais (forma e tamanho). Embora a existência de AuNT truncados poder ter tornado a seleção inicial dos AuNT uma tarefa um pouco mais demorada, dado que era algo difícil conseguir distinguir os AuNT truncados dos bem definidos, as hipotéticas diferenças não constituíram um problema relevante. Ainda assim, perante esta situação propor-se-ia no futuro, o recurso a *chips* nos quais por processos de microfabricação

(litografia p. ex.) se elaborasse um padrão com AuNT do mesmo tamanho e o mais definido possíveis. Visto que o padrão obtido por estes métodos é extremamente homogêneo, poderia até automatizar-se o processo de aquisição de espectros LSPR. Aliás, este processo está presentemente a ser desenvolvido pelo grupo de investigação do IPHT onde foi efetuado o presente estudo; encontram-se a desenvolver um *software* que seja capaz de com base da informação que se fornece à câmara (acoplada ao microscópio), isto é, através das coordenadas referentes a cada tipo de *chip*, a câmara é capaz de identificar a NP e adquirir o seu espectro automaticamente.

Embora este biossensor tenha dado origem a resultados altamente promissores e o mecanismo da hibridação de sequências de DNA esteja bem estudado e otimizado, da forma como foi concebido não possibilitou a deteção do SNP C/T -13910, pois a existência de um SNP não impediu a hibridação da restante sequência nucleotídica. Para além disso, o próprio sistema nanotecnológico, ou seja, a plataforma de biorreconhecimento carece ainda de aperfeiçoamento técnico. A análise (seleção e aquisição dos espectros) foi quase toda efetuada manualmente, sendo que para se obter uma quantidade de dados que fosse estatisticamente relevante, os processos requerem demasiado tempo. Neste momento, enquanto técnica de biodeteção à escala de uma empresa é ainda muito dispendiosa em termos de equipamento e acima de tudo, como foi mencionado, de tempo.

Em suma, perante os resultados obtidos no decurso desta dissertação, pode afirmar-se que os objetivos traçados foram maioritariamente alcançados com êxito. Foram colocadas à disposição da STAB-Vida Lda. duas propostas de biossensores, uma bastante promissora na deteção colorimétrica em solução do SNP C/T -13910 em amostras clínicas (homozigóticas) com AuNS e uma outra com AuNT e em *chip*, que embora a abordagem não tenha permitido a deteção do SNP responsável pela IL, poderá ser redesenhada e melhorada para que se atinja esse propósito; podendo até beneficiar do facto de a metodologia e equipamentos já se encontrarem mais desenvolvidos. De acordo com os interesses da STAB VIDA a implementação do método *non-crosslinking* baseado na deteção colorimétrica será até ao momento mais adequado, na medida em que os custos inerentes a um teste usando AuNS são bastante reduzidos comparativamente aos atuais (sequenciação de *Sanger*). Através desta abordagem, não são necessários equipamentos específicos; aliás, de acordo com os resultados obtido, a mudança de cor das soluções poder ser avaliada visualmente.,

Este tipo de biossensores, quer seja em solução ou em *chip* apresentam um elevado potencial, não só para a deteção de eventos de hibridação de DNA e nucleótidos específicos, como para uma vasta gama de sistemas em biotecnologia, nomeadamente bioquímicos (enzimas, proteínas) e biológicos (bactérias, vírus). Concretamente, ao aliar a microscopia *darkfield* à espectrofotometria UV-Vis é possível reduzir significativamente os limites de deteção dos diversos sistemas de biorreconhecimento, isto porque ao se operar a um nível individual e localizado da AuNP, a interferência do *background* é diminuída drasticamente. As abordagens ao nível da NP permitem ainda monitorar interações e ligações em tempo real e determinar quantidades de analito. Num futuro muito próximo, a tecnologia em *chips* combinada com sistemas de microfluídica, poderão ser integrados em dispositivos *POC*, tornando possível a criação de ferramentas altamente precisas, portáteis e económicas para ensaios clínicos tradicionais usando DNA ou outros componentes biológicos.





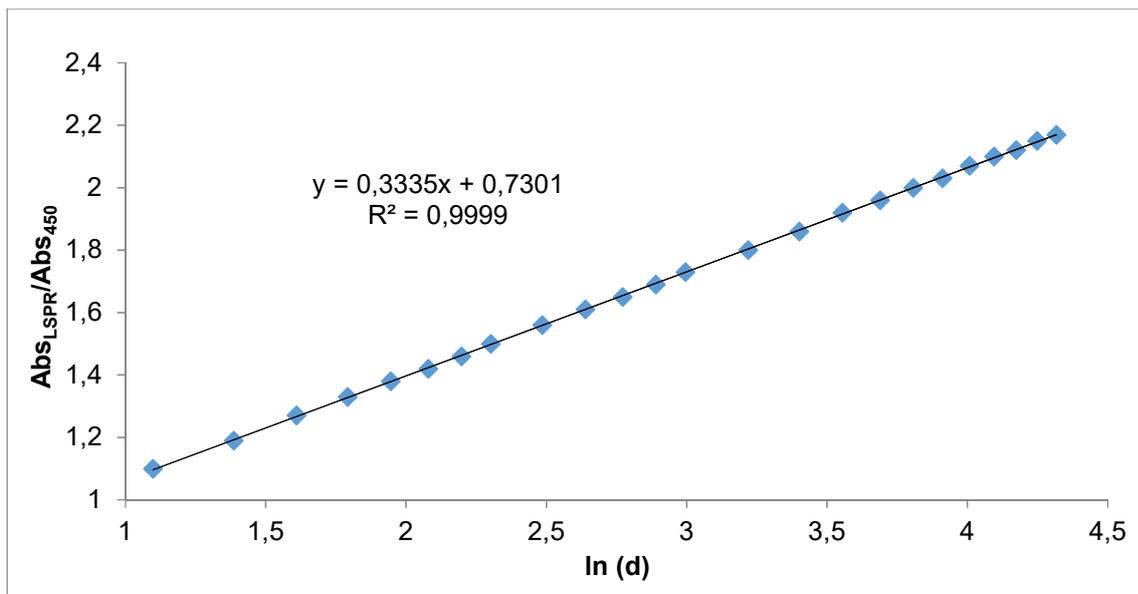
## Anexo III

### A.3.1 Cálculo da concentração de AuNP

#### 1. Método de Haiss *et al.* <sup>75</sup>

Este método permite estimar com elevada precisão, o diâmetro médio ( $d_{NP}$ ) de NP de ouro esféricas dispersas em água e revestidas por citrato, a partir da razão de absorvância da banda plasmónica (LSPR) e da absorvância a 450 nm de uma solução coloidal de NP de ouro (**equação 1**)

$$d_{AuNP} = e^{\frac{\frac{Abs_{LSPR}}{Abs_{450}} - 0,7301}{0,3335}} \quad (1)$$



**Figura A1** – Regressão linear obtida através da razão entre a absorvância na LSPR e a absorvância a 450 nm ( $Abs_{LSPR}/Abs_{450}$ ) em função do logaritmo neperiano do diâmetro da AuNP. Dados teóricos obtidos através do programa FORTRAN 77 “mie-mfp.f”, disponíveis nas informações de suporte relativos à referência <sup>75</sup>.

Este método permite igualmente estimar a concentração de AuNP, embora apenas com as características acima referidas, numa gama de tamanhos de 5-100 nm. Assim, de acordo com **equação 2**, a concentração de AuNP é dada pelo coeficiente de extinção molar a 450 nm,  $(\epsilon_{450})_d$  correspondente ao diâmetro médio obtido na **equação 1**, sendo que este varia em função do diâmetro das AuNP.

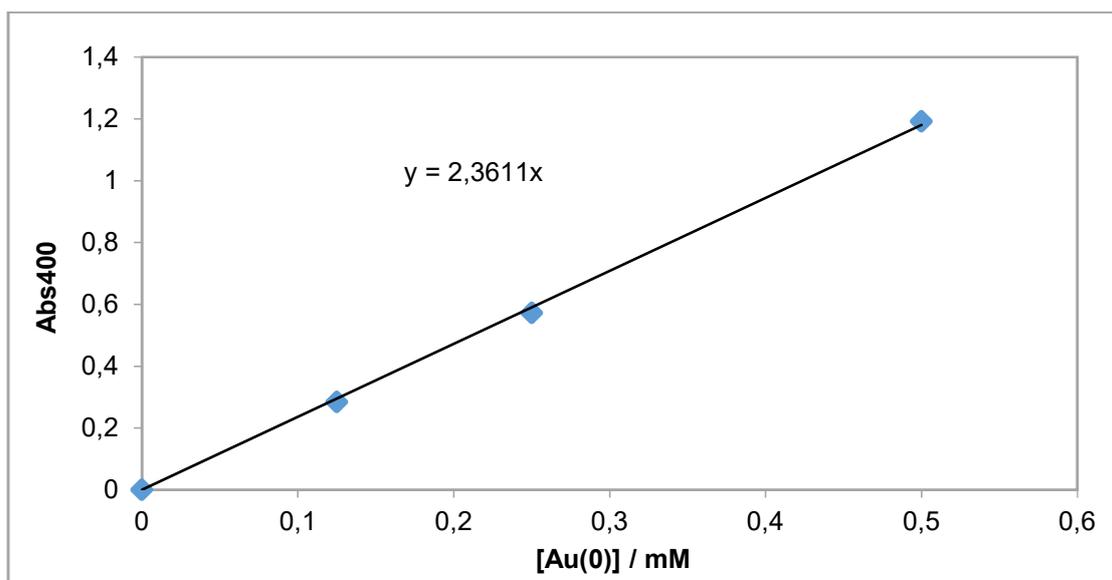
$$[AuNP]_{d(nm)} = \frac{Abs\ 450\ nm}{(\epsilon\ 450)_d} \times \text{fator de diluição} \quad (2)$$

**Tabela A1** - Coeficientes de extinção ( $\epsilon$ ) a  $\lambda = 450$  nm. Lista retirada da informação suplementar da referência <sup>75</sup>

<i>d</i> / nm	$\epsilon_{450}$ / M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	<i>d</i> / nm	$\epsilon_{450}$ / M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	<i>d</i> / nm	$\epsilon_{450}$ / M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
2	4.25E+05	35	3.21E+09	68	2.50E+10
3	1.49E+06	36	3.52E+09	69	2.61E+10
4	3.62E+06	37	3.84E+09	70	2.71E+10
5	7.20E+06	38	4.18E+09	71	2.82E+10
6	1.26E+07	39	4.54E+09	72	2.93E+10
7	2.03E+07	40	4.92E+09	73	3.05E+10
8	3.07E+07	41	5.32E+09	74	3.16E+10
9	4.43E+07	42	5.74E+09	75	3.28E+10
10	6.15E+07	43	6.18E+09	76	3.40E+10
11	8.27E+07	44	6.65E+09	77	3.52E+10
12	1.09E+08	45	7.13E+09	78	3.64E+10
13	1.39E+08	46	7.65E+09	79	3.77E+10
14	1.76E+08	47	8.18E+09	80	3.89E+10
15	2.18E+08	48	8.74E+09	81	4.02E+10
16	2.67E+08	49	9.32E+09	82	4.14E+10
17	3.24E+08	50	9.92E+09	83	4.27E+10
18	3.87E+08	51	1.06E+10	84	4.40E+10
19	4.60E+08	52	1.12E+10	85	4.53E+10
20	5.41E+08	53	1.19E+10	86	4.65E+10
21	6.31E+08	54	1.26E+10	87	4.78E+10
22	7.31E+08	55	1.33E+10	88	4.91E+10
23	8.42E+08	56	1.41E+10	89	5.04E+10
24	9.64E+08	57	1.48E+10	90	5.17E+10
25	1.10E+09	58	1.57E+10	91	5.30E+10
26	1.24E+09	59	1.65E+10	92	5.43E+10
27	1.40E+09	60	1.73E+10	93	5.56E+10
28	1.58E+09	61	1.82E+10	94	5.69E+10
29	1.76E+09	62	1.91E+10	95	5.82E+10
30	1.96E+09	63	2.00E+10	96	5.94E+10
31	2.18E+09	64	2.10E+10	97	6.07E+10
32	2.41E+09	65	2.19E+10	98	6.19E+10
33	2.66E+09	66	2.29E+10	99	6.31E+10
34	2.93E+09	67	2.40E+10	100	6.44E+10

## 2. Método de Hendel *et al.* <sup>71</sup>

Este método permite calcular a concentração das AuNP com base na quantidade absoluta de Au(0) presente no coloide, a partir da absorvância a 400 nm. Uma vez que as AuNP resultam da conversão do sal de ouro no estado de oxidação Au(III) em ouro atômico, Au(0), por intermédio de uma reação de redução. Como tal, independentemente do tamanho, revestimento e/ou morfologia, a concentração de Au(0) corresponde à quantidade de ouro que efetivamente se transformou em NP.



**Figura A2** – Regressão linear obtida através dos valores de absorvância medidos a 400 nm (Abs<sub>400</sub>) para quatro concentrações de Au(0).

$$[\text{Au}(0)]_{\text{AuNP}} = \frac{\text{Abs } 400 \text{ nm}}{2.3611} \quad (3)$$

Assim, calculada a [Au(0)], este valor pode ser aplicado para a determinação da concentração das AuNP antes e após a funcionalização, ou seja, mesmo que o revestimento seja diferente.

$$[\text{AuNP}] = \frac{[\text{Au}(0)]/n(\text{Au})_{\text{AuNP}}}{N_A} \quad (4)$$

### A.3.2 Cálculo da massa de PVP

Estimou-se a área superficial ( $A_{NP}$ ) e o volume ( $V_{NP}$ ) de cada NP admitindo que as *seeds* revelam uma morfologia perfeitamente esférica, através das **equações 5 e 6**. O raio médio das partículas foi estimado espectrofotometricamente usando o método de Haiss *et al.*<sup>75</sup> (**equação 1**).

$$A_{AuNP} = 4 \pi r^2 \quad (5)$$

$$V_{AuNP} = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (6)$$

A determinação da quantidade de PVP equivalente a 60 moléculas por nm<sup>2</sup> de NP compreendeu o cálculo do número de átomos de ouro presentes numa NP esférica com um diâmetro  $d$ , sendo necessário recorrer-se às **equações 2 e 3**, bem como aos valores de densidade ( $\rho_{Au}$ ) e volume ( $V_{Au}$ ) atômico e à massa molecular relativa ( $MM_{Au}$ ), característicos do ouro. Assim, determinada a concentração de AuNP e sabendo a área superficial de cada NP, foi possível calcular a quantidade de PVP necessária para a funcionalização das partículas, através da **equação 7**.

$$m_{PVP} = \frac{n_{total\ AuNP} \times A_{AuNP} \times 60\ moléculas\ PVP}{6,022 \times 10^{23}} MM_{PVP} \quad (7)$$

### A.3.3 Cálculo do volume de Au-seeds a adicionar

Depois de selecionado o *rácio* desejado, correspondente à razão  $[HAuCl_4]/[Au-seeds]$ , o volume de *seeds* a adicionar é calculado de acordo com a **equação 8**. Para a qual, se atende à concentração de  $[HAuCl_4]$  que é adicionada à solução de PVP em DMF; ao  $V_{final}$  de solução e à  $[Au-seeds]$ , que foi estimada através da quantificação de Au(0) por medição da absorvância a 400 nm.

$$V_{seeds} = \frac{[HAuCl_4]}{[seeds]} \times V_{final} \quad (8)$$

## Anexo V

**Tabela A5.1** – Deslocamentos de ressonância plasmônica ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ) depois da hibridação com alvos de DNA sintéticos (ssDNA) complementares – C e não-complementar – NC, em função de diferentes tempos de incubação e condições de rigor (temperatura e concentração de SSC). Cada valor representa a média de valores obtidos para 10-12 AuNT.

<b>Chip-sonda D</b> <b>5 mM MCH</b>	<b>[SSC]</b>	<b>Alvo sintético ssDNA</b>	<b><math>\Delta\lambda_{\text{máx}}</math> / nm</b>
<b>2 horas a 37 °C</b>	5X	C	20,3 ± 2,3
		NC	-2,5 ± 1,2
	2X	C	24,3 ± 5,0
		NC	-1,7 ± 0,8
<b>2 horas a 25 °C</b>	5X	C	2,1 ± 0,8
		NC	-5,4 ± 1,2
	2X	C	N.D.*
		NC	N.D.*
<b>3 horas a 37 °C</b>	5X	C	12,3 ± 2,9
		NC	-4,5 ± 1,0
	2X	C	15,3 ± 5,6
		NC	-5,7 ± 0,6
<b>3 horas a 25 °C</b>	5X	C	17,3 ± 4,0
		NC	-2,6 ± 0,9
	2X	C	25,1 ± 4,4
		NC	-1,1 ± 0,8

**Tabela A5.2** – Deslocamentos de ressonância plasmônica ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ) depois da hibridação com alvos de DNA sintéticos (ssDNA) complementares – C e não-complementar – NC, em função de diferentes tempos de incubação e condições de rigor (temperatura e concentração de SSC). Cada valor representa a média de valores obtidos para 10-12 AuNT.

<b>Chip-sonda C</b>	<b>[SSC]</b>	<b>Alvo sintético ssDNA</b>	<b><math>\Delta\lambda_{\text{máx}}</math> / nm</b>
<b>3 horas a 37 °C</b>	5X	C	17.5 ± 2.9
		NC	-1.2 ± 1.7
	2X	C	34.7 ± 2.6
		NC	1.0 ± 0.5
<b>3 horas a 25 °C</b>	5X	C	33.5 ± 2.9
		NC	-1.2 ± 1.7
	2X	C	34.7 ± 2.6
		NC	1.0 ± 0.5

\* N.D. – não definida