



Marina Rosa Clemente Bento

Licenciada em Química Aplicada

Nanopartículas plasmónicas para biodeteção por Raman

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares,
Professor Auxiliar com agregação, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

Co-orientador: Professor Doutor Hugo Manuel Brito Águas
Professor Associado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Prof. Doutor César António Tonicha Laia

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares



Outubro, 2019

Marina Rosa Clemente Bento

Licenciada em Química Aplicada

Nanopartículas plasmónicas para biodeteção por Raman

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares,
Professor Auxiliar com agregação, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

Co-orientador: Professor Doutor Hugo Manuel Brito Águas
Professor Associado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Prof. Doutor César António Tonicha Laia

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares



Outubro, 2019

Nanopartículas plasmónicas para biodeteção por Raman

Copyright © Marina Rosa Clemente Bento, 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.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Professor Ricardo Franco e ao Professor Hugo Águas pela oportunidade de trabalhar sob a sua orientação durante este último ano. Agradeço a disponibilidade, a partilha de conhecimento científico, os conselhos e orientação que possibilitaram o desenvolvimento desta dissertação.

À Professora Eulália Pereira e ao Mestre Miguel Almeida da Universidade do Porto pelos conselhos para melhorar o procedimento de modificação de superfície de nanopartículas e nanoestrelas de ouro.

À Doutora Daniela Peixoto e à Professora Ana Lourenço pela disponibilidade e ajuda no processo de modificação de superfície ao executar o processo de destilação do tolueno.

À Maria João, por todo o apoio e ajuda na realização deste trabalho. Obrigada pelos conselhos, motivação e paciência.

Ao Kamil, que começou o trabalho comigo e que me “passou a pasta” do trabalho desenvolvido por ele, sempre esteve disponível para me esclarecer as dúvidas que iam aparecendo. Mesmo que a muitos quilómetros de distância.

À Mafalda, pela ajuda, conselhos e conversa de descontração que todos os trabalhos de investigação precisam de vez em quando.

Ao David, o meu parceiro de laboratório que tantas risadas me proporcionou ao longo desta etapa. Obrigada pela partilha de ideias e experiências e pelas idas ao Fórum Almada almoçar para descontrair do stress da semana de trabalho. Sem ti não tinha sido a mesma coisa!

Aos meus colegas de mestrado, que sempre me apoiaram e proporcionaram momentos de descontração bem como de partilha de ideias de como ultrapassar obstáculos no trabalho experimental. Um obrigada especial à Rita, à Lígia, à Margarida e ao Bruno.

À Dani, Inês, Vanessa e Martinha, obrigada por todos os momentos partilhados ao longo destes anos desde a licenciatura até ao mestrado. Obrigada pelo apoio, compreensão e paciência. Estes anos na FCT com vocês foram muito importantes e nunca serão esquecidos!

À Ana Sofia, minha madrinha e à Alice, minha pseudo-madrinha, por todo o apoio e por toda a amizade. Obrigada por estarem sempre aqui comigo, em todas as batalhas a apoiar-me, mesmo que por vezes longe.

À Gabi, pelos momentos de descontração no Starbucks ao fim de semana e pelos passeios no shopping. Temos de continuar!

À Ritinha, Lila, Neide e Hugo. Amigos de uma vida que são mais do que amigos, são família. Obrigada por toda a força, motivação e compreensão. Principalmente por estarem sempre lá, a uma mensagem ou chamada de distância. Palavras não chegam e nunca serão suficientes para vos agradecer!

A toda a minha família, pela compreensão e apoio nesta fase tão importante da minha vida.

Por último, mas nunca menos importante, aos meus pais. Palavras não chegam para agradecer o apoio, confiança, paciência e motivação em todas as fases da minha vida, principalmente durante este desafio que foi a tese de mestrado. Obrigada, do fundo do coração.

RESUMO

Os biomarcadores são uma característica biológica quantificável experimentalmente que permite a avaliação de estados de doença. Os métodos atualmente disponíveis são morosos ou pouco sensíveis, pelo que a bionanotecnologia tem espaço para crescer no desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico e deteção.

O trabalho desenvolvido e apresentado nesta dissertação teve como objetivo principal o desenvolvimento de bionanoconjugados entre nanopartículas de ouro e anticorpo com vista à criação de um ensaio de imunodeteção por espectroscopia de Raman aumentada pela superfície (SERS) tipo *sandwich*. O ensaio de imunodeteção tipo *sandwich* é composto por anticorpos imobilizados numa superfície de, por exemplo, vidro e por sondas de Raman compostas por anticorpos conjugados às nanopartículas com uma molécula ativa em Raman.

De forma a atingir os objetivos propostos, foram sintetizadas nanopartículas de ouro esféricas e seguidamente funcionalizadas com 4-MBA (ácido 4-mercaptobenzóico), uma conhecida molécula-repórter de Raman. Esta molécula-repórter possui, numa das extremidades, um grupo tiol (-SH) que se liga fortemente à superfície da nanopartícula e na extremidade oposta possui um grupo carboxílico (-COOH), que por sua vez permite a interação com biomoléculas. Esta é uma interação intrinsecamente fraca pelo que foi promovida uma ligação covalente entre o anticorpo e o grupo carboxílico presente no 4-MBA, com o uso de um agente de reticulação. Para tal, usaram-se agentes reticulantes e foram obtidos bionanoconjugados reprodutíveis e estáveis. O anticorpo usado foi de peroxidase de rábano (Anti-HRP), o que permitiu a determinação da atividade enzimática da peroxidase de rábano (HRP), o antígeno respetivo que se liga aos anticorpos dos bionanoconjugados, confirmando a presença dos anticorpos na superfície da nanopartícula. Os bionanoconjugados finais foram analisados por Raman tendo em conta o sinal da molécula-repórter.

Para além do desenvolvimento dos bionanoconjugados, foi iniciado o desenvolvimento da imobilização de anticorpos na superfície. Foi modificada uma superfície de vidro com APTES com o objetivo de obter uma monocamada de silano, pretendendo-se conjugar posteriormente com anticorpo através de uma molécula de glutaraldeído. É necessário continuar a desenvolver o processo de modificação de superfície, explorando diferentes alternativas para a imobilização de anticorpos à superfície de vidro para a conclusão do ensaio de imunodeteção.

O principal objetivo foi atingido, tendo sido obtidos bionanoconjugados com actividade enzimática, o que demonstra a ligação do anticorpo, e com sinal em Raman, o que demonstra que é possível serem detetados usando esta técnica espectroscópica. A obtenção destes bionanoconjugados abre a possibilidade à utilização dos mesmos em biossensores em testes rápidos de diagnóstico.

Palavras-Chave: Nanopartículas de Ouro; Raman; Espetroscopia de Raman Aumentada pela Superfície (SERS); Bionanoconjugados; Imunoensaio

ABSTRACT

Biomarkers are a measurable biological entity which allow the assessment of disease states. The methods presently available are time consuming or have low sensitivity, giving room for the development of diagnosis and detection tools in bionanotechnology.

The work developed and presented in this dissertation had the main goal of developing gold nanoparticles bionanoconjugates with antibodies in order to create a sandwich immunoassay by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). The sandwich immunoassay is composed by immobilized antibodies on a glass surface, for example, and by a Raman probe formed by antibodies conjugated to nanoparticles with a Raman reporter molecule.

In order to achieve the proposed goals, spherical gold nanoparticles were synthesized and functionalized with 4-MBA (4-mercaptobenzoic acid), a known Raman reporter molecule. This reporter molecule features at one end a thiol group (-SH) that strongly binds to the surface of the nanoparticle, and at the other end it has a carboxylic group (-COOH) allowing the interaction with biomolecules. This is an intrinsically weak interaction, so a covalent bond was promoted between the antibody and the carboxylic group in the 4-MBA through crosslinking. This was achieved with the use crosslinkers, allowing the production of reproducible and stable bionanoconjugates. The antibody used was the horseradish peroxidase antibody (Anti-HRP) which allowed the determination of enzymatic activity of the respective antigen, horseradish peroxidase (HRP), confirming the existence of antibodies in the bionanoconjugates. These bionanoconjugates with the antibody and correspondent antigen were analyzed by Raman spectroscopy, in terms of the signal from the reporter molecule.

Besides the bionanoconjugates development, the immobilization of antibodies on a surface was initiated. A glass surface was modified with APTES with the purpose of obtaining a silane monolayer, which would allow further conjugation with the antibody using a glutaraldehyde linker. Further development in the process of surface modification is needed by exploring different alternatives for the immobilization of antibodies on to the glass surface for the completion of the immunodetection assay.

The main goal was achieved given that the final bionanoconjugates have enzymatic activity, which demonstrates the binding of the antibody, and they also have Raman signal, which demonstrates that it is possible to detect them using this spectroscopy technique. Obtaining these bionanoconjugates opens up the possibility of using them in biosensors and rapid diagnosis tests.

Keywords: Gold Nanoparticles; Raman; Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS); Bionanoconjugates; Immunoassay

ÍNDICE

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Índice de figuras	xvii
Índice de tabelas	xix
Lista de abreviaturas e acrónimos	xxi
Capítulo 1 Introdução	1
1.1 Bionanotecnologia	1
1.2 Biossensores	1
1.2.1 Elementos de reconhecimento molecular	2
1.2.1.1 Anticorpos	3
1.2.2 Elementos de transdução	4
1.3 Nanopartículas: propriedades e aplicações	5
1.3.1 Síntese de nanopartículas	7
1.3.2 Funcionalização	8
1.3.3 Bionanoconjugação	9
1.4 Espectroscopia de Raman	10
1.4.1 Espectroscopia de Raman aumentada pela superfície (SERS)	11
1.4.2 Modelos de intensificação de sinal	12
1.4.2.1 Fator de intensificação eletromagnético	12
1.4.2.2 Fator de intensificação químico	13
1.4.3 Substratos para SERS	13
1.5 Imunoensaios	14
1.5.1 Modificação de superfícies	14
1.6 Objetivos da dissertação e proposta de trabalho	15
Capítulo 2 Materiais e métodos	17
2.1 Materiais e reagentes	17
2.2 Síntese química de nanoestruturas de ouro	17
2.2.1 Nanoesferas de ouro	17
2.2.2 Nanoestrelas de ouro	17
2.3 Caracterização das nanoestruturas de ouro	18
2.3.1 Caracterização das nanoesferas de ouro	18
2.3.2 Caracterização das nanoestrelas de ouro	18
2.4 Funcionalização das nanoestruturas de ouro	18
2.4.1 Funcionalização das nanoesferas de ouro: 11-MUA e 4-MBA	19

2.4.2	Funcionalização das nanoestrelas de ouro: 11-MUA e 4-MBA	19
2.5	Bionanoconjugados com nanoesferas de ouro	19
2.5.1	Conjugação dos anticorpos com as nanoesferas de ouro por interação eletroestática 19	
2.5.2	Conjugação dos anticorpos com as nanoesferas de ouro por ligação covalente.....	20
2.5.3	Bloqueamento da superfície com BSA	20
2.5.4	Conjugação com HRP	20
2.6	Ensaio enzimático com enzima peroxidase de rábano (HRP)	21
2.6.1	Enzima livre	22
2.6.2	Bionanoconjugados	22
2.7	Espetroscopia de Raman e SERS	22
2.8	Modificação de superfícies de vidro e silício	23
2.8.1	Silanização do vidro e silício	23
2.8.2	Caracterização da superfície.....	23
2.8.2.1	Ângulo de contacto de água (WCA)	23
2.8.2.2	Elipsometria	23
2.8.2.3	Microscopia de força atómica (AFM).....	23
Capítulo 3 Técnicas de caracterização.....		25
3.1	Espetroscopia de ultravioleta-visível	25
3.2	AGE – Eletroforese em gel de agarose	25
3.3	Espetroscopia de Raman	26
3.4	Caracterização de superfícies	27
3.4.1	Elipsometria.....	27
3.4.2	WCA – Ângulo de contacto da água	28
3.4.3	AFM – Microscopia de força atómica	29
Capítulo 4 Resultados e discussão		31
4.1	Síntese e caracterização das nanoesferas de ouro	31
4.2	Funcionalização das nanoesferas de ouro	32
4.3	Espetroscopia de Raman	33
4.3.1	SERS de AuNPs	35
4.4	Bionanoconjugados	36
4.4.1	Conjugação dos anticorpos com as nanoesferas de ouro por interação eletroestática 36	
4.4.2	Conjugação dos anticorpos com as nanoesferas de ouro por ligação covalente.....	39
4.5	Ensaio enzimático	44
4.5.1	Enzima livre	44
4.5.2	Bionanoconjugados	44
4.6	SERS de Bionanoconjugados	46

4.7	Caracterização das nanoestrelas de ouro	47
4.8	Funcionalização das nanoestrelas de ouro	47
4.9	SERS das nanoestrelas de ouro	48
4.10	Modificação de superfícies de vidro e silício	49
Capítulo 5 Conclusões e perspectivas futuras		55
Capítulo 6 Referências		57
Anexos		65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação esquemática de um biossensor.	1
Figura 1.2 – Representação esquemática do anticorpo e das respetivas cadeias pesadas e leves (A), regiões variável e região constante (B) e Fragmentos de ligação do antigénio (Fab) e de cristalização (Fc) (C).	4
Figura 1.3 – Classes de nanopartículas com base no material que as constitui. ^{4,35}	5
Figura 1.4 – Representação esquemática de LSPR	6
Figura 1.5 – Diagrama de LaMer com as fases que explicam a teoria de nucleação das nanopartículas.	8
Figura 1.6 – Estruturas químicas do ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) (A) e do ácido 4-marcaptobenzóico (4-MBA) (B)	9
Figura 1.7 - Estruturas químicas dos agentes de reticulação 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (A) e N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) (B).	10
Figura 1.8 – Dispersão de Rayleigh, Anti-Stokes e Stokes.	11
Figura 1.9 – Representação do mecanismo de intensificação eletromagnético nos hot-spots.	12
Figura 1.10 – Representação do mecanismo de intensificação químico.	13
Figura 1.11 – Representação de um ensaio de imunodeteção tipo sandwich.	15
Figura 3.1– Esquema de um espetofotómetro de feixe único.	25
Figura 3.2 – Representação esquemática de uma configuração típica de um micro-Raman.	27
Figura 3.3 – Representação esquemática de um elipsómetro.	27
Figura 3.4 – Representação esquemática da polarização elíptica da luz refletida na amostra.	28
Figura 3.5 – Representação esquemática de um goniómetro para medição do ângulo de contacto.	29
Figura 3.6 – Representação do ângulo de contacto de uma gota de líquido numa superfície sólida.	29
Figura 3.7 – Representação esquemática da configuração básica de um aparelho de AFM.	30
Figura 4.1 – Espetro de absorção das nanoesferas de ouro sintetizadas pelo método de Turkevich.	31
Figura 4.2 – Géis de agarose das nanoesferas de ouro funcionalizadas com diferentes misturas de agente de revestimento.	33
Figura 4.3 – Espetro de Raman da molécula de 4-MBA no estado sólido.	34
Figura 4.4 – Espetro de SERS das nanopartículas de ouro funcionalizadas com diferentes misturas de 11-MUA e 4-MBA.	35
Figura 4.5 – Espetro de absorção de verificação de funcionalização das nanopartículas.	36
Figura 4.6 – Espetro de absorção das nanopartículas antes e depois da funcionalização e conjugação com Anti-HRP.	37
Figura 4.7 – Gel de agarose resultante da eletroforese dos bionanoconjugados preparados por interação electroestática das AuNPs@4-MBA com Anti-HRP.	37
Figura 4.8 – Gráfico da mobilidade eletroforética normalizada para o valor de migração das AuNPs@4-MBA em função do rácio de Anti-HRP para AuNP.	38

Figura 4.9 – Amostras de AuNPs após a adição de EDC, Sulfo-NHS e anti-HRP segundo a Tabela 4.2 (A) e os espectros de absorção das respectivas amostras. É.	40
Figura 4.10 – Eletroforese em gel de agarose das amostras de bionanoconjugados preparados por ligação covalente do anticorpo com recurso ao uso dos agentes reticulantes EDC e Sulfo-NHS. 41	41
Figura 4.11 – Eletroforese em gel de agarose dos bionanoconjugados preparados por interação electrostática e dos bionanoconjugados preparados por ligação covalente..	42
Figura 4.12 – Distância percorrida pelos bionanoconjugados preparados por interação electrostática (colunas a preto) e pelos bionanoconjugados preparados com ligação covalente (colunas a laranja).	42
Figura 4.13 – Eletroforese em gel de agarose dos bionanoconjugados preparados por ligação covalente.....	43
Figura 4.14 – Gráfico da mobilidade eletroforética normalizada para o valor de migração dos bionanoconjugados preparados por ligação covalente.....	43
Figura 4.15 – Representação gráfica dos resultados do ensaio branco (A) e do ensaio teste (B) do ensaio enzimático com enzima livre. O.	44
Figura 4.16 – Representação gráfica dos resultados do ensaio branco (A) e do ensaio teste (B) do ensaio enzimático com HRP conjugada com os bionanoconjugados.	45
Figura 4.17 – Espectro de SERS dos bionanoconjugados com e sem a enzima HRP e de AuNPs funcionalizadas com 4-MBA.....	46
Figura 4.18 – Espectro de absorção das nanoestrelas de ouro após síntese ($\lambda_{LSPR}=687nm$).	47
Figura 4.19 – Espectro de absorção das nanoestrelas de ouro após síntese (linha a preto, $\lambda_{LSPR}=687nm$) e após funcionalização com 4-MBA (linha a vermelho, $\lambda_{LSPR}=699nm$).....	48
Figura 4.20 – Espectros de SERS das soluções de AuNSs funcionalizadas com diferentes percentagens de 11-MUA e 4-MBA.....	49
Figura 4.21 – Ângulo de contacto da água das amostras de silício após o processo de silanização com diferentes percentagens de APTES.....	50
Figura 4.22 – Espessura da camada de silano das amostras de silício após silanização com diferentes percentagens de APTES.	50
Figura 4.23 – Ângulo de contacto da água das amostras de silício após o processo de silanização com diferentes percentagens de APTES.....	51
Figura 4.24 – Espessura da camada de silano das amostras de silício após silanização com diferentes percentagens de APTES.	51
Figura 4.25 – Ângulo de contacto da água das amostras de vidro após o processo de silanização com diferentes percentagens de APTES.....	52
Figura 4.26 – Espessura da camada de silano das amostras de vidro após silanização com diferentes percentagens de APTES.....	52
Figura 4.27 – Ângulo de contacto da água das amostras de vidro após o processo de silanização com diferentes percentagens de APTES.....	53
Figura 4.28 – Espessura da camada de silano das amostras de vidro após silanização com diferentes percentagens de APTES.....	53
Figura 4.29 – Imagens de AFM das amostras do ensaio efetuado com tolueno seco no departamento de química.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Características específicas de um biossensor. ^{16,22}	2
Tabela 1.2 – Vantagens e desvantagens de SERS. ⁶⁸	12
Tabela 2.1 – Soluções necessárias para o ensaio enzimático da peroxidase.	21
Tabela 2.2 – Percentagem e potência de laser, tempo de exposição da amostra ao laser e número de acumulações usada na obtenção dos espectros de Raman ou SERS de cada amostra.....	22
Tabela 4.1 – Atribuições das bandas vibracionais. ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹	34
Tabela 4.2 – Concentração de EDC e Sulfo-NHS e rácio de anticorpo para nanopartícula usados em cada amostra.	39
Tabela 4.3 – Concentração de EDC e Sulfo-NHS e rácio de anticorpo para nanopartícula usados em cada amostra.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ϵ	Coefficiente de extinção molar
μ	Mobilidade eletroforética
11-MUA	Ácido 11-mercaptoundecanóico
4-MBA	Ácido 4-mercaptobenzóico
A	Absorvância
Ab	Anticorpo
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês, <i>Atomic Force Microscopy</i>)
AGE	Eletroforese em gel de agarose (do inglês, <i>Agarose Gel Electrophoresis</i>)
Anti-HRP	Anticorpo policlonal de peroxidase de rábano
APTES	3-aminopropiltriétoxisilano
APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
AuNP(s)	Nanopartícula(s) de ouro
AuNS(s)	Nanoestrela(s) de ouro
b	Percurso ótico
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
c	Concentração
d	Distância entre os elétrodos
dm	Distância de migração
E	Campo
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
HRP	Peroxidase de rábano (do inglês, <i>Horseradish Peroxidase</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>Limit Of Detection</i>)
LSPR	Ressonância plasmônica de superfície localizada (do inglês <i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>)
MPTMS	3-mercaptopropiltrimetoxisilano
NP(s)	Nanopartícula(s)
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
RR	Ressonância de Raman
SERS	Espectroscopia de Raman aumentada pela superfície (do inglês, <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>)
SPR	Ressonância plasmônica de superfície (do inglês, <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v	Velocidade
WCA	Ângulo de contacto da água (do inglês, <i>Water Contact Angle</i>)

Capítulo 1 | INTRODUÇÃO

1.1 Bionanotecnologia

A nanotecnologia surgiu como uma área de investigação importante com o aproveitamento das propriedades atómicas e moleculares dos materiais à nanoescala.¹ Os materiais à nanoescala possuem propriedades diferentes dos materiais à macroescala (ou *bulk*). Os materiais à macroescala possuem propriedades físicas constantes e independentes do seu tamanho, enquanto que à nanoescala o seu tamanho determina as suas propriedades físicas e aplicações.^{2,3} Estas diferenças no comportamento dos materiais à nano e macroescala deve-se à maior razão área de superfície/volume e maior reatividade e estabilidade em processos químicos das nanopartículas.⁴

A bionanotecnologia é definida pela revista *Nature* como uma área disciplinar na qual as ferramentas da nanotecnologia são desenvolvidas e aplicadas ao estudo dos processos biológicos.⁵ Desta forma, o diagnóstico molecular pode tornar-se mais sensível e específico.⁶ Com a tecnologia disponível atualmente, é possível criar nanobiomateriais com propriedades óticas, elétricas e magnéticas muito interessantes e que dependem da sua composição forma e tamanho.⁷⁻¹¹

As principais aplicações da nanotecnologia na medicina são a fabricação de dispositivos para a biodeteção (sensores que auxiliam o diagnóstico de estados de doença) e a terapêutica.¹² O uso destes nanomateriais para a biodeteção é um campo em constante evolução, com vista ao desenvolvimento de bionanosensores com a capacidade de detetar biomoléculas relevantes para o diagnóstico molecular.^{11,13-15} Os ensaios baseados em nanomateriais têm apresentado vantagens significativas em relação aos sistemas de diagnóstico convencionais no que diz respeito à sensibilidade, seletividade e viabilidade.¹¹ Estes bionanosensores permitem um maior rácio sinal/ruído e a utilização de um menor volume de amostra, reduzindo o custo do biossensor, e também o aumento do rácio superfície/volume da área ativa para deteção, o que reduz a ligação não específica e aumenta a eficácia do biossensor.¹⁶ A capacidade de manipular as propriedades físicas, químicas e biológicas dos nanomateriais possibilita o desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico, agentes de contraste, ferramentas analíticas, terapias e veículos de entrega de fármacos.^{1,6,7}

1.2 Biossensores

Um biossensor é definido como um dispositivo analítico formado por um elemento de reconhecimento molecular (ou biorreceptor), um transdutor e um sistema de processamento de sinal. A interação entre o biorreceptor e o analito produz um sinal bioquímico reconhecido pelo transdutor que o converte num sinal elétrico que é posteriormente detetado pelo sistema de processamento de sinal que o transforma num sinal que possa ser interpretado pelo utilizador.¹⁷⁻²¹ Um esquema de um biossensor está representado na **Figura 1.1**.

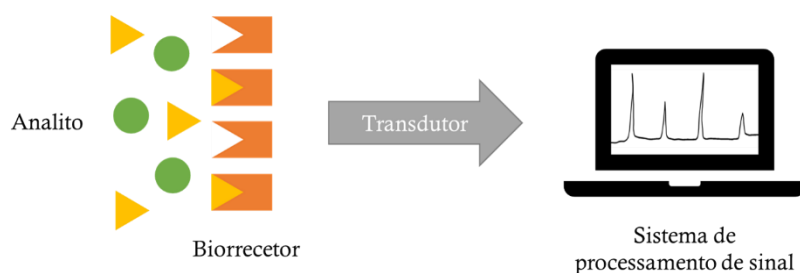


Figura 1.1 – Representação esquemática de um biossensor. O analito de interesse liga-se ao biorreceptor do biossensor que dá origem a um sinal bioquímico sendo posteriormente convertido num sinal elétrico pelo transdutor que é processado no sistema de processamento de sinal de forma a ser interpretado pelo utilizador.

Os biossensores podem ser aplicados em monitorização de doenças (como por exemplo, monitorização dos níveis de glucose de pessoas diabéticas) e para a deteção de poluentes, microorganismos causadores de doença e biomarcadores indicadores de doença em fluidos biológicos (sangue, urina, saliva e suor).^{16,22} Estes possuem características específicas, sendo elas a sensibilidade, reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade e linearidade. Estas estão descritas na **Tabela 1.1**.¹⁶

Tabela 1.1 – Características específicas de um biossensor.^{16,22}

Seletividade	<ul style="list-style-type: none"> – Habilidade de um biorreceptor para detetar um analito específico numa amostra complexa; – Característica mais importante num biossensor;
Reprodutibilidade	<ul style="list-style-type: none"> – Capacidade do biossensor para gerar respostas idênticas nas mesmas condições experimentais; – Caracterizada pela precisão^a e exatidão^b; – Confere confiança e robustez aos resultados obtidos;
Estabilidade	<ul style="list-style-type: none"> – Grau de suscetibilidade e distúrbios do meio em que se encontra o biossensor; – Distúrbios podem causar erros de medição, afetando a reprodutibilidade do biossensor; – De elevada importância quando o biossensor requer múltiplos passos de incubação ou monitorização contínua; – Fatores como pH, temperatura, degradação do biorreceptor ao longo do tempo e afinidade do biorreceptor para o analito;
Sensibilidade	<ul style="list-style-type: none"> – Quantidade mínima de analito que pode ser detetado por um biossensor; – O mesmo que limite de deteção (do inglês, <i>Limit Of Detection</i>); – Em determinadas aplicações, um biossensor requer a deteção de concentrações de analito na ordem de ng/mL ou fg/mL (10^{-9}g/mL ou 10^{-15}g/mL, respetivamente);
Linearidade	<ul style="list-style-type: none"> – Fator que demonstra a exatidão da resposta medida num conjunto de amostras com diferentes concentrações de analito; – Representada pela equação matemática $y = mc$, onde y corresponde ao sinal produzido, c corresponde à concentração de analito e m corresponde à sensibilidade do biossensor; – Relacionado com a resolução do biossensor e o intervalo de quantidade de analito que é testado.

1.2.1 Elementos de reconhecimento molecular

Os elementos de reconhecimento molecular, também designados por biorreceptores, são responsáveis pelo reconhecimento e interação com o analito de interesse para produzir um sinal biológico. Estes podem ser divididos em quatro categorias: enzimas, ácidos nucleicos, células e anticorpos.^{17,21,23}

As enzimas são específicas para uma determinada molécula e quando usadas num biossensor catalisam uma reação que envolve a molécula de interesse caso esta se encontre na amostra a ser analisada. O produto desta reação é o analito que é detetado pelo transdutor. No

^a Precisão – capacidade do sensor para obter resultados semelhantes em todas as medições feitas.

^b Exatidão – capacidade do sensor para obter resultados próximos da média quando a amostra é medida mais do que uma vez.

caso dos ácidos nucleicos, é usada a complementariedade de bases das cadeias nucleotídicas para a elevada sensibilidade e seletividade do biossensor. Com isto, é possível detetar sequências específicas de DNA tendo por base a sequência complementar da cadeia de ácidos nucleicos por emparelhamento dos pares de bases (A-T e C-G) entre a cadeia de interesse e a cadeia complementar do biossensor. Com as células ou microorganismos em biossensores, é obtido o sinal da presença do analito a detetar na amostra através da monitorização da digestão ou respiração celular. No caso de serem usados anticorpos no biossensor, estamos perante uma classe de biossensores chamada imunossensores. Estes aproveitam a especificidade de ligação do anticorpo ao seu antígeno específico para o desenvolvimento de um sistema de deteção de analito de forma sensível e altamente específica, uma vez que apenas é obtido sinal se o antígeno específico estiver presente na amostra.^{17,22}

1.2.1.1 *Anticorpos*

Os anticorpos como elementos recetores no reconhecimento molecular permitem o desenvolvimento de diferentes sistemas analíticos, incluindo biossensores.²⁴ O anticorpo é uma glicoproteína que interage especificamente com um antígeno. O antígeno, por sua vez, é uma molécula (proteínas, polissacáridos) ou célula que é reconhecida especificamente pelo anticorpo. Apenas pequenos domínios moleculares do antígeno são reconhecidos pelo anticorpo e estes domínios são denominados de determinantes antígenos ou epítomos. Os epítomos não são uma propriedade intrínseca do antígeno, fazendo referência apenas ao local de ligação do antígeno ao anticorpo.^{25,26}

Os anticorpos possuem uma estrutura geral baseada em cadeias polipeptídicas pesadas e leves emparelhadas que lhes permitem a integração na classe química mais comum das imunoglobulinas (Ig).^{24,25,27} Estruturalmente, os anticorpos são compostos por uma ou mais cópias da unidade característica em forma de Y. Esta unidade característica possui 2 cadeias polipeptídicas pesadas idênticas e 2 cadeias polipeptídicas leves idênticas (representadas a verde escuro e laranja escuro, respetivamente, na **Figura 1.2A**).²⁸ As cadeias pesadas estão ligadas entre si por pontes de dissulfureto e cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada com o mesmo tipo de ligação. Uma vez que as cadeias pesadas são idênticas entre si, tal como as cadeias leves, o anticorpo possui 2 locais de ligação de antígeno, o que lhes confere a capacidade de ligar simultaneamente duas estruturas idênticas de antígeno.²⁷

Cada cadeia, leve e pesada, consiste numa série de sequências similares, mas não idênticas, de cerca de 110 aminoácidos, constituindo domínios. A cadeia leve é composta por dois domínios, enquanto que o número de domínios presentes na cadeia pesada varia consoante a classe de Ig. Os 110 aminoácidos da região N-terminal de ambas as cadeias leves e pesadas correspondem ao primeiro domínio. Este domínio varia entre os diferentes anticorpos conforme o antígeno a que se liga especificamente, sendo designado como domínios variáveis (V). Os restantes domínios permanecem constantes e correspondem aos domínios constantes (C). Os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas (V_L e V_H , respetivamente) juntos formam a região variável do anticorpo e confere a este a capacidade de ligar especificamente o antígeno. Os domínios constantes das cadeias leves e pesadas (C_L e C_H , respetivamente) formam a região constante do anticorpo e são numeradas da extremidade N-terminal até à extremidade C-terminal. Na **Figura 1.2B** estão representadas as regiões variável (verde claro) e constantes (laranja claro) do anticorpo. Cada domínio da região variável está identificado com V_H no caso dos domínios variáveis das cadeias pesadas e V_L no caso dos domínios variáveis das cadeias leves. As cadeias leves apenas possuem um domínio constante, C_L , mas as cadeias pesadas possuem pelo menos 3 domínios constantes e são, por isso, numerados de 1 a 3 (C_{H1} , C_{H2} , e C_{H3}).^{27,28}

Quando o anticorpo sofre digestão, é dividido em 3 fragmentos. Dois destes fragmentos são idênticos e contêm atividade de ligação do antígeno, sendo designados como fragmentos Fab (do inglês, *Fragment antigen binding*) e correspondem à totalidade das cadeias leves e os domínios V_H e C_{H1} das cadeias pesadas. O terceiro fragmento não possui qualquer atividade de ligação ao antígeno, mas foi observado que cristaliza facilmente, sendo conhecido como fragmento Fc (do inglês, *Fragment crystallizable*). Este fragmento corresponde aos domínios C_{H2} e C_{H3} das cadeias

pesadas e é responsável pela atividade biológica do anticorpo.^{27,29} Na **Figura 1.2C** encontra-se representado o fragmento Fab (vermelho escuro) e o fragmento Fc (azul escuro).

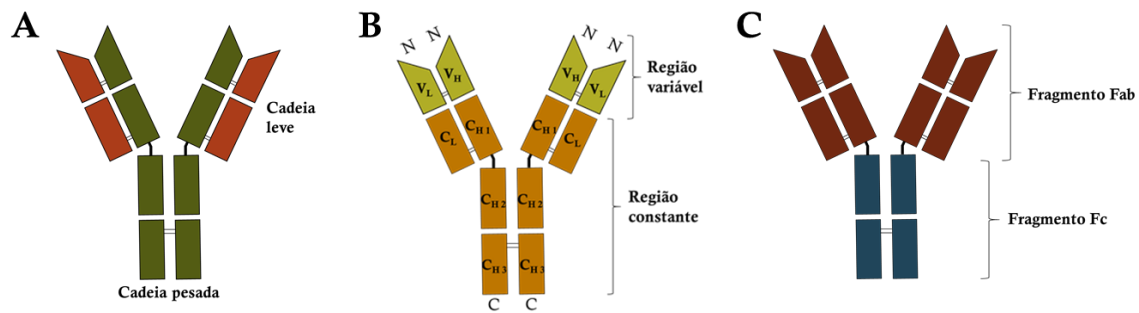


Figura 1.2 – Representação esquemática do anticorpo e das respectivas cadeias pesadas e leves (A), regiões variável e região constante (B) e Fragmentos de ligação do antígeno (Fab) e de cristalização (Fc) (C).

Existem 5 tipos de cadeias pesadas que diferem entre si nas regiões constantes e são identificadas pelas letras gregas μ , γ , δ , ϵ e α . Os anticorpos são classificados de acordo com a cadeia pesada que os constitui o que significa que existem 5 classes, ou isótipos, de anticorpos sendo eles IgM, IgG, IgD, IgE e IgA, respetivamente. Apesar de existirem 5 tipos de cadeias pesadas, apenas existem 2 tipos de cadeias leves, κ e λ , não tendo sido observada até ao presente qualquer diferença funcional entre as diferentes cadeias leves. Os anticorpos possuem ambas as cadeias leves κ ou λ , mas não uma de cada.²⁷⁻²⁹ As diferenças entre as cadeias pesadas das imunoglobulinas faz com que os vários isótipos variem em vários aspetos como por exemplo o número e localização das pontes de dissulfureto e número de domínios contantes.²⁷

Os anticorpos IgG são os que existem em maior abundância no organismo humano, o que os torna os mais utilizados na produção de imunossensores. Na incubação para a formação do complexo imunológico, os antígenos e anticorpos (e outras moléculas que se encontrem em solução na amostra) colidem entre si e, quando um antígeno se aproxima do local de ligação do anticorpo correspondente, as interações atrativas responsáveis pela ligação destes dois elementos atuam e forma-se o complexo anticorpo-antígeno. O tempo de incubação não é igual para todos os anticorpos e antígenos.³⁰

As forças atrativas e repulsivas responsáveis pelas interações não covalentes entre proteínas são as mesmas que caracterizam as interações entre os anticorpos e antígenos. A principal força repulsiva nesta interação específica é o fator estérico, ou seja, a falta de complementaridade entre o antígeno e o local de ligação dos anticorpos. É esta a força que caracteriza a especificidade da interação uma vez que apenas permite que o antígeno específico seja reconhecido e lhe seja permitida a ligação ao local de ligação do anticorpo.³¹

As interações que promovem a ligação entre os dois elementos encontramos as electrostáticas, as hidrofóbicas, as de dispersão e as pontes de hidrogénio. As forças de dispersão atuam apenas a distâncias curtas e ocorrem entre os resíduos não polares do anticorpo e antígeno. As interações hidrofóbicas são consideradas como a força impulsionadora da reação entre o anticorpo e o antígeno correspondente. Esta baseia-se na repulsão da água dos locais de ligação do anticorpo por grupos não polares de forma a permitir a ligação do antígeno. Quando as moléculas de água são retiradas do local de ligação, a constante dielétrica local diminui, o que aumenta a eficácia das interações iónicas ou electrostáticas necessárias para a ligação do antígeno.³¹

1.2.2 Elementos de transdução

Os elementos de transdução, ou transdutores, são responsáveis por converter o sinal biológico produzido pelos elementos de reconhecimento molecular num sinal elétrico quantificável. Os biossensores podem ser classificados de acordo com os sinais que produzem, sendo eles eletroquímicos, térmicos, piezoelétricos ou óticos.²³

Os biossensores eletroquímicos baseiam-se na medição de alterações iônicas, de corrente ou de condutância através do uso de bioelétrodos. Podem ser classificados de acordo com o parâmetro que é analisado como amperimétricos (mede a corrente resultante da oxidação ou redução de um composto a um potencial constante), potenciométricos (mede o potencial da amostra em relação a um eletrodo de referência) ou condutimétricos (deteta alterações de condutividade). O uso de sinais eletroquímicos permite a obtenção de elevada especificidade e sensibilidade (baixos limites de detecção), pelo que são dos mais utilizados no desenvolvimento de novos biossensores.^{21,23,32,33}

Os biossensores térmicos baseiam-se em reações associadas com a produção ou absorção de calor que alteram a temperatura do meio reacional. Estas reações são detetadas por materiais termocondutores que alteram o seu comportamento consoante a temperatura do meio aumenta ou diminui.^{23,33}

Os biossensores piezoelétricos envolvem a medição de alterações de massa, baseando-se nos princípios de acústica. Estes biossensores possuem cristais piezoelétricos que vibram a uma dada frequência e, quando se dá a adsorção de moléculas específicas nestes cristais, a frequência de ressonância é alterada e detetada.^{23,33}

Os transdutores óticos podem ser utilizados com todos os tipos de espectroscopia, oferecendo várias opções para detetar uma resposta biológica. Baseiam-se nas técnicas óticas de absorção, fluorescência, luminescência, ressonância plasmónica de superfície (SPR) ou dispersão que são detetadas por fotodetetores. Entre estes, também se encontram os sensores colorimétricos que apresentam a vantagem de serem detetadas as respostas biológicas por observação da alteração da cor da solução.^{23,33,34}

1.3 Nanopartículas: propriedades e aplicações

Uma nanopartícula (NP) é definida como uma partícula com tamanho compreendido entre 1 e 100nm de diâmetro.^{4,35} O material que a constitui desempenha um papel fundamental na sua aplicação, fornecendo propriedades únicas enquanto a sua superfície e respetiva modificação determina a estabilidade e interação com o ambiente químico em que se encontra.^{35,36} Na **Figura 1.3** encontra-se um esquema com a principal classificação das nanopartículas com base no material que as constitui.^{4,35}

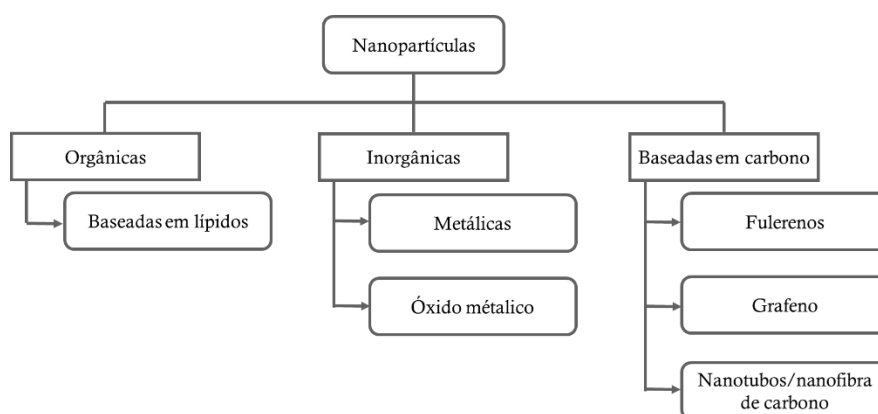


Figura 1.3 – Classes de nanopartículas com base no material que as constitui.^{4,35}

As propriedades químicas das nanopartículas estão relacionadas com o seu comportamento com os alvos pretendidos (biomoléculas, por exemplo), toxicidade e a sua estabilidade no meio em que se encontram, enquanto que as suas propriedades físicas estão associadas ao material que as constituem.⁴ Tanto as propriedades químicas como as propriedades físicas são determinadas pelo seu tamanho, forma, composição e estrutura cristalina.³⁷ As nanopartículas inorgânicas metálicas de ouro serão exploradas em detalhe.

As nanopartículas metálicas possuem ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*), uma propriedade ótica muito importante.^{4,14} A SPR é um fenômeno que ocorre quando a frequência de onda eletromagnética incidente coincide com a oscilação dos elétrons presentes na superfície do metal.^{38,39} No caso das nanopartículas metálicas com tamanho inferior ao comprimento de onda do fóton, este fenômeno é designado por ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*) uma vez que as oscilações plasmônicas resultantes levam ao confinamento espacial dos campos eletromagnéticos (**Figura 1.4**).^{38,40-43} A LSPR é dependente das características dielétricas do meio devido à capacidade da superfície para acomodar a densidade de carga das nanopartículas.^{41,44} O material que reveste a nanopartícula é o que tem maior influência no desvio da ressonância do plasmão o que leva a que moléculas quimicamente ligadas à nanopartícula possam ser detetadas pela alteração que induzem na densidade eletrônica da superfície, resultante num desvio de banda de LSPR.⁴¹

As nanopartículas metálicas mais usadas são as nanopartículas de prata (AgNPs) e as nanopartículas de ouro (AuNPs). Destas duas, apenas as de ouro serão estudadas nesta dissertação, uma vez que possuem elevada estabilidade química e física, biocompatibilidade, facilidade de funcionalização de superfície com moléculas orgânicas ou biológicas e múltiplas propriedades óticas relacionadas com plasmônica de superfície.⁴²

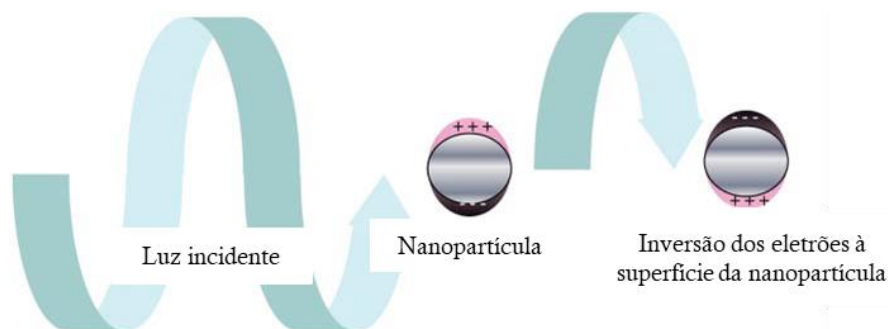


Figura 1.4 – Representação esquemática de LSPR. A luz, em ressonância com a oscilação do plasmão de superfície da nanopartícula, faz com que os elétrons livres do metal oscilem. À medida que a luz atravessa a partícula, a densidade eletrônica desta é polarizada para uma superfície e oscila em ressonância com a frequência da luz. Adaptado de ⁴³

As nanopartículas de ouro são um dos nanomateriais mais importantes no campo da biomedicina, apresentando propriedades morfológicas, óticas e de química de superfície controladas.^{10,45} As propriedades e aplicações das AuNPs dependem da sua forma, tamanho e revestimento de superfície que por sua vez é influenciada pelo método de síntese usado.¹⁰ Estas atingem a extinção ótica máxima à frequência de LSPR que ocorre a comprimentos de onda da região visível. Desta forma, o espectro de absorção de uma solução coloidal de AuNPs esféricas com cerca de 15nm de diâmetro apresenta esta banda de absorção máxima de LSPR a cerca de 520nm de comprimento de onda.^{13,42,46} Alterando a morfologia das nanopartículas, esta tem um grande efeito sobre as suas propriedades fotofísicas, o que leva à alteração do comprimento de onda de LSPR e conseqüente alteração da cor da solução.³⁸ Tal ocorre quando as AuNPs agregam, por exemplo. Neste caso, ocorre um acoplamento de plasmão entre as nanopartículas, provocando um desvio batocrômico da banda de absorção (deslocamento da banda para comprimentos de onda maiores, também referido como *red-shift*) para cerca de 620nm e respetivo alargamento.^{13,38,45} Assim, quando as nanopartículas que se encontram em solução sofrem agregação, ocorre uma alteração de cor pronunciada, passando de vermelho para azul.³⁸ A agregação das AuNPs pode ser provocada pela ausência da molécula de revestimento da nanopartícula, concentração iónica elevada (conduz à aproximação das nanopartículas por forças atrativas – forças de *Van der Waals* e pontes de hidrogénio), ponto isoelétrico das moléculas que revestem as nanopartículas e o pH da solução.³⁶

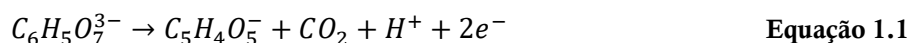
1.3.1 Síntese de nanopartículas

As nanopartículas podem ser obtidas por métodos físicos ou por métodos químicos. Os métodos físicos são designados de métodos *top-down* uma vez que o material em *bulk* é subdividido em unidades mais pequenas. No caso dos métodos químicos (ou *bottom-up*), ocorre uma reação química que fornece átomos de metal aos quais ocorre coalescência dos mesmos em nanopartículas. Para a obtenção de nanopartículas pequenas e uniformes, os métodos *bottom-up* são os mais adequados.³⁷

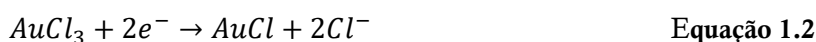
As nanopartículas metálicas podem ser preparadas em soluções aquosas ou não aquosas. Para aplicações biológicas, as nanopartículas preparadas em soluções aquosas são as mais utilizadas uma vez que não é necessário alterar a fase em que se encontram para serem utilizadas na sua aplicação final.^{36,37} As nanopartículas são obtidas por redução de um precursor metálico com um agente redutor (por exemplo, borohidreto de sódio, ácido ascórbico ou citrato de sódio) na presença de um agente estabilizador. Em alguns casos, o agente redutor tem também a função de agente estabilizador como é o caso do citrato de sódio. Os agentes estabilizadores funcionam como agentes de revestimento da nanopartícula e permitem o controlo termodinâmico das nanopartículas. Os agentes de revestimento adsorvem à superfície da nanopartícula, criando uma entidade NP-agente de revestimento com uma configuração termodinâmica muito estável.³⁷

A estratégia de síntese mais utilizada para a obtenção de nanopartículas de ouro é a precipitação de nanopartículas feita na presença de estabilizadores que adsorvem às nanopartículas e evitam a sua agregação. São exemplos deste tipo de síntese o método de redução por citrato descrito por Turkevich *et al*^{47,48}, o método de citrato e ácido tânico descrito por Mühlpfordt⁴⁹ e o método Brust-Schiffrin descrito por Brust *et al*⁵⁰. Os dois primeiros métodos de síntese referidos produzem nanopartículas estáveis contra a agregação, mas que podem ser usadas como *seeds* para a formação de nanopartículas maiores (síntese conhecida como *seed mediated growth*, crescimento mediado por sementes) enquanto que o terceiro método produz nanopartículas revestidas a partir das quais não podem ser criadas nanopartículas maiores. Isto deve-se à utilização de um reagente tiolado (no caso desta síntese, dodecanotiol) como um agente redutor adicional para além do borohidreto de sódio.⁵¹

A síntese baseada no método de redução por citrato foi descrita por Turkevich e colaboradores em 1951⁴⁷ e é a mais utilizada por produzir nanopartículas de ouro estáveis.^{47,48,51,52} De forma sucinta, uma solução aquosa de ácido tetracloroáurico é colocado em ebulição sob agitação e refluxo ao qual é adicionado um pequeno volume de citrato de sódio. Quando é adicionado o citrato, é observada a alteração da cor da solução para um azul escuro que, ao fim de alguns segundos, passa a vermelho indicando a formação das nanopartículas.^{47,48,51} O processo de síntese é composto por vários passos que ocorrem em simultâneo. O primeiro passo é a oxidação do citrato ($C_6H_5O_7^{3-}$) que pode ser induzida pela presença do ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) ou então por decomposição térmica.^{51,52} A oxidação do citrato leva à formação de dicarboxiacetona com libertação de CO_2 , como se verifica pela **Equação 1.1**.⁵¹



O segundo passo é a redução do ouro de Au^{3+} a Au^+ , como se encontra representado na **Equação 1.2**.⁵¹



O passo final que conduz à formação dos átomos de ouro (Au^0) é a dismutação, onde o átomo de ouro é reduzido (Au^+ a Au^0) e oxidado (Au^+ a Au^{3+}) e encontra-se representado pela **Equação 1.3**.⁵¹



Para que ocorra a dismutação, é necessário que se combinem 3 moléculas de $AuCl$. Isto ocorre com a ajuda das moléculas de dicarboxiacetona que ajuda a formar um complexo em que são necessárias 2 moléculas de dicarboxiacetona para prender 3 moléculas de $AuCl$. Este complexo

entre as moléculas de dicarboxiacetona e os íons de ouro desempenham um papel de enorme importância na nucleação para a formação das nanopartículas.⁵¹

A nucleação é um processo termodinâmico que descreve a formação dos núcleos das nanopartículas. Esta pode ser explicada pelo mecanismo de LaMer que divide a formação das nanopartículas em 3 fases que se encontram representadas no diagrama de LaMer da **Figura 1.5**. Na fase I temos o aumento da quantidade de átomos de ouro em solução (Au^0) que, quando atingem a concentração mínima, sofrem auto-nucleação e começam a formar os primeiros núcleos. Quando se atinge a concentração de saturação, a quantidade de núcleos criados diminui até à concentração mínima e deixam de ser criados núcleos. É atingida a fase III onde os átomos de ouro que não foram usados para a criação de núcleos são usados para o crescimento dos núcleos existentes.^{37,53}

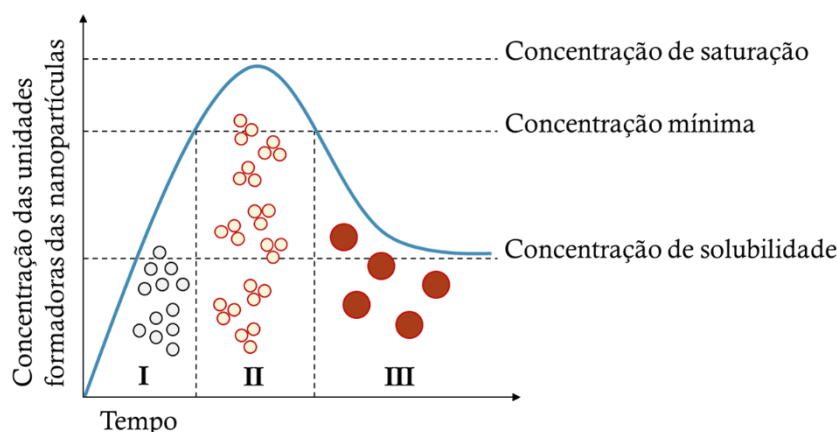


Figura 1.5 – Diagrama de LaMer com as fases que explicam a teoria de nucleação das nanopartículas.
Adaptado de^{37,53}

No final da síntese de Turkevich, são obtidas nanopartículas de ouro estabilizadas electrostaticamente por moléculas de citrato. A ligação estabelecida entre a nanopartícula de ouro e as moléculas de citrato que se encontram a estabilizá-la é uma ligação de fisissorção, uma ligação fraca. De forma a aumentar a estabilidade das nanopartículas e possibilitar a formação de bionanoconjugados robustos, é necessário funcionalizar as nanopartículas com moléculas que possuam maior afinidade para a sua superfície.^{36,51,54}

1.3.2 Funcionalização

A funcionalização de nanopartículas consiste na modificação da sua química de superfície, alterando o seu tamanho, carga e estabilidade coloidal.^{36,42,54,55} Esta modificação é feita por substituição do agente de revestimento que reveste e proporciona estabilidade coloidal à nanopartícula, por um outro que tenha maior afinidade para com a nanopartícula, formando uma ligação mais forte a esta, conferindo maior estabilidade e opções de conjugação com biomoléculas.^{42,45,54–56}

Existem dois métodos de funcionalização: a funcionalização direta e a pós funcionalização. Em ambos os métodos é usada uma molécula bi-funcional. No caso da pós funcionalização, a molécula usada tem um grupo funcional com elevada afinidade para a nanopartícula, mas na outra extremidade, o grupo funcional não tem as características necessárias para a aplicação de interesse. Assim, esta primeira molécula é usada para criar uma ligação forte e estável com a nanopartícula e, posteriormente, é efetuada uma modificação do grupo funcional livre com uma segunda molécula para que a nanopartícula possua as características desejadas. No caso da funcionalização direta, a molécula bi-funcional já contém o grupo de ligação à nanopartícula e o grupo funcional de interesse, sem ser necessária modificação e requerendo apenas um passo de funcionalização. Para as nanopartículas de ouro, o método mais usado é a funcionalização direta de moléculas bi-funcionais com um grupo tiol e um grupo carboxílico.^{13,36,54}

No trabalho descrito nesta dissertação, foram exploradas duas moléculas bi-funcionais para a funcionalização de nanopartículas de ouro: o ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA, do inglês *11-mercaptoundecanoic acid*) e o ácido 4-mercaptobenzóico (4-MBA, do inglês *4-mercaptobenzoic acid*). Ambas as moléculas possuem numa das suas extremidades um grupo tiol (-SH) que se liga fortemente à nanopartícula de ouro, criando uma ligação de quimiossorção (interação forte entre a nanopartícula e o grupo tiol do agente de revestimento).⁵⁷ Na outra extremidade destas moléculas existe um grupo carboxílico (-COOH) que confere carga negativa à nanopartícula e possibilidade de conjugação com biomoléculas.^{9,13,36} A estrutura das moléculas 11-MUA e 4-MBA está presente na **Figura 1.6** (A e B, respetivamente).

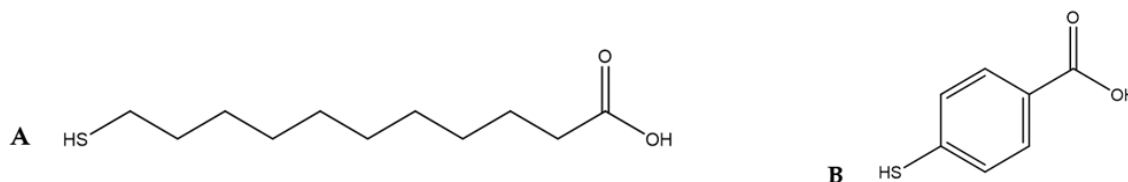


Figura 1.6 – Estruturas químicas do ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) (A) e do ácido 4-mercaptobenzóico (4-MBA) (B). Ambas as moléculas possuem na extremidade esquerda um grupo tiol (-SH) que permite a ligação de quimiossorção à nanopartícula, enquanto que na extremidade direita possuem um grupo carboxílico (-COOH) que confere carga negativa à nanopartícula e permite a interação com biomoléculas.

1.3.3 Bionanoconjugação

A conjugação de biomoléculas à superfície das nanopartículas permite o desenvolvimento de bionanoconjugados que podem ser utilizados para reconhecimento molecular ou para interagir com sistemas biológicos.³⁶

As biomoléculas podem ligar-se à nanopartícula por quimiossorção através do grupos tiol presentes em alguns aminoácidos das proteínas, por interação electrostática entre os grupos carregados positivamente presentes nas biomoléculas e as nanopartículas carregadas negativamente (como por exemplo, os grupos carboxílicos presentes no 11-MUA e 4-MBA) ou vice versa, ou por ligação covalente entre os grupos funcionais presentes nas nanopartículas e nas biomoléculas.³⁶

A estratégia de bionanoconjugação mais utilizada é a interação electrostática. As nanopartículas são incubadas com as biomoléculas, as quais se adsorvem à superfície da nanopartícula por interação entre o agente de revestimento e a biomolécula. As forças envolvidas podem ser de van der Waals, pontes de hidrogénio ou interações hidrofóbicas.^{36,58} Nos bionanoconjugados preparados através desta estratégia, normalmente necessitam de maior concentração de anticorpo presente na solução durante a sua preparação e, quando são aplicados a uma amostra biológica para deteção, as biomoléculas que se encontram adsorvidas à superfície da nanopartícula através destas interações podem ser substituídas por outras que se encontrem na amostra, comprometendo a sensibilidade do ensaio a que se destinam os bionanoconjugados. No caso específico dos bionanoconjugados preparados para imunodeteção, os estes são preparados com anticorpos, que ficam adsorvidos à superfície da nanopartícula. Quando os imunoconjugados são adicionados a uma amostra biológica para a captura do antigénio a detetar, o antigénio e as restantes proteínas que lá se encontram podem substituir os anticorpos à superfície da nanopartícula, o que leva a uma menor sensibilidade ou total inviabilidade do ensaio.⁵⁸

No entanto, a conjugação por ligação covalente estabelece uma ligação mais forte entre as nanopartículas e as biomoléculas. A ligação covalente não é criada de forma espontânea entre os grupos carboxílicos e as biomoléculas, sendo necessário promover essa ligação. Os grupos carboxílicos reagem com as aminas primárias das biomoléculas por reações de condensação. Para promover esta reação, são usados agentes de reticulação (ou *cross-linkers*) como as carbodiimidias solúveis em água.^{36,58} A carbodiimida EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) é dos agentes de reticulação mais usados e estudados que estão envolvidos nestas reações. O EDC reage

com o grupo carboxílico formando um intermediário instável, também designado por grupo carboxílico ativado. Este intermediário pode reagir de 3 formas: hidrolisar, reagir com uma amina primária (NH₂) e formar a ligação covalente ou reagir com a molécula de Sulfo-NHS. A vantagem de utilizar o Sulfo-NHS em vez de reagir diretamente com a amina primária deve-se ao facto de o Sulfo-NHS estabilizar o intermediário resultante da reação com o EDC e evitar a hidrólise do grupo carboxílico ativado. Na **Figura 1.7** estão representadas as estruturas do EDC e do Sulfo-NHS, os agentes reticulantes usados na promoção da ligação covalente entre o grupo carboxílico e as aminas primárias presentes nas biomoléculas.³⁶

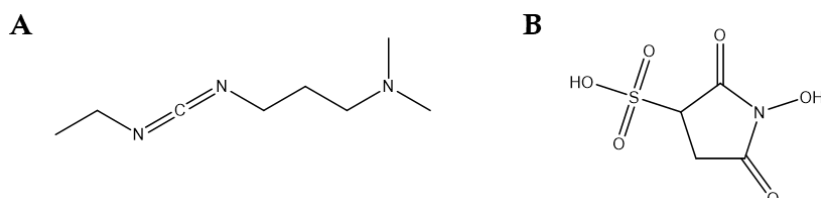


Figura 1.7 - Estruturas químicas dos agentes de reticulação 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (A) e N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) (B). O Sulfo-NHS estabiliza o intermediário resultante da reação entre o EDC e o grupo carboxílico do agente de revestimento da nanopartícula antes da reação com a biomoléculas.

1.4 Espetroscopia de Raman

Graças aos avanços da tecnologia nos campos da ótica, laser, nanofabricação e dispositivos de deteção, a espectroscopia de Raman aumentada pela superfície (SERS, do inglês *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) tornou-se uma ferramenta de análise rápida capaz de apresentar sensibilidade e informação estrutural importante.⁵⁹ Esta técnica pode ser usada para detetar biomarcadores proteicos em amostras biológicas em alternativa aos métodos usados atualmente.⁶⁰

A espectroscopia de Raman é uma espectroscopia vibracional associada à dispersão inelástica da radiação eletromagnética pela amostra.^{14,38,61} Neste processo, enquanto a maior parte dos fótons dispersos conservam a energia dos fótons incidentes (dispersão de Rayleigh), uma pequena fração de fótons ganha ou perde energia para o movimento vibracional e rotacional do analito (dispersão de Raman anti-Stokes e Stokes, respetivamente). A modulação de energia destes fótons corresponde à diferença de energia entre os estados vibracionais do analito e é esta diferença que resulta num espectro de Raman que proporciona uma impressão digital química para identificação do analito.³⁸ A **Figura 1.8** representa a dispersão de Rayleigh, anti-Stokes e Stokes.⁶²

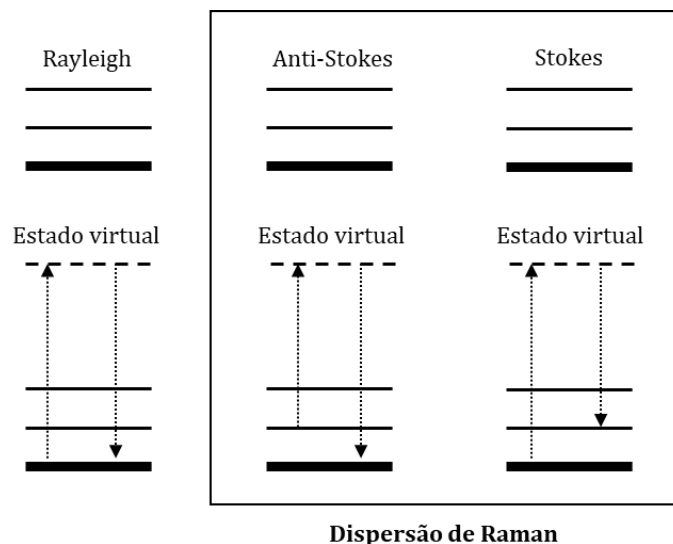


Figura 1.8 – Dispersão de Rayleigh, Anti-Stokes e Stokes. Adaptado de ⁶²

Dada a ausência de interferência por parte da água e tendo em consideração o baixo número de modos vibracionais simétricos da molécula (únicos modos ativos em Raman), esta é a espectroscopia mais apropriada para a deteção seletiva de biomoléculas em solução aquosa. No entanto, é necessária precaução de forma a evitar efeitos de fluorescência, uma vez que este fenómeno é várias ordens de grandeza mais intenso que a dispersão de Raman, o que pode mascarar os sinais de Raman. Este fenómeno pode ser evitado escolhendo um laser apropriado ou escolhendo cuidadosamente as espécies ativas em Raman.^{14,63} O sinal de Raman é geralmente fraco devido ao número reduzido de fótons dispersos (1 em 10^6 a 10^{10} fótons) apresentando limitações quando se pretende identificar analitos em baixa concentração.³⁸ A ressonância de Raman (RR) é uma técnica mais sensível e permite um aumento de sinal no espetro quando é usado um laser com uma frequência de excitação próxima ou igual ao máximo de absorção do cromóforo da molécula.⁶⁴ No entanto, nem sempre existe um laser com a frequência de excitação necessária para se obter este efeito.

Uma outra forma de aumentar o sinal de Raman é usar nanoestruturas metálicas como as nanopartículas de ouro que originou o fenómeno de dispersão de Raman aumentada pela superfície (SERS, do inglês *Surface Enhanced Raman Scattering*)^c.

1.4.1 Espectroscopia de Raman aumentada pela superfície (SERS)

O fenómeno de SERS foi observado pela primeira vez em 1974 por Fleischmann *et al.*⁶⁵ para a piridina adsorvida num eléctrodo de prata rugoso, mas apenas foi corretamente interpretado em 1977 em trabalhos independentes por Jeanmaire e Van Duyne⁶⁶ e Albrecht e Creighton⁶⁷.

A técnica de espectroscopia de SERS utiliza nanoestruturas metálicas para aumentar a capacidade de deteção pela espectroscopia de Raman e de acordo com a teoria plasmónica de SERS, os sinais óticos observados provêm do metal e não apenas da molécula em estudo, o que permite a deteção do analito em concentrações extremamente baixas.^{7,14} A Tabela 1.2 apresenta algumas das vantagens e desvantagens apresentadas pela técnica de SERS.⁶⁸

^c O termo *SERS* refere-se ao fenómeno de dispersão enquanto que o termo *SERS* refere-se à técnica usada.

Tabela 1.2 – Vantagens e desvantagens de SERS. ⁶⁸

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aplicável a qualquer molécula ativa em Raman sem necessidade de marcação; ✓ Elevada resolução que permite a detecção de vários componentes em simultâneo; ✓ Fácil manipulação de amostras; ✓ Análise rápida; ✓ Obtenção de sinal com espectrómetros de Raman portáteis. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Requer contacto entre a superfície que proporciona o aumento de sinal e o analito; ✗ Degradação dos substratos ao longo do tempo, levando a uma diminuição do sinal; ✗ Substratos não podem ser reutilizados.

1.4.2 Modelos de intensificação de sinal

Os modelos de intensificação de sinal permitem compreender o que está na origem do aumento de sinal de Raman proporcionado pelas nanoestruturas metálicas, podendo também ser designados como fator de aumento. Este caracteriza o aumento de um dado sinal obtido em relação ao sinal que deveria ser obtido pela espectroscopia normal de Raman para a mesma molécula e pode ser compreendido como o produto das contribuições do mecanismo de intensificação eletromagnético e do mecanismo de intensificação químico.^{62,69} A dificuldade na determinação do fator de aumento é estimar o número de moléculas que produzem o sinal de SERS, ou seja, o número de moléculas que se encontram adsorvidas à superfície do substrato.^{62,68}

Existem duas características importantes do fator de aumento de SERS: o fator de aumento máximo e o fator de aumento médio. O fator de aumento máximos ocorre nos *hot-spots*, locais na vizinhança de nanoestruturas plasmónicas onde o campo ótico local é mais intenso do que em torno desta.^{62,68} Estes *hot-spots* ocorrem em posições específicas entre duas nanoestruturas ou na própria nanopartícula, e apenas as moléculas que se encontram nesse local têm este aumento máximo.^{14,70-72}

1.4.2.1 Fator de intensificação eletromagnético

Segundo a descrição eletromagnética de SERS, o aumento de sinal é causado pela amplificação do campo elétrico devido à resposta do material à onda eletromagnética incidente.⁷³ O fator de intensificação eletromagnético é visto como a principal contribuição para o fator de aumento e deve-se ao acoplamento do modo vibracional da molécula com o campo eletromagnético gerado pela excitação dos LSPRs da nanoestrutura metálica.^{59,61,62,69,74} A LSPR das nanopartículas é capaz de induzir um campo elétrico na sua vizinhança, o que aumenta a intensidade do sinal de SERS.⁷⁵ Como consequência de excitar a LSPR de uma superfície metálica nanoestruturada ou uma nanopartícula, o campo eletromagnético local é aumentado.⁶⁹ O aumento do campo eletromagnético local não está uniformemente distribuído em torno da nanoestrutura metálica. Quando duas nanopartículas se encontram próximas, estas formam um *hot-spot*, dando origem a um campo eletromagnético local mais intenso do que o restante (**Figura 1.9**).^{62,68}

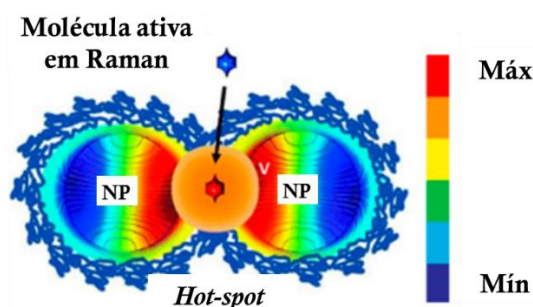


Figura 1.9 – Representação do mecanismo de intensificação eletromagnético nos hot-spots. Adaptado de ⁷⁶

O aumento provocado por este fator é de 10^3 a 10^{10} .^{69,74,77} Para este efeito ser vantajoso, a molécula a estudar deve estar próxima da superfície (no máximo a 10nm de distância) ou adsorvidas na superfície.⁶²

1.4.2.2 Fator de intensificação químico

O fator de intensificação químico corresponde à modificação da polarizabilidade da molécula por adsorção desta à nanoestrutura metálica, formando um complexo entre a molécula e a nanoestrutura. Esta modificação de polarizabilidade resulta do mecanismo de transferência de carga do complexo formado, apresentando esta polarizabilidade modificada uma ressonância aumentada com a excitação a que a molécula é sujeita, relativamente à existente na ausência da nanoestrutura.⁶² No caso de a molécula não estar covalentemente ligada ao metal, apenas se verifica uma ligeira alteração na distribuição eletrônica da molécula uma vez que a presença da nanoestrutura atua como uma perturbação da estrutura eletrônica (**Figura 1.10**). Se a molécula se encontrar ligada à nanoestrutura, verifica-se uma alteração considerável na polarizabilidade intrínseca da molécula provocada pela sobreposição das orbitais moleculares do metal e da molécula.⁶²

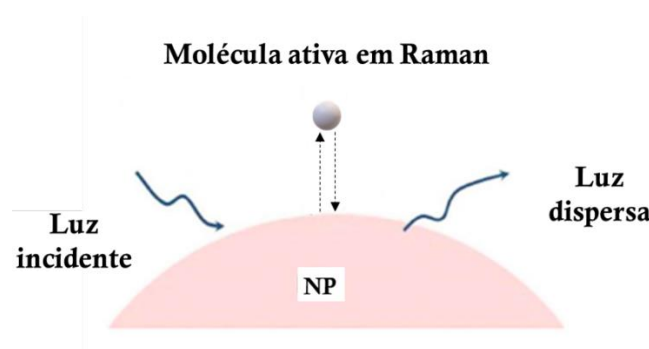


Figura 1.10 – Representação do mecanismo de intensificação químico. Adaptado de ⁷⁶

O aumento provocado por este fator é menor do que o provocado pelo fator eletromagnético, sendo de apenas 10^0 a 10^3 .^{61,62,69,73,74,77}

1.4.3 Substratos para SERS

Para a técnica de SERS detetar eficazmente um analito activo em Raman é essencial usar um bom substrato que seja reproduzível e robusto e que adsorva o analito. As nanopartícula metálicas em suspensão possuem estas características e podem ser obtidas por métodos químicos ou físicos. No caso dos métodos físicos, estas podem ser obtidas por ablação por laser pulsado de metais, nobres num meio líquido através do qual é possível obter nanopartículas esféricas estáveis de prata, ouro e cobre, cujo tamanho está dependente do tempo de irradiação. Esta técnica permite obter nanopartículas livres de espécies orgânicas ou iónicas.⁶⁸

A síntese química de nanopartículas ativas em SERS é usualmente efetuada por redução de iões de ouro ou prata em solução aquosa usando para tal agente redutores como o citrato, borohidreto de sódio, hidrazina ou hidrocloreto de hidroxilamina. Para além do agente redutor, é necessário um agente de revestimento para evitar a agregação das nanopartículas como o citrato de sódio, dodecanotiol, polietilenoglicol (PEG), ácido tânico ou polivinilpirrolidona (PVP). A capacidade redutora e concentração do agente redutor permite o controlo do tamanho das nanopartículas dado que um agente redutor mais forte (como por exemplo, boro-hidreto de sódio) produz nanopartículas de tamanho inferior às sintetizadas com recurso a um agente redutor mais suave (por exemplo, citrato de sódio).⁶⁸

Atualmente, é possível sintetizar nanopartículas metálicas com diferentes formas por métodos químicos como por exemplo nanoesferas, nanoconchas, nanocápsulas, nanotriângulos, nanoestrelas, nanocubos e nanobastonetes.^{68,78-80} Como reportado anteriormente^{68,81}, o uso de nanopartículas anisotrópicas (nanopartículas com mais de um eixo de simetria⁸²) aumenta o efeito

de SERS.^{82,83} Quando o sinal de SERS proporcionado por nanoesferas, nanotriângulos e nanoestrelas é comparado, conclui-se que as nanoestrelas são as que proporcionam o maior aumento devido às suas pontas capazes de aumentar o campo eletromagnético local.^{68,81,84}

1.5 Imunoensaios

Os imunoensaios são utilizados quando existe a necessidade de quantificar um analito numa dada amostra e são usados os anticorpos para identificar o mesmo de forma específica. A utilização de anticorpos em plataformas de biossensores e de diagnósticos proporcionam a estas elevada sensibilidade e especificidade na deteção de determinado analito.^{85,86}

O desenvolvimento de um imunoensaio implica a definição dos parâmetros a utilizar como qual o analito a identificar, que tipo de amostra é analisada, o modo de deteção (colorimétrico, fluorescência, absorção ou dispersão, por exemplo) e o tipo de imunoensaio (tipo *sandwich* ou competitivo, por exemplo).⁸⁶

O tipo de imunoensaio mais utilizado, principalmente em ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), é o ensaio tipo *sandwich*. Este imunoensaio utiliza dois anticorpos: o anticorpo de captura e o anticorpo de deteção. O anticorpo de captura está imobilizado numa superfície e liga o antigénio quando a amostra é adicionada ao substrato. De seguida, é adicionado o anticorpo de deteção que se vai ligar ao antigénio que se encontra imobilizado à superfície pelo anticorpo de captura. Assim, o antigénio fica entre os dois anticorpos, como uma *sandwich*. O anticorpo de deteção é marcado com uma molécula de forma a ser possível detetar a sua presença após ligação ao antigénio. À medida que a concentração de antigénio presente na amostra aumenta, assim aumenta a quantidade de anticorpo de deteção ligado e mais intenso o sinal obtido.⁸⁶

O desenvolvimento dos anticorpos de deteção foi abordado na secção 1.3.3. A preparação dos anticorpos de captura é abordada na secção seguinte (1.5.1).

1.5.1 Modificação de superfícies

As superfícies dos substratos usados para o desenvolvimento de biossensores não possuem os grupos necessários para a imobilização direta dos anticorpo, sendo necessário modificar a superfície primeiro. Os grupos funcionais do substrato podem ser ativados por tratamento químico, como por exemplo o uso da solução piranha ou plasma que forma uma camada de grupos ativos -OH.^{87,88} A presença deste grupos hidroxilo permitem a ligação covalente de moléculas de silano, formando uma monocamada de silano que através de uma molécula bi-funcional (agentes de reticulação ou *cross-linkers*) pode ser ligada ao anticorpo.^{85,87}

O silano a utilizar para a modificação da superfície depende do grupo funcional que queremos após a silanização. Os silanos como o APTES (3-aminopropiltriétoxissilano) e APTMS (3-aminopropiltrimetoxissilano) possuem na extremidade oposta grupos amina enquanto que o silano MPTMS (3-mercaptopropiltrimetoxissilano) possui um grupo tiol (-SH).⁸⁷ Após a formação da camada de silano, é usado um *cross-linker* como o glutaraldeído ou um éster para a formação da ligação covalente entre o grupo amina do aminosilano ou o grupo tiol do mercaptosilano utilizado e o grupo amina do anticorpo.⁸⁷ Para finalizar a preparação da superfície para ser utilizada, a superfície é bloqueada com Tween ou BSA de forma a eliminar a possibilidade de interação não específica entre o antigénio e a superfície.^{85,87}

1.6 Objetivos da dissertação e proposta de trabalho

A espectroscopia de Raman aumentada pela superfície (SERS) utiliza nanoestruturas metálicas com propriedades de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) para aumentar o sinal de uma molécula ativa em Raman. As nanoestruturas mais usadas para este fim são as nanopartículas de ouro em solução coloidal, que permitem, juntamente com o aumento de sinal da molécula ativa em Raman, a bioconjugação com proteínas como anticorpos para a detecção de analitos específicos com elevada sensibilidade.

O trabalho desenvolvido e apresentado nesta dissertação teve como objetivo principal o desenvolvimento de bionanoconjugados entre nanopartículas de ouro e um anticorpo com vista à criação de um ensaio de imunodeteção por SERS tipo *sandwich*, como representado na **Figura 1.11**.

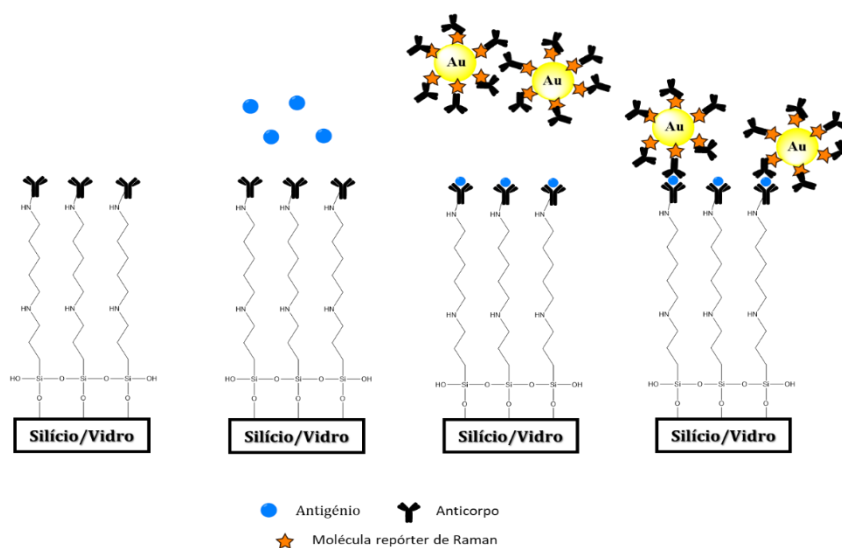


Figura 1.11 – Representação de um ensaio de imunodeteção tipo *sandwich*.

De forma a atingir os objetivos propostos, vão ser usadas nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs) para a obtenção dos bionanoconjugados. A funcionalização das AuNP será feita com ligandos bifuncionais, apresentando numa extremidade um grupo tiol para ligação por quimiossorção à superfície das AuNP e na extremidade oposta um grupo funcional ácido que permite interações electrostáticas vantajosas com biomoléculas. Para esta funcionalização pretende usar-se uma mistura de 11-MUA (cadeia de carbono alifática) e 4-MBA (sonda de Raman) ou apenas 4-MBA, de forma a maximizar o sinal obtido por SERS. A bionanoconjugação vai basear-se na interação electrostática entre os grupos ácidos carregados negativamente do ligando de funcionalização e o anticorpo. Para além da interação electrostática, será estudada a ligação covalente entre o ligando de funcionalização e o anticorpo, promovida por um agente reticulante. Por forma a garantir que o anticorpo se encontra ligado à nanopartícula, será usado um modelo enzimático em que o anticorpo usado (Anti-HRP) é específico para a peroxidase de rábano (HRP), uma enzima que catalisa a reação entre o ABTS e o H_2O_2 . Por espectroscopia de UV/Vis, é determinada a atividade da enzima que se encontra ligada à nanopartícula apenas pela reação altamente específica do anticorpo para o antígeno respetivo. Após esta conjugação, os bionanoconjugados são avaliados por SERS a fim de verificar a existência de um sinal intenso após todos os passos da bionanoconjugação.

Para além das nanoesferas de ouro, será estudada a possibilidade da utilização de outras nanoestruturas plasmônicas que possam aumentar a sensibilidade do ensaio devido a apresentarem *hot-spots* na sua estrutura, como por exemplo, as nanoestrelas de ouro.

De forma a construir o imunoensaio completo, será ainda desenvolvido trabalho no sentido de otimizar a formação de uma monocamada de silano numa superfície de vidro para posterior imobilização de Anti-HRP. As superfícies de vidro são inicialmente imersas em solução piranha (mistura 1:3 de peróxido de hidrogénio e ácido sulfúrico) e, após cura na estufa a $100^\circ C$, as

superfícies são imersas em soluções a diferentes percentagens do aminosilano APTES em tolueno. Estas superfícies são analisadas por elipsometria para determinar a espessura da camada de APTES, por AFM para verificar a uniformidade da camada e é calculado o ângulo de contacto com água para determinar a hidrofobicidade da superfície. Após determinados estes parâmetros e escolhida a percentagem da solução de APTES ideal para a formação da monocamada, será usada a molécula de glutaraldeído para fazer a ligação entre o grupo NH_2 do APTES e o anticorpo.

Capítulo 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais e reagentes

A lista detalhada dos reagentes químicos, proteínas e equipamentos encontra-se descrita no anexo I.

2.2 Síntese química de nanoestruturas de ouro

Antes da síntese das nanopartículas de ouro (esféricas ou estrelas), todo o material a usar é lavado com *aqua regia*. Esta é uma solução 1:3 de ácido nítrico para ácido clorídrico que permite remover vestígios de metais que se encontrem depositados no material a usar e poder-se-ão tornar núcleos de cristalização durante a síntese. Desta forma, todo o material a ser usado durante a síntese é imerso em *aqua regia* e no dia seguinte é lavado com água ultrapura (Água Mili-Q, 18.2M Ω ·cm) várias vezes até o pH estar compreendido entre 7 e 8.

2.2.1 Nanoesferas de ouro

A síntese de nanoesferas de ouro (AuNPs) é baseada no método de redução por citrato descrito por Turkevich^{47,48,52}. Foram adotadas duas abordagens na síntese de nanoesferas: a síntese direta⁴⁸ e a síntese inversa⁵². A principal diferença entre as duas abordagens é a ordem de adição dos reagentes ao balão. Na síntese direta, o citrato é adicionado ao ouro em ebulição enquanto que na síntese inversa é o oposto. Ojea-Jiménez e colaboradores⁵² reportaram que a ordem de adição dos reagentes durante a síntese altera o tamanho final das nanopartículas, sendo que a síntese inversa permite obter nanopartículas de ouro esféricas com cerca de 12nm de diâmetro enquanto que a síntese direta resulta em nanopartículas com diâmetros médios compreendidos entre 15 e 20nm.⁵²

Na síntese direta, são adicionados 100mL de H₂O ultrapura a um balão de fundo redondo de duas tubuladuras com uma barra magnética ao qual são acrescentados 69.2 μ L de H₂AuCl₄ 1.445M. A solução de 1mM de H₂AuCl₄ é colocada em aquecimento, agitação e refluxo até entrar em ebulição. Ao entrar em ebulição, são adicionados 10mL de citrato de sódio 38.8mM pré-aquecido mantendo as condições anteriores durante mais 15 minutos. No fim dos 15 minutos, a solução é retirada de aquecimento, refluxo e agitação e deixada a arrefecer à temperatura ambiente.

No caso da síntese inversa, adicionaram-se 98mL de H₂O ultrapura a um balão de fundo redondo de duas tubuladuras com uma barra magnética. O balão é colocado em aquecimento, refluxo e agitação (300rpm) até entrar em ebulição. Após ebulição, a agitação é aumentada para 1150rpm e 2mL de citrato de sódio 343.5mM são adicionados. São mantidas as condições durante 5 minutos. Passados os 5 minutos em ebulição, são adicionados 69.2 μ L de H₂AuCl₄ 1.445M e agitação diminuída para 700rpm. No fim de 5 minutos, é desligado o aquecimento, refluxo e agitação e a solução de nanopartículas é deixada a arrefecer à temperatura ambiente.

2.2.2 Nanoestrelas de ouro

A síntese de nanoestrelas de ouro (AuNSs) foi efetuada pelo método descrito por Yuan *et al.*⁸⁹ O primeiro passo na síntese de AuNSs é a preparação das AuNPs nas quais será favorecido o crescimento de pontas. Estas nanopartículas esféricas foram preparadas por síntese inversa (procedimento apresentado na secção 2.2.1).

Para AuNPs com 15nm de diâmetro, 81.6 μ L de H₂O ultrapura são adicionados a um *erlenmeyer* e colocado em agitação protegido da luz com papel de alumínio. De seguida, são adicionados 7.47mL de AuNPs a 2nM e 15.5 μ L de H₂AuCl₄ a 1.455M. Em simultâneo, são adicionados 450 μ L de ácido ascórbico a 100mM e 450 μ L de AgNO₃ a 4mM. A formação das nanoestrelas é confirmada pela alteração da cor da solução para um tom azulado. A agitação é mantida durante 30 segundos, após os quais o volume total (90mL) é dividido por dois tubos de

centrífuga de 50mL e centrifugados a 2500 x g (rotor BRK5308) durante 30 minutos. O sobrenadante é descartado e as nanopartículas que permanecem no fundo do tubo são retiradas e guardadas a 4°C para posterior caracterização e funcionalização.

2.3 Caracterização das nanoestruturas de ouro

2.3.1 Caracterização das nanoesferas de ouro

O tamanho e concentração das nanopartículas foram determinados por espectroscopia de UV-Vis descrito por Haiss *et al.*⁴⁶ Os autores apresentam a **Equação 2.1** para a determinação do diâmetro da nanopartícula (d) usando a razão entre a absorvância da banda plasmônica (A_{SPR}) e a absorvância a 450nm (A_{450}) e os parâmetros experimentais de ajuste B_1 e B_2 (3.00 e 2.20, respetivamente).⁴⁶

$$d = e^{B_1 \frac{A_{SPR}}{A_{450}} - B_2} \quad \text{Equação 2.1}$$

A concentração é obtida usando a Lei de Lambert-Beer, **Equação 2.2**, onde A_{450} corresponde à absorvância a 450nm, c corresponde à concentração (M), b corresponde ao percurso ótico da célula (cm) e ϵ_{450} corresponde ao coeficiente de extinção molar a 450nm ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$A_{450} = c b \epsilon_{450} \quad \text{Equação 2.2}$$

Haiss *et al.*, apresentam na informação suplementar uma tabela que permite a obtenção do valor de ϵ_{450} a partir do diâmetro determinado anteriormente. A tabela foi usada para obter a **Equação 2.3** que permite o cálculo de ϵ_{450} .⁴⁶

$$\ln(\epsilon_{450}) = 3.0869 \ln(d) + 10.869 \quad \text{Equação 2.3}$$

Para a caracterização das nanopartículas de ouro esféricas, foi obtido um espectro entre os comprimentos de onda de 350 e 750nm. Este permitiu obter os valores de absorvância a 450nm e da banda de LSPR (por volta dos 520nm) para a aplicação da **Equação 2.1** que determina o tamanho das nanopartículas e, por aplicação das equações **2.2** e **Equação 2.3** permite o cálculo da concentração da solução coloidal.

2.3.2 Caracterização das nanoestrelas de ouro

As nanoestrelas de ouro são partículas anisotrópicas o que faz com que a sua caracterização não possa ser feita da mesma forma que as esferas. Apenas técnicas como NTA (do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*) permitem obter o tamanho e concentração destas soluções coloidais. Uma vez que este equipamento não está disponível no laboratório, a concentração das AuNSs foi estimada por espectroscopia de UV/Vis, usando um intervalo de valores de coeficiente de extinção molar entre 5×10^9 e $9 \times 10^9 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ facultado pelo Mestre Miguel Oliveira e Professora Eulália Pereira.

Para a obtenção da concentração estimada das nanoestrelas de ouro é obtido um espectro entre os 400 e 1000nm do qual é retirado o valor de absorvância ao comprimento de onda máximo, entre 650 e 750nm. A concentração é então determinada por aplicação direta da lei de Lambert-Beer (**Equação 2.2**) com ambos os coeficientes de extinção e foi usada a média para os ensaios que foram efetuados posteriormente.

2.4 Funcionalização das nanoestruturas de ouro

Para a funcionalização das nanoestruturas de ouro é necessário usar um rácio de agente de revestimento (AR) para cada nanopartícula. A **Equação 2.4** permite o cálculo de volume de agente de revestimento necessário para a funcionalização de um determinado volume de AuNPs, onde o rácio AR/AuNP representa o rácio entre o número de moléculas de agente de revestimento para

uma nanopartícula, [AuNP] corresponde à concentração de AuNPs, V_{AuNPs} representa o volume de AuNPs a funcionalizar e [AR] corresponde à concentração de agente de revestimento.

$$V_{AR} = \frac{\text{rácio } AR/AuNP \times [AuNP] \times V_{AuNP}}{[AR]} \quad \text{Equação 2.4}$$

2.4.1 Funcionalização das nanoesferas de ouro: 11-MUA e 4-MBA

As nanopartículas foram funcionalizadas com soluções de 10mM de 11-MUA e/ou 4-MBA, preparadas com etanol absoluto anidro HPLC. De forma a determinar o rácio molar mínimo de agente de revestimento para nanopartícula de ouro, foram preparadas diferentes soluções de nanopartículas com rácios de AR/AuNP que variam entre 0 e 100 000. Estas soluções foram posteriormente analisadas por eletroforese em gel de agarose.

Foram funcionalizados 3 lotes de nanopartículas com diferentes misturas de 11-MUA com 4-MBA: 90% 11-MUA & 10% 4-MBA; 50% 11-MUA & 50% 4-MBA; 10% 11-MUA & 90% 4-MBA. Para cada experiência, a 500 μ L de AuNPs a 1.5nM, foram adicionados os volumes de 11-MUA e/ou 4-MBA calculados a partir da **Equação 2.4** de forma a obter os rácios entre 0 e 100 000. Os tubos de amostra foram colocados em agitação durante 15 minutos e, após este tempo, foram centrifugados a 14112 x g (rotor BRK5424) durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante de cada amostra foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 13.5 μ L de H₂O ultrapura, aos quais foram adicionados 1.5 μ L de glicerol para posterior separação por eletroforese em gel de agarose (técnica e procedimento em detalhe no Capítulo 3 | Técnicas de caracterização: AGE – Eletroforese em gel de agarose).

2.4.2 Funcionalização das nanoestrelas de ouro: 11-MUA e 4-MBA

As nanoestrelas foram funcionalizadas com soluções de 10mM de 11-MUA e/ou 4-MBA, preparadas com etanol absoluto anidro HPLC. Foi usado o rácio de funcionalização de 100 000:1, o rácio anteriormente usado pelo Mestre Miguel Almeida.

Foram funcionalizados diferentes lotes de nanoestrelas de ouro com diferentes misturas de 11-MUA com 4-MBA: 90% 11-MUA & 10% 4-MBA; 50% 11-MUA & 50% 4-MBA; 10% 11-MUA & 90% 4-MBA; 100% 4-MBA. A funcionalização das AuNSs por adição dos agentes de revestimento à síntese após ajustar o pH para cerca de 9 e antes da centrifugação. A funcionalização só é considerada completa quando é observado um desvio batocrómico da banda de LSPR no espetro de absorção.

2.5 Bionanoconjugados com nanoesferas de ouro

2.5.1 Conjugação dos anticorpos com as nanoesferas de ouro por interação eletroestática

A conjugação das nanopartículas com Anti-HRP a 2.4x10⁻⁵M é feita após a funcionalização destas com uma solução etanólica de 4-MBA a 10mM. Para tal, a 1.5nM de AuNPs é adicionado o volume de 4-MBA correspondente ao rácio de funcionalização de 5000:1. Tal como referido anteriormente, a solução é colocada em agitação durante 15 minutos. Uma vez que vão ser testados vários rácios de bioconjugação com anticorpo, a solução de AuNPs é dividida por tubos de amostra de forma a que cada um dos tubos contenha 500 μ L de AuNPs@4-MBA (AuNPs funcionalizadas com 4-MBA).

Pela **Equação 2.4**, é possível calcular os volumes de anticorpo a adicionar a cada um dos tubos de amostra de forma a obter rácios de bioconjugação entre 0 e 2150. As amostras foram guardadas a 4°C durante a noite e posteriormente centrifugadas a 14112 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 13.5 μ L de tampão fosfato de

potássio 10mM (pH=7.5) aos quais foram adicionados 1.5 μ L de glicerol para posterior separação por eletroforese em gel de agarose (técnica e procedimento em detalhe na secção 3.2).

2.5.2 Conjugação dos anticorpos com as nanoesferas de ouro por ligação covalente

De forma a obter bionanoconjugados robustos, foi usada a estratégia de ligação covalente entre o agente de revestimento e o anticorpo usado. De forma a favorecer a ligação covalente entre o grupo carboxílico do 4-MBA (-COOH) e o grupo amina do anticorpo (-NH₂), foi usada a química de reticulação com EDC e Sulfo-NHS. Estes dois agentes funcionam como ativadores do grupo carboxílico, tendo o Sulfo-NHS ainda a função de estabilizar este complexo. Foram testadas diferentes concentrações dos dois reagentes, estando o Sulfo-NHS no dobro da concentração de EDC.

Foi preparada uma solução de AuNPs a 1.5nM funcionalizadas com uma solução etanólica de 4-MBA a 10mM no rácio de 5000:1 com agitação durante 15 minutos. A solução de AuNPs@4-MBA foi dividida por tubos de amostra com 500 μ L cada tubo. As soluções iniciais de EDC e Sulfo-NHS foram preparadas em H₂O ultrapura a 1M. Foram preparadas soluções sucessivas até 0.1mM de forma a que fosse apenas necessário adicionar 5 μ L de EDC e 10 μ L de Sulfo-NHS a cada tubo de amostra para obter as concentrações de 10 a 0.001mM e 20 a 0.002mM de cada reagente, respetivamente. O rácio de anticorpo foi mantido constante a 17:1 (Anti-HRP:AuNP) e a concentração de Anti-HRP foi de 2.4x10⁻⁵M. As amostras foram incubadas durante 15 minutos e posteriormente centrifugadas a 14112 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 13.5 μ L de tampão fosfato de potássio 10mM (pH=7.5) aos quais foram adicionados 1.5 μ L de glicerol para posterior separação por eletroforese em gel de agarose (técnica e procedimento em detalhe na secção 3.2).

Após a determinação da concentração de EDC e Sulfo-NHS a que se observa a formação da ligação covalente, foi estudada a possibilidade de aumentar o rácio de anticorpo face à nanopartícula de forma a aumentar a sensibilidade dos bionanoconjugados. Foram usadas as concentrações de 0.01mM de EDC e 0.02mM de Sulfo-NHS para todas as amostras e os rácios de Anti-HRP variaram entre 0 e 2000, com a concentração de Anti-HRP a 2.4x10⁻⁵M. As amostras foram incubadas durante a noite e posteriormente centrifugadas a 14112 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 13.5 μ L de tampão fosfato de potássio 10mM (pH=7.5) aos quais foram adicionados 1.5 μ L de glicerol para posterior separação por eletroforese em gel de agarose (técnica e procedimento em detalhe na secção 3.2).

2.5.3 Bloqueamento da superfície com BSA

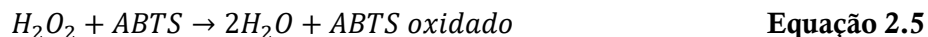
A preparação dos bionanoconjugados prosseguiu com 500 μ L de AuNPs a 1.5nM funcionalizadas com 4-MBA na razão de 5000:1 (AuNPs:4-MBA). As concentrações de EDC e Sulfo-NHS usadas foram de 0.01mM e 0.02mM, respetivamente, e o rácio de anticorpo foi de 17:1 (Anti-HRP:AuNPs). Após 15 minutos de conjugação, as amostras foram centrifugadas a 14112 x g durante 10 minutos a 4°C, sendo descartado o sobrenadante e o sedimento ressuscitado em 200 μ L de BSA a 1mg/mL em tampão fosfato de potássio 10mM (pH=7.5). As amostras foram incubadas durante 1 hora e posteriormente centrifugadas a 14112 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 500 μ L de tampão fosfato de potássio 10mM (pH=7.5). As amostras foram armazenadas a 4°C para posterior conjugação com HRP para ensaios enzimáticos e espectroscopia de Raman.

2.5.4 Conjugação com HRP

A conjugação dos bionanoconjugados bloqueados com BSA com a enzima específica do anticorpo, a HRP, foi feita com uma solução a 3.42x10⁻³mg/mL (7.78x10⁻⁸M) no mesmo rácio usado para a conjugação do anticorpo com as AuNPs (17:1). conjugação foi feita durante 5 minutos, após os quais as amostras foram centrifugadas a 14112 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 500 μ L de reagente D do ensaio enzimático (secção 2.6).

2.6 Ensaio enzimático com enzima peroxidase de rábano (HRP)

A atividade da enzima HRP foi determinada por aplicação do protocolo da *Sigma-Aldrich*⁹⁰. Neste, o ABTS é oxidado na presença de H₂O₂ e a reação é catalisada pela HRP, de acordo com a **Equação 2.5**. O aparecimento da espécie ABTS oxidado em solução é monitorizado por espectroscopia de UV/Visível, acompanhando a absorvância 405nm.



A composição das soluções necessárias para executar o ensaio enzimático está apresentada na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 – Soluções necessárias para o ensaio enzimático da peroxidase.

Reagente	Composição
Reagente A	100mM de fosfato de potássio monobásico, pH=5.0 Ajustar pH com KOH 1M
Reagente B	9.1mM de ABTS em <u>Reagente A</u> Preparar fresco
Reagente C	0.3% (v/v) de H ₂ O ₂ em <u>H₂O ultrapura</u> Preparar fresco
Reagente D	40mM de fosfato de potássio monobásico, pH=6.8 0.25% (m/v) BSA 0.5% (v/v) Triton X-100 Ajustar pH com KOH 1M
Reagente E	0.5 unidades/mL de enzima HRP em <u>Reagente D</u>

Para preparar o reagente E (a solução de enzima HRP), é necessário ter em conta o valor de unidades/mg sólido (valor específico para cada lote de enzima) que, no caso do lote usado, era de 146 unidades/mg sólido. Para obter um valor de 0.5 unidades/mL de enzima, era necessária uma concentração de 3.42×10^{-3} mg/mL de HRP em reagente D. Uma vez que a quantidade de sólido a pesar é muito pequena, foi preparada uma solução de HRP *stock* de 1mg/mL. A solução *stock* de HRP foi diluída para a concentração a usar de 3.42×10^{-3} mg/mL em reagente D e armazenada a 4°C.

Um ensaio enzimático de HRP é dividido em duas medições: a variação de absorvância a 405nm por minuto de uma amostra sem enzima (branco) e a variação de absorvância a 405nm por minuto de uma amostra com enzima (teste). Com estes dois valores, é possível aplicar a **Equação 2.6** de forma a obter o número de unidades por mL de enzima, onde V_f corresponde ao volume final de reação, FD corresponde ao fator de diluição usado, ϵ_{405nm} é o coeficiente de extinção molar do ABTS oxidado a 405nm e V_{enzima} é o volume de enzima adicionado à reação.

$$\text{unidades/mL de enzima} = \frac{(\Delta A_{405nm}/\text{min teste} - \Delta A_{405nm}/\text{min branco}) \times V_f \times FD}{\epsilon_{405nm} \times V_{enzima}} \quad \text{Equação 2.6}$$

2.6.1 Enzima livre

A preparação das amostras (branco e teste) para o ensaio enzimático da enzima livre são semelhantes. Em primeiro lugar, é preparado um tubo de amostra com 1mL de ABTS (reagente B). A este tubo de amostra, são adicionados 17 μ L de reagente D no caso da amostra de branco, e 17 μ L de HRP a 3.42x10⁻³mg/mL (reagente E) no caso da amostra de teste. De seguida, são adicionados 34 μ L de H₂O₂ (reagente C) e é iniciada a contagem do tempo de reação. Desta mistura reacional, são retirados 100 μ L e colocados numa célula de quartzo de 1mL com 900 μ L de reagente A. A absorvância a 405nm é registada em intervalos de 30 em 30 segundos durante 16 minutos no caso da amostra de branco, e durante 8 minutos no caso da amostra de teste. Os ensaios foram executados em triplicados e para cada amostra de teste, foi preparada uma amostra de branco.

2.6.2 Bionanoconjugados

Para os ensaios enzimáticos dos bionanoconjugados, a amostra de branco é feita com os bionanoconjugados sem HRP (apenas bloqueados com BSA) e a amostra de teste contém os bionanoconjugados após a conjugação com a HRP.

Em primeiro lugar, é preparado um tubo de amostra com 1mL de ABTS (reagente B). A este tubo de amostra, são adicionados 17 μ L de bionanoconjugados apenas bloqueados com BSA a 1.5nM no caso da amostra de branco, e 17 μ L de bionanoconjugados com HRP ligada à Anti-HRP a 1.5nM no caso da amostra de teste. De seguida, são adicionados 34 μ L de H₂O₂ (reagente C) e é iniciada a contagem do tempo de reação. Desta mistura reacional, são retirados 100 μ L e colocados numa célula de quartzo de 1mL com 900 μ L de reagente A. A absorvância a 405nm é registada em intervalos de 30 em 30 segundos durante 16 minutos no caso da amostra de branco, e durante 8 minutos no caso da amostra de teste. Os ensaios foram executados em triplicados e para cada amostra de teste, foi preparada uma amostra de branco.

2.7 Espectroscopia de Raman e SERS

Os espectros de Raman e de SERS foram obtidos num micro-Raman *Renishaw inVia Qontor* com o laser de 633nm com uma potência de 32mW, o centro do espectro a 1125cm⁻¹ e a objetiva 50x LD (longa distância).

A **Tabela 2.2** resume a percentagem e potência de laser, tempo de exposição da amostra ao laser e número de acumulações usada na obtenção dos espectros de Raman ou SERS de cada amostra.

Tabela 2.2 – Percentagem e potência de laser, tempo de exposição da amostra ao laser e número de acumulações usada na obtenção dos espectros de Raman ou SERS de cada amostra.

Amostras	Potência(mW)	Tempo de exposição (s)	Acumulações
Raman			
4-MBA sólido	1.6	10	7
SERS			
AuNPs@11-MUA & 4-MBA	0.32	7	5
Bionanoconjugados	1.6	10	9
AuNSs@11-MUA & 4-MBA	1.6	10	7

2.8 Modificação de superfícies de vidro e silício

2.8.1 Silanização do vidro e silício

A modificação das superfícies de vidro e silício foi feita segundo o protocolo desenvolvido por Gunda *et al.*⁸⁸ O material de vidro usado na silanização é lavado com detergente e H₂O ultrapura, passado por isopropanol e acetona e mantido na estufa durante a noite a 110°C.

As amostras de vidro e silício que irão servir como suporte para a silanização são cortados em amostras de 2cm x 1cm e são igualmente lavadas com detergente e H₂O ultrapura. São colocadas em isopropanol e sujeitas a ultrassons durante 5 minutos. Após os 5 minutos, são secas com azoto e colocadas em acetona e ultrassons durante mais 5 minutos.

O passo seguinte na limpeza do substrato é a imersão das amostras em solução piranha (mistura 1:3 de H₂O₂ para H₂SO₄). Esta solução é preparada sob agitação sem aquecimento e o peróxido de hidrogénio é adicionado gota a gota ao ácido sulfúrico. A solução é distribuída por vários copos de vidro onde se encontram as amostras e estas devem ficar submersas durante 20 minutos. Após os 20 minutos, as amostras são lavadas com H₂O ultrapura e secas sob corrente de azoto, sendo depois colocadas na estufa a 110°C durante a noite.

No dia seguinte, antes de serem retiradas as amostras da estufa, são preparadas as soluções de APTES a diferentes concentrações (1%, 2%, 5% e 10%) em tolueno. As amostras são então retiradas da estufa e imersas nas soluções de APTES e mantidas no excicador durante 1 hora. Passado este tempo, as amostras são retiradas das soluções e lavadas com tolueno e acetona. As amostras são mantidas na estufa durante a noite para posterior caracterização

2.8.2 Caracterização da superfície

As superfícies obtidas foram caracterizadas com recurso às técnicas de ângulo de contacto, elipsometria e microscopia de força atómica.

2.8.2.1 Ângulo de contacto de água (WCA)

A determinação do ângulo de contacto foi efetuada pelo método de *sessile drop* com o equipamento *Dataphysics OCA 15Plus* com um sistema de vídeo e câmara de alta resolução. Com o auxílio do programa *SCA 20*, foi dispensada uma gota de 5µL sobre a superfície a analisar e gravado o vídeo da deposição da gota. O ângulo de contacto foi medido 5 segundos após a deposição da gota.

2.8.2.2 Elipsometria

A elipsometria foi usada para determinar a espessura da camada após cada passo de modificação da superfície. As medições foram efetuadas com o elipsómetro *UVISEL 2VUV* (*Horiba-Jobin Yvon*) no intervalo de 1.5 a 6.5eV com um ângulo de incidência de 70°. Os dados experimentais foram ajustados usando a lei de Cauchy pelo programa *DeltaPsi2*.

2.8.2.3 Microscopia de força atómica (AFM)

A microscopia de força atómica foi usada para determinar a topografia das amostras. As medições foram efetuadas pelo Mestre Tomás Calmeiro no equipamento *Asylum MFP-3D* no CENIMAT. A área analisada foi de 5µm x 5µm, usando o modo intermitente de modo a minimizar a força exercida na superfície.

Capítulo 3 | TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.1 Espectroscopia de ultravioleta-visível

A espectroscopia de ultravioleta-visível (UV/Vis) refere-se à espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético.⁹¹ Quando a luz é absorvida por uma amostra, a irradiância (P , em W/m^2) do feixe incidente diminui. A luz passa por um monocromador que seleciona um dado comprimento de onda com irradiância P_0 e esta atravessa a amostra com um dado percurso ótico (b). Uma vez que parte da luz é absorvida pela amostra, a irradiância que chega ao detetor (P) é inferior a P_0 . A **Figura 3.1** apresenta um esquema de um espectrofotómetro de feixe único.⁹²

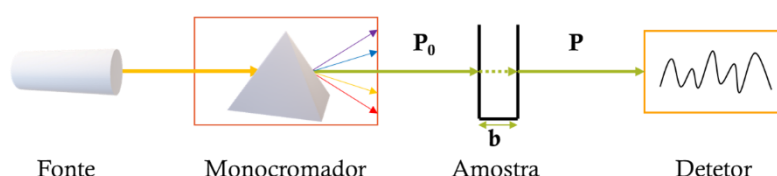


Figura 3.1– Esquema de um espectrofotómetro de feixe único. Adaptado de ⁹²

À quantidade de luz absorvida pela amostra é dado o nome de absorvância (A) e é dada pela **Equação 3.1**.⁹²

$$A = \log \frac{P_0}{P} \quad \text{Equação 3.1}$$

A absorvância é diretamente proporcional à concentração da amostra, tornando possível o uso da espectroscopia de absorção UV/Vis para a determinação da concentração de uma dada solução. Para tal, é usada a lei de Lambert-Beer (**Equação 3.2**) onde A corresponde à absorvância, c corresponde à concentração da amostra (em M), b corresponde ao percurso ótico (em cm) e ϵ corresponde ao coeficiente de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$). O coeficiente de extinção molar é característico de cada substância e permite o cálculo da quantidade de luz absorvida a um determinado comprimento de onda.⁹²

$$A = c b \epsilon \quad \text{Equação 3.2}$$

Os espectros foram obtidos num espectrofotómetro *Varian Cary 50 Bio UV/Visible* com a células de quartzo *Hellma Analytix*. As medições foram efetuadas com diferentes intervalos de comprimento de onda que se encontram especificados junto do procedimento correspondente.

3.2 AGE – Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose (AGE, do inglês *Agarose Gel Electrophoresis*) permite a separação de biomoléculas pela sua carga e pelo seu tamanho.⁹³ Apesar de ser amplamente usado para biomoléculas, também é possível a separação de nanopartículas metálicas. Esta técnica tem sido usada para comparar o tamanho das nanopartículas modificadas por moléculas complexas que alteram a sua carga e tamanho, fazendo com que a migração no gel seja distinta.⁹⁴

As nanopartículas funcionalizadas negativamente (com 4-MBA ou 11-MUA, cujo grupo carboxílico lhes confere carga negativa) migram no gel para o polo positivo. Quando, após funcionalização, as nanopartículas são conjugadas com biomoléculas, o seu tamanho aumenta e a carga negativa diminui devido ao cancelamento progressivo de carga proporcionado pelas biomoléculas. Quanto maior o número de biomoléculas ligadas à superfície da nanopartícula, maior o seu tamanho e menos negativa a sua carga o que leva a menor migração no gel.

A funcionalização das nanopartículas de ouro e a formação dos bionanoconjugados foi confirmada pela separação por eletroforese em gel de agarose. Foi preparada uma solução de 0.4%

de agarose em tampão TAE 1:8 (Tampão Tris-Acetato-EDTA). Esta solução foi sujeita a aquecimento e agitação em placa até dissolução total da agarose (solução fica transparente). Posteriormente, foi colocada no suporte (*BioRad*) com um pente de 15 poços de amostra e permaneceu à temperatura ambiente até solidificar. Quando o gel está solidificado, o pente é retirado e o suporte com o gel é colocado na tina de eletroforese (*Mini-Sub Cell GT, BioRad*) juntamente com tampão de corrida, TAE 1:8, até à marca de máximo de forma a cobrir o gel. As amostras foram colocadas nos poços do gel (15µL) e a separação eletroforética efetuada a 150V durante 15 minutos (fonte de tensão *PowerPac Basic Power, BioRad*). No final da corrida, o gel é retirado da tina e do suporte e é fotografado para posterior análise.

A mobilidade eletroforética dos bionanoconjugados foi avaliada com o programa *eReuss* desenvolvido pelo professor Ludwig Kripphal do Departamento de Informática e Investigador da NOVA-LINCS, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. O programa *eReuss* permite a análise dos géis obtidos pela eletroforese em gel de agarose através da sua imagem. Com esta, o programa determina a distância de migração das amostras, sendo necessário indicar o início da corrida (localização dos poços, ponto inicial onde foram colocadas as amostras), e a frente de migração (a amostra que migrou mais). Esta distância permite determinar a mobilidade eletroforética (μ , em $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$) pela **Equação 3.3**, onde v corresponde à velocidade de migração (cm/s) e E corresponde ao campo elétrico (V/s).

$$\mu = \frac{v}{E} \quad \text{Equação 3.3}$$

A velocidade de migração é calculada com recurso à **Equação 3.4**, onde v corresponde à velocidade de migração ($\mu\text{m}/\text{s}$), dm corresponde à distância de migração (μm) e t ao tempo de corrida do gel (s).

$$v = \frac{dm}{t} \quad \text{Equação 3.4}$$

O campo elétrico (E , em V/cm) é constante e é calculado pela **Equação 3.5**, onde v corresponde à intensidade de corrente aplicada durante a corrida (V) e d corresponde à distância entre os dois elétrodos na tina de eletroforese (cm). Uma vez que estes dois valores são constantes ao longo da corrida e para todas as amostras, o valor de campo elétrico é de 10V/cm (150V de intensidade de corrente aplicada e 15cm entre os dois elétrodos).

$$E = \frac{v}{d} \quad \text{Equação 3.5}$$

3.3 Espetroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é uma técnica de dispersão baseada na dispersão inelástica da radiação eletromagnética depois de interagir com as moléculas da amostra.^{14,38,61,63} Quando a radiação eletromagnética interage com a amostra, a frequência de dispersão dos fotões pode ter a mesma frequência que a radiação incidente (dispersão elástica, também denominada dispersão de Rayleigh) ou uma frequência diferente (dispersão inelástica, também denominada dispersão de Raman).⁶³ Apenas uma pequena fração dos fotões dispersos têm uma dispersão inelástica, a dispersão que é detetada nesta espectroscopia.^{38,63}

No micro-espectrómetro de Raman (**Figura 3.2**), o laser passa por uma objetiva que permite a sua focagem. Quando o laser interage com a amostra, o feixe de dispersão passa pela mesma objetiva usada para focar o laser. A dispersão de Rayleigh é removida por um filtro que apenas permite a passagem da dispersão inelástica dos fotões, ou seja, radiação com frequência diferente da radiação incidente. A luz é então focada e direcionada para o detetor.^{63,69,95}

A maioria dos deteores usados nos micro-Raman são baseados em dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês *Charge-Coupled Device*). Estes deteores permitem uma deteção multicanal com elevada sensibilidade baixo ruído no sinal obtido.⁹⁵

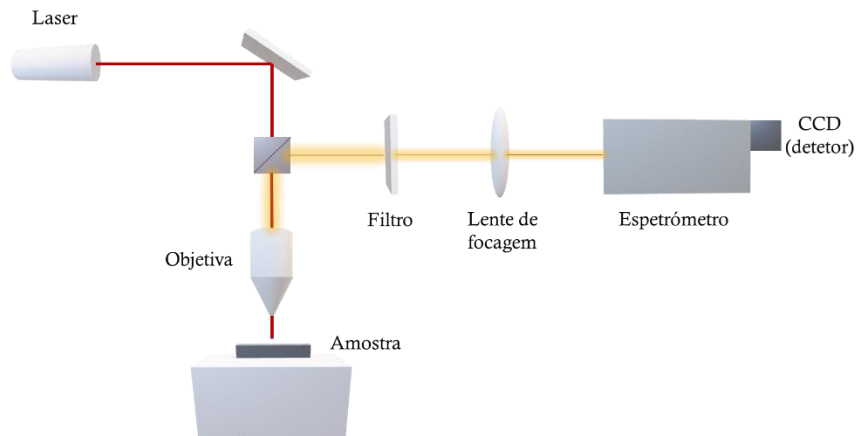


Figura 3.2 – Representação esquemática de uma configuração típica de um micro-Raman. Adaptado de ⁶⁹

3.4 Caracterização de superfícies

3.4.1 Elipsometria

A elipsometria espectroscópica é uma técnica ótica usada para medir indiretamente a espessura de uma camada fina de um composto depositado numa superfície pelo seu comportamento face à incidência de um feixe de luz polarizada.⁹⁶⁻⁹⁸ A luz polarizada linear incidente, quando refletida na amostra, altera para uma forma elíptica, fenómeno este que dá o nome à técnica.^{96,97,99} Esta técnica apresenta como vantagens a elevada precisão com uma sensibilidade de cerca de 0.1\AA , não é destrutiva e permite obter as constantes óticas e espessura da amostra. A principal desvantagem prende-se com a necessidade de ajustar um modelo para a análise dos resultados obtidos, resultando numa caracterização indireta da amostra.⁹⁷

De forma simples, um elipsómetro é constituído por uma fonte de luz, um polarizador, um suporte de amostra, um modulador fotoelástico, um analisador e um detetor de luz. O polarizador, modulador fotoelástico e o analisador permitem a alteração do estado de polarização da luz. A Figura 3.3 representa um esquema de um elipsómetro com os elementos mencionados.^{96,98}

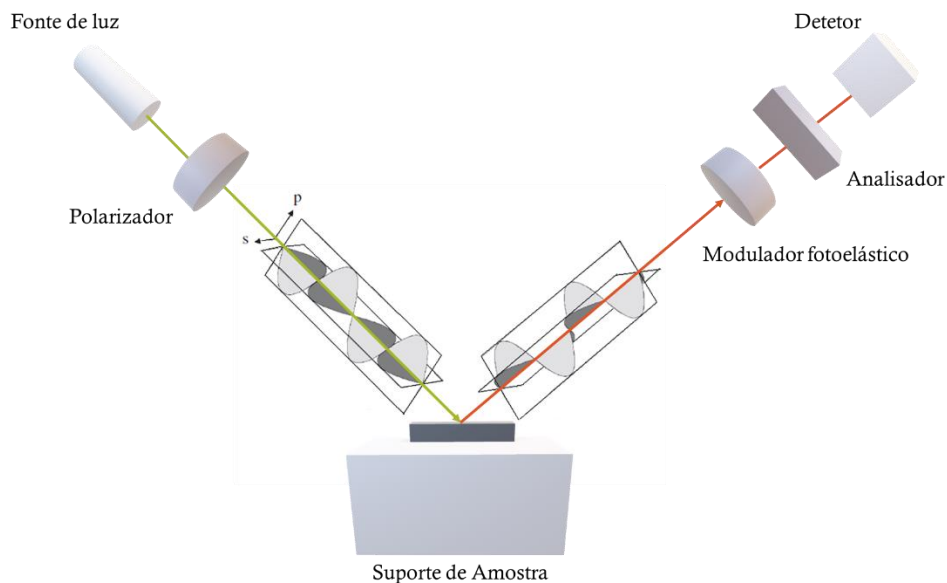


Figura 3.3 – Representação esquemática de um elipsómetro. Adaptado de ^{96,98}

A medição da espessura da amostra é feita ao incidir um feixe de luz polarizada na amostra com uma incidência oblíqua face à amostra.^{96,97} Este feixe, ao incidir na amostra, é repolarizado e detetado.⁹⁶ A incidência oblíqua face à amostra permite a distinção de duas polarizações: polarização *p* (associada à polarização da luz cuja onda se propaga perpendicularmente à amostra) e polarização *s* (associada à polarização da luz cuja onda se propaga paralelamente à amostra).^{97,99,100} Na **Figura 3.4** encontra-se representado um esquema da polarização da luz incidente e da luz repolarizada após ser refletida na amostra.¹⁰⁰

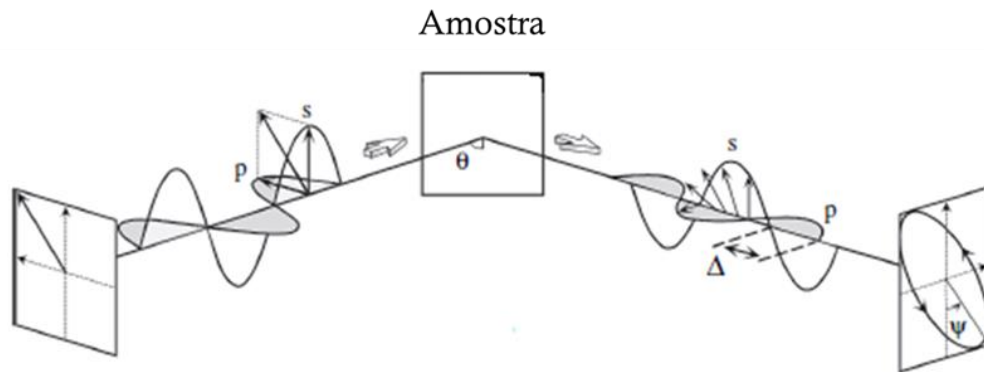


Figura 3.4 – Representação esquemática da polarização elíptica da luz refletida na amostra. A luz incidente é refletida na amostra que, devido às características de superfície, altera a amplitude (Ψ) e fase (Δ) entre a polarização *p* (perpendicular à amostra) e *s* (paralelo à amostra). Adaptado de ^{100,101}

A elipsometria mede a variação de amplitude (Ψ) e de fase (Δ) entre a polarização *p* e *s* da luz após reflexão na amostra.^{96,97,99-101} Estes dois valores descrevem o estado de polarização elítico após a luz polarizada linear incidente ser refletida pela amostra e estão relacionados com o complexo de Fresnel de acordo com a **Equação 3.6**, onde ρ representa o coeficiente de Fresnel e r_p e r_s correspondem aos coeficientes de reflexão de luz polarizada perpendicular e paralelo à amostra, respetivamente.^{98,99,101}

$$\rho = \tan \Psi e^{i\Delta} = \frac{r_p}{r_s} \quad \text{Equação 3.6}$$

Na espetroscopia de elipsometria por modulação de fase, os valores de Ψ e Δ são obtidos a partir dos componentes I_s (**Equação 3.7**), I_c (**Equação 3.8**) e $I_{c'}$ (**Equação 3.9**).⁹⁸

$$I_s = \sin 2\Psi \sin \Delta \quad \text{Equação 3.7}$$

$$I_c = \sin 2\Psi \cos \Delta \quad \text{Equação 3.8}$$

$$I_{c'} = \cos 2\Psi \quad \text{Equação 3.9}$$

A combinação dos componentes I_s e I_c permitem uma medição precisa da variação de fase e a combinação dos componentes I_c e $I_{c'}$ permitem uma medição precisa da variação de amplitude.⁹⁸ Com os valores de Ψ e Δ , é aplicado um modelo que represente a estrutura da camada presente na amostra de forma a ser obtida a sua espessura.^{97,98,101}

3.4.2 WCA – Ângulo de contacto da água

A análise ótica de uma gota de água colocada numa superfície permite caracterizar o comportamento de molhabilidade da superfície. O estudo desta característica de superfície envolve a medição do ângulo de contacto entre o líquido e o sólido quando estes interagem.^{102,103}

O aparelho que mede o ângulo de contacto é denominado de goniómetro. Este é constituído por um sistema com seringa para depositar o líquido na amostra, um suporte de amostra, uma fonte de luz e uma câmara de alta resolução. A **Figura 3.5** apresenta um esquema da constituição de um goniómetro para medição do ângulo de contacto.^{102,103}

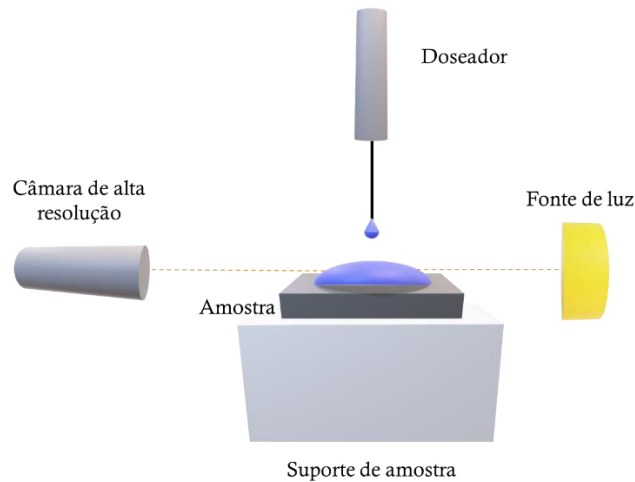


Figura 3.5 – Representação esquemática de um goniómetro para medição do ângulo de contacto.
Adaptado de ^{102,103}

O ângulo de contacto é definido como o ângulo formado entre a interface sólido-líquido e a interface líquido-vapor. A equação de Young (**Equação 3.10**) relaciona as tensões interfaciais com o ângulo de contacto, onde θ_Y representa o ângulo de contacto (também denominado ângulo de contacto de Young), e γ_{LV} , γ_{SV} e γ_{SL} correspondem às tensões de interface líquido-vapor, sólido-vapor e sólido-líquido, respetivamente.

$$\gamma_{LV} \cos \theta_Y = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad \text{Equação 3.10}$$

Na **Figura 3.6** estão representadas as interfaces que definem o ângulo de contacto. A forma de uma gota de líquido é determinada pela tensão de superfície do líquido uma vez que as moléculas que se encontram à superfície não estão rodeadas por moléculas vizinhas que balancem as forças que atuam sobre essa mesma molécula. Isto faz com que essas moléculas sejam puxadas para o interior da gota pelas moléculas vizinhas criando uma pressão interna.^{102,103}

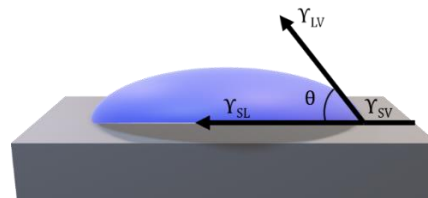


Figura 3.6 – Representação do ângulo de contacto de uma gota de líquido numa superfície sólida. O ângulo de contacto (θ) é formado pela interface sólido-líquido (γ_{SL}) e a interface líquido-vapor (γ_{LV}).
Adaptado de ¹⁰²

A molhabilidade da amostra permite caracterizar a superfície como hidrofóbica ou hidrofílica. Quando o ângulo de contacto é inferior a 90° , estamos perante uma elevada molhabilidade o que significa que a superfície é hidrofílica. No caso do ângulo de contacto ser superior a 90° , a molhabilidade é baixa, significando que a superfície é hidrofóbica.¹⁰²

3.4.3 AFM – Microscopia de força atómica

A microscopia de força atómica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) é uma técnica baseada em forças interatómicas que permite a caracterização de superfícies.¹⁰⁴ Esta técnica usa uma ponta que interage com a superfície e recolhe informação acerca das forças atrativas e repulsivas que existem entre a amostra e a ponta, produzindo uma imagem topográfica tridimensional da superfície.¹⁰⁵

O princípio da técnica de AFM é a medição das deflexões do cantiléver à medida que a ponta desliza e analisa a superfície da amostra. Esta medição é possível uma vez que incide sobre o cantiléver um feixe de laser que é refletido para um fotodetetor. Este fotodetetor está geralmente dividido em quadrantes (A, B, C e D) e as deflexões no cantiléver alteram a localização do feixe de laser refletido no fotodetetor. Esta alteração é registada e permite a obtenção da topografia da superfície (**Figura 3.7**). O suporte onde se encontra a amostra permite o movimento nos eixos x e y, permitindo uma análise bidimensional da superfície. A tridimensionalidade da amostra é obtida uma vez que o cantiléver tem acoplado um sensor z que permite alterar a altura a que este se encontra da amostra.¹⁰⁵ O AFM apresenta 3 modos principais para analisar a superfície: o modo de contacto, o modo de não contacto e o modo intermitente.^{104,105} No modo de contacto, a ponta mantém-se em contacto constante com a amostra e a superfície é caracterizada pelas forças repulsivas entre os átomos da ponta e da amostra. Este modo pode manter a força aplicada pelo cantiléver constante ou a altura do cantiléver constante. No caso da força aplicada pelo cantiléver ser constante, as deflexões que este sofre quando a ponta é arrastada na superfície são corrigidas pelo ajuste de altura a que se encontra da amostra pelo sensor z. Quando é a altura a que o cantiléver se encontra da amostra que é mantida constante, ocorre deflexão do cantiléver à medida que a ponta deteta alterações na superfície.^{104,105}

O modo de não contacto é caracterizado pela inexistência de contacto entre a ponta e a amostra. A ponta oscila acima da camada superficial da amostra e à medida que a primeira se aproxima da amostra, as interações atrativas entre os átomos da ponta e da amostra provocam uma alteração detetável na frequência de oscilação do cantiléver. Esta alteração é detetada e a altura do cantiléver ajustada de forma a que a ponta permaneça sem entrar em contacto com a amostra.^{104,105}

No modo intermitente, existe um contacto da ponta com a superfície da amostra durante um curto espaço de tempo em cada ciclo de oscilação do cantiléver. A oscilação do cantiléver perto da superfície da amostra provoca uma aproximação e afastamento da ponta face à amostra e à medida que a superfície é analisada, a altura a que o cantiléver se encontra é ajustada como resposta à alteração de amplitude de oscilação. Esta alteração da posição do cantiléver é detetada e permite obter a imagem topográfica da amostra.^{104,105}

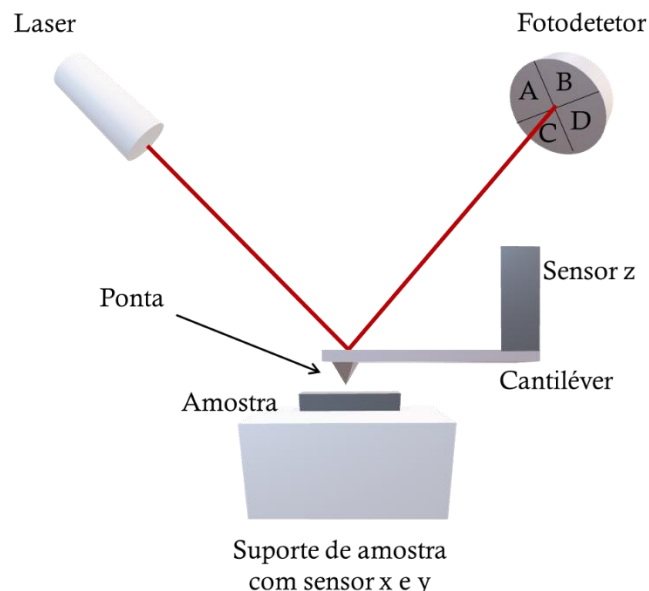


Figura 3.7 – Representação esquemática da configuração básica de um aparelho de AFM. A ponta entra em contacto com a superfície da amostra e o cantiléver sofre deflexões consoante a topografia da superfície. Estas alterações na superfície são detetadas pelo fotodetetor uma vez que as deflexões do cantiléver produzem uma alteração na posição do laser no fotodetetor. Adaptado de ¹⁰⁵

Capítulo 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos pela aplicação da metodologia apresentada na secção 2 da presente tese.

4.1 Síntese e caracterização das nanoesferas de ouro

Como referido no capítulo anterior, a síntese de AuNPs foi efetuada usando duas abordagens: a síntese direta e a síntese inversa. Ambas as abordagens são baseadas no método descrito por Turkevich^{47,48,52} alterando a ordem pela qual os reagentes (HAuCl₄ e citrato de sódio) são adicionados durante a reação. Recordando, na síntese direta o citrato de sódio é adicionado à solução de HAuCl₄ já em agitação vigorosa e refluxo enquanto que na síntese inversa é o HAuCl₄ que é adicionado a uma solução de citrato de sódio em agitação e refluxo. Na síntese direta (ou síntese normal), é observável a mudança de cor após a adição do citrato de sódio de amarelo para incolor e no final para um tom vermelho que indica a formação de nanoesferas de ouro.⁴⁷ No caso da síntese inversa, uma vez que a solução de ouro é adicionada em último, a cor amarela é quase impercetível devido à agitação vigorosa em que se encontra a solução, pelo que apenas se observa a passagem de incolor para vermelho indicando a formação de AuNPs.^{47,52}

A caracterização das AuNPs é efetuada por espectroscopia de UV/Vis usando o método descrito por Haiss *et al.*⁴⁶ Em primeiro lugar, é determinado o diâmetro usando o espectro UV/Vis a partir do qual é retirado o valor de absorvância da banda de LSPR (a cerca de 520nm) e o valor de absorvância a 450nm. O rácio destes dois valores (A_{LSPR}/A_{450}) foi o que os autores descreveram como sendo o que apresenta maior linearidade e coerência entre os resultados experimentais e teóricos para determinar o tamanho de nanopartículas de ouro esféricas com diâmetro inferior a 35nm.⁴⁶ Este rácio é aplicado à **Equação 2.1** que permite a determinação do diâmetro das AuNPs e os valores de B_1 e B_2 são substituídos por 3.00 e 2.20, respetivamente.

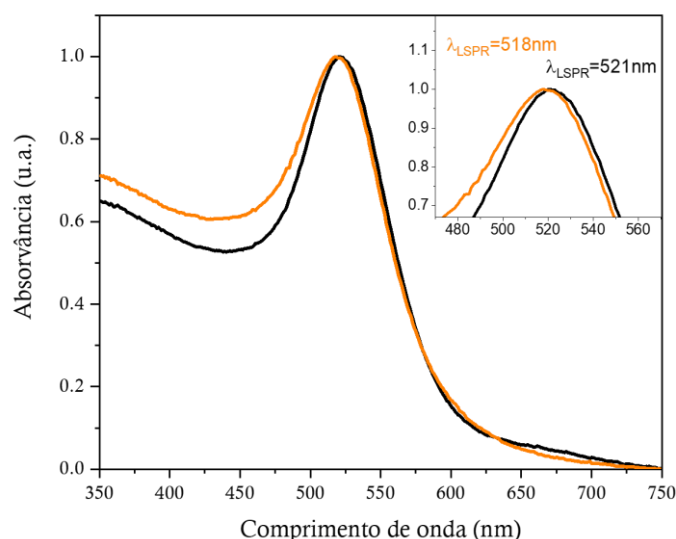


Figura 4.1 – Espectro de absorção das nanoesferas de ouro sintetizadas pelo método de Turkevich. O espectro a preto representa a síntese normal ($\lambda_{\text{LSPR}}=521\text{nm}$) e o espectro a laranja representa a síntese inversa ($\lambda_{\text{LSPR}}=518\text{nm}$).

O espectro de absorção dos dois métodos de síntese é semelhante, como pode ser observado na **Figura 4.1**, apresentando a banda de LSPR característica das nanopartículas de ouro a cerca de 520nm. Na síntese normal, a banda de LSPR apresenta o seu máximo a 521nm e na síntese inversa esta encontra-se a 518nm, uma diferença de 3nm. Esta diferença explica a diferença no diâmetro obtido em cada síntese uma vez que a síntese normal geralmente resulta num valor de 15nm de diâmetro e a síntese inversa resulta em tamanhos inferiores, rondando os 12nm. Estes valores encontram-se de acordo com os reportados na literatura. Ojea-Jiménez *et al.*⁵² reportaram que a

ordem de adição dos reagentes durante a síntese de nanopartículas afeta o seu diâmetro, tendo sido observada uma diminuição do tamanho médio e do índice de polidispersividade entre a síntese normal e a síntese inversa. Esta diferença de tamanhos foi o motivo pelo qual o protocolo de síntese foi alterado da síntese normal para a síntese inversa. A síntese de AuNPs, apesar de reprodutível, nem sempre resulta em nanopartículas com o mesmo tamanho, podendo haver variação de 1 a 2nm de diâmetro. Quando as nanopartículas obtidas possuíam tamanhos superiores a 15nm, a funcionalização destas com a molécula de interesse era comprometida. Quando se procedia à funcionalização da solução, esta agregava. Não foi detetado o motivo pelo qual isto acontecia e, quando o procedimento de síntese inversa foi usado, verificou-se que o processo de funcionalização decorria sem problemas e sem agregação da amostra. Assim, o procedimento de síntese foi alterado de síntese normal para a síntese inversa.

Uma vez obtido o diâmetro das nanopartículas, foi utilizada a **Equação 2.3** para a obtenção do coeficiente de extinção molar para o comprimento de onda de 450nm. Este coeficiente apresenta uma dependência logarítmica em relação ao tamanho da nanopartícula. Com este valor, é possível aplicar a lei de Lambert-Beer (**Equação 2.2**) que permite obter a concentração da solução de AuNPs a partir da absorvância a 450nm.

A concentração obtida na síntese normal ronda os valores de 7nM enquanto que na síntese inversa o valor é de cerca de 11nM. Em ambas as sínteses, a quantidade de HAuCl_4 é a mesma (69.2 μL a 1.445M) mas altera a quantidade de citrato de sódio adicionado, como referido anteriormente. A quantidade de citrato de sódio é uma das principais diferenças entre as duas sínteses, uma vez que esta não é a mesma nos dois casos. Na síntese normal, são adicionados 3.88×10^{-4} mol de citrato de sódio enquanto que na síntese inversa a quantidade adicionada é 1.77 vezes superior (6.87×10^{-4} mol de citrato de sódio). A oxidação do citrato em dicarboxiacetona é o primeiro passo na síntese das nanopartículas de ouro pela redução por citrato e pode ser induzido pela presença do HAuCl_4 ou por decomposição térmica.^{51,52} O facto de o citrato se encontrar em maior quantidade na síntese inversa e de já se encontrar em ebulição quando é adicionada a solução de ouro, pode contribuir para uma redução mais rápida dos átomos de ouro. Esta rápida formação de átomos de ouro pode levar à criação de mais núcleos durante a fase de nucleação, o que significa que ficam disponíveis menos átomos de ouro para o crescimento das partículas. Isto contribui para a obtenção de nanopartículas mais pequenas e também para uma maior concentração da solução final, uma vez que são obtidas mais nanopartículas.

Na síntese normal, a concentração de nanopartículas é inferior à obtida por síntese inversa, mas as nanopartículas são maiores. Tal pode dever-se a uma oxidação incompleta ou insuficiente das moléculas de citrato, conduzindo à formação de menos núcleos o que significa que existem mais átomos de ouro disponíveis para crescer os núcleos resultando numa menor concentração de nanopartículas, mas de maior tamanho.

4.2 Funcionalização das nanoesferas de ouro

As nanoesferas foram funcionalizadas com 11-MUA e 4-MBA (estruturas químicas representadas na **Figura 1.6**). Foram testados diferentes rácios molares de agentes de revestimento para nanopartícula (rácio AR: AuNP) de forma a determinar o rácio mínimo que permite uma cobertura total da nanopartícula, levando a que migre no gel. Os rácios testados foram 0, 100, 250, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 e 100000 (na **Figura 4.2** em cada um dos géis da esquerda para a direita, respetivamente) no qual o 0 corresponde ao citrato, ou seja, nanopartículas de ouro esféricas revestidas apenas com citrato.

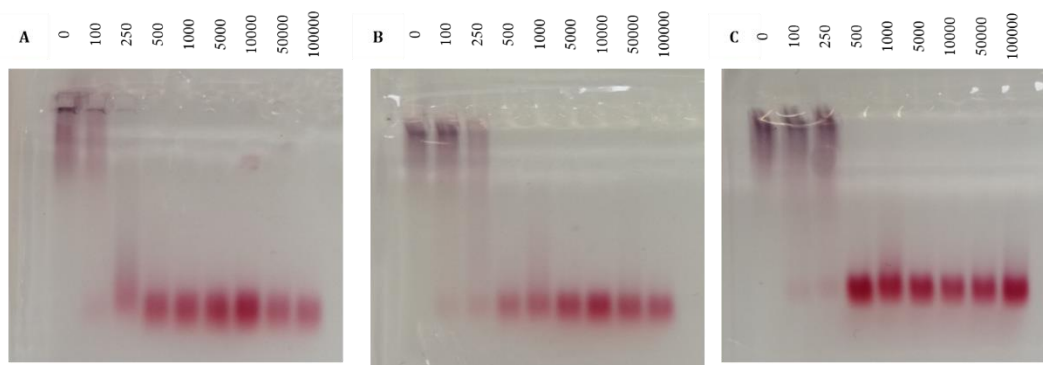


Figura 4.2 – Géis de agarose das nanoesferas de ouro funcionalizadas com diferentes misturas de agente de revestimento. A) 90% 11-MUA & 10% 4-MBA; B) 50% 11-MUA & 50% 4-MBA; C) 10% 11-MUA & 90% 4-MBA.

Como é possível observar na **Figura 4.2**, as amostras com baixos rácios de AR:AuNP agregam no poço e não migram no gel de agarose. Isto pode dever-se à natureza da ligação das moléculas que revestem a nanopartícula e a própria nanopartícula. Uma vez que o citrato tem uma ligação de fisiossorção com a nanopartícula de ouro, uma ligação fraca que se deve, principalmente, às forças de van der Waals⁵⁷, apesar de terem carga negativa, não têm estabilidade suficiente para migrar no gel. À medida que o rácio AR:AuNP aumenta, aumenta também o número de moléculas que se ligam por quimiossorção, uma interação forte entre o grupo tiól (-SH) do agente de revestimento e o ouro da nanopartícula⁵⁷. Desta forma, as nanopartículas possuem ligação mais forte e estável com a molécula que lhes confere estabilidade e carga e migram ao longo do gel. A partir do rácio molar de 500 é possível observar que as AuNPs migram no gel sem ocorrer agregação, tendo sido considerado como sendo o rácio molar mínimo para a funcionalização das nanopartículas de ouro esféricas.

De forma a garantir que todas as nanopartículas em solução estão funcionalizadas, o rácio usado foi 10 vezes superior ao rácio mínimo de funcionalização. As nanopartículas funcionalizadas com as diferentes misturas de 11-MUA e 4-MBA foram analisadas por espectroscopia de Raman de forma a observar a diferença de intensidade do sinal do 4-MBA nas várias misturas e ajudar a determinar qual a melhor para a continuação dos estudos para o desenvolvimento dos bionanoconjugados de acordo com o sinal obtido.

4.3 Espectroscopia de Raman

O espectro de Raman da molécula repórter 4-MBA utilizada neste trabalho foi obtido no estado sólido com o laser de 633nm e o espectro resultante encontra-se na **Figura 4.3**. O resultado está de acordo com os reportados na literatura.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹

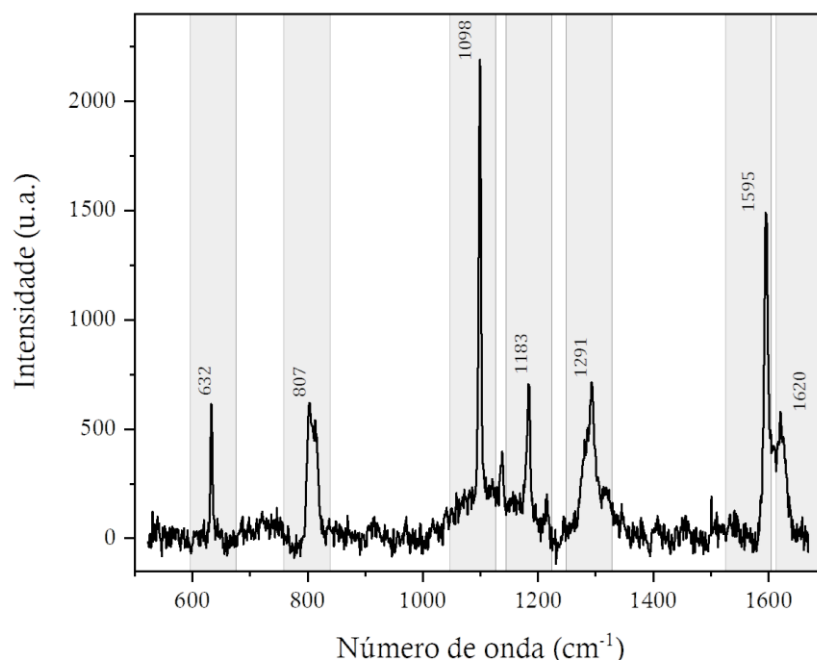


Figura 4.3 – Espectro de Raman da molécula de 4-MBA no estado sólido.

As bandas mais intensas são a cerca de 1099cm^{-1} e a cerca de 1595cm^{-1} . A primeira corresponde à vibração de alongamento da ligação CC e CS e respiração do anel aromático enquanto que a última corresponde à vibração de alongamento CC e flexão de CH no plano. A banda a cerca de 1620cm^{-1} diz respeito à vibração de alongamento C=O e as vibrações de flexão CH. As atribuições das bandas vibracionais encontram-se resumidas na **Tabela 4.1**.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Tabela 4.1 – Atribuições das bandas vibracionais.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Bandas vibracionais (cm ⁻¹)	Atribuições
630	Alongamento CCC no anel aromático
802	Flexão CC fora do plano
813	Flexão COOH
1098	Vibração simétrica de CC e CS, respiração do anel aromático
1137	Flexão CH
1183	Flexão CS, alongamento CC
1291	Flexão CH
1318	Flexão OH, alongamento C-benzeno, alongamento CC
1595	Alongamento CC, flexão CH no plano
1620	Alongamento C=O

As duas bandas mais intensas ($\sim 1098\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1595\text{ cm}^{-1}$), serão utilizadas na análise dos espectros de SERS apresentados nas secções seguintes, uma vez que as restantes bandas têm uma intensidade menor e em alguns casos não são observáveis.

4.3.1 SERS de AuNPs

As nanopartículas funcionalizadas com as diferentes misturas de 11-MUA e 4-MBA foram analisadas por espectroscopia de Raman para verificar a existência das bandas características do 4-MBA. A concentração de nanopartículas usada foi de cerca de 15nM. Os espectros obtidos estão representados na **Figura 4.4** e são referentes ao SERS das nanopartículas não funcionalizadas (apenas estabilizadas por citrato, AuNPs@citrato) e às funcionalizações com as percentagens referidas na secção 4.2. Para além das misturas dos agentes de revestimento, foram funcionalizadas nanopartículas apenas com 4-MBA.

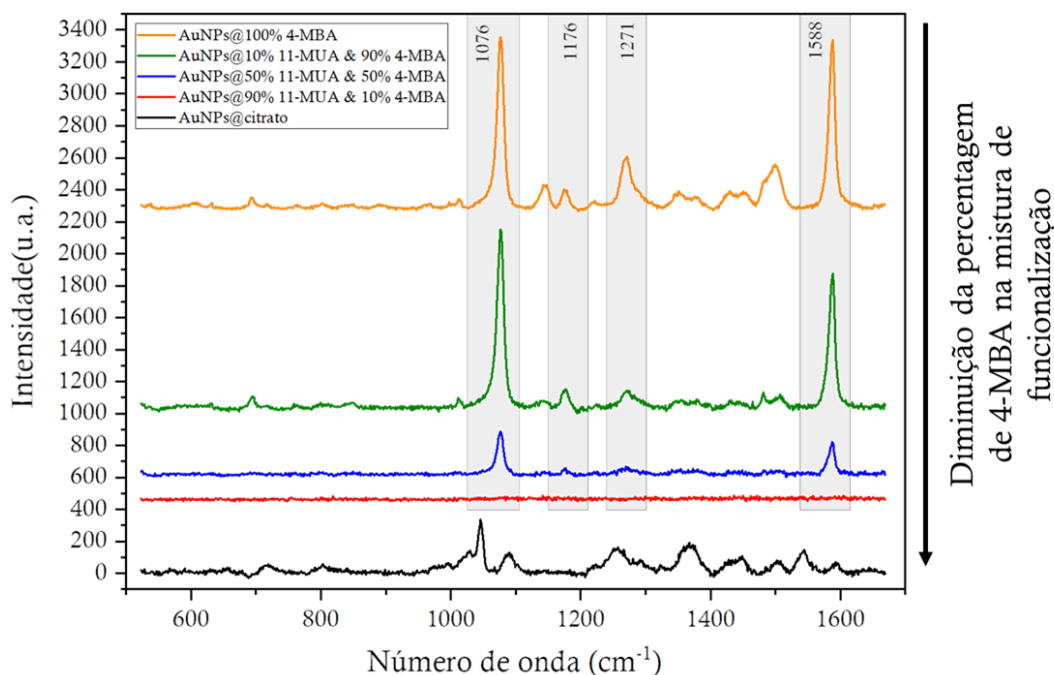


Figura 4.4 – Espectro de SERS das nanopartículas de ouro funcionalizadas com diferentes misturas de 11-MUA e 4-MBA. A preto está representado o espectro referente as AuNPs não funcionalizadas (AuNPs@citrato), a vermelho está o espectro das AuNPs@90% 11-MUA & 10% 4-MBA, a azul o espectro das AuNPs@50% 11-MUA & 50% 4-MBA, a verde o espectro das AuNPs@10% 11-MUA & 90% 4-MBA e a laranja o espectro das AuNPs@4-MBA.

Como era esperado, o espectro correspondente a 100% de 4-MBA é o que apresenta maior intensidade. As bandas mais intensas apresentadas no espectro de SERS das nanopartículas funcionalizadas com as diferentes misturas de 11-MUA e 4-MBA dizem respeito às bandas de 4-MBA 1076 cm^{-1} e a 1588 cm^{-1} , sendo que as bandas a 1176 cm^{-1} e a 1271 cm^{-1} também são conservadas. Em relação ao espectro de Raman da molécula de 4-MBA, há um ligeiro desvio da posição das bandas, estando as mesmas localizadas, no caso das bandas mais intensas a 1099 cm^{-1} e 1595 cm^{-1} e, no caso das outras duas bandas conservadas a 1183 cm^{-1} e 1293 cm^{-1} , respetivamente. Este desvio está reportado na literatura como sendo causado pela adsorção da molécula à superfície da nanopartícula.¹¹⁰⁻¹¹² É observado que a diminuição da percentagem de 4-MBA na mistura de funcionalização conduz à diminuição da intensidade das bandas a 1076 cm^{-1} e 1588 cm^{-1} e ao desaparecimento das bandas de menor intensidade a 1176 cm^{-1} e 1271 cm^{-1} .

As nanopartículas de ouro não possuem sinal em Raman, podendo as bandas observadas no espectro a preto na **Figura 4.4** serem referentes à molécula de citrato que possui sinal em Raman de acordo com o reportado na literatura.¹¹²⁻¹¹⁵

Não foi determinado o fator de aumento de sinal do 4-MBA proporcionado pelas nanopartículas de ouro, uma vez que não é possível determinar efetivamente qual o número de moléculas de 4-MBA que se encontram efetivamente ligadas à superfície da nanopartícula. Mesmo usando o valor de concentração do 4-MBA que foi adicionado às nanopartículas, depois dos vários passos de lavagem pelos quais passa a amostra o valor vai variar, pelo que poderemos estar a incorrer num erro com uma elevada ordem de grandeza ao assumir que todas as moléculas se encontram ligadas.

Para a formação dos bionanoconjugados foi escolhida a funcionalização apenas com o 4-MBA como agente de revestimento. Desta forma, obtemos o melhor sinal em Raman o que pode ser uma vantagem em amostras de baixa concentração.

4.4 Bionanoconjugados

Os bionanoconjugados foram preparados por interação electrostática e por ligação covalente. Em ambos os casos, as nanopartículas foram funcionalizadas com um rácio de 5000 moléculas de 4-MBA para uma nanopartícula a uma concentração de 1.5nM em volume suficiente para que fosse dividido por amostras de 500 μ L para a conjugação com os diferentes rácios.

A funcionalização das nanopartículas foi verificada por espectroscopia de UV-Vis tendo sido observado um ligeiro desvio da banda de LSPR para comprimentos de onda superiores (desvio batocrómico ou *red-shift*), como se verifica na **Figura 4.5**. A alteração da molécula que reveste ou estabiliza a nanopartícula provoca a alteração da constante dielétrica do meio e leva ao desvio da banda de LSPR.⁴¹ Na **Figura 4.5** estão representados o espectro das AuNPs estabilizadas com citrato a preto e o espectro das AuNPs funcionalizadas com 4-MBA a vermelho. Neste caso, as AuNPs@citrato têm a banda de LSPR localizada a 518nm enquanto que a banda de LSPR das AuNPs@4-MBA está localizada a 522nm, correspondendo a um desvio de 4nm.

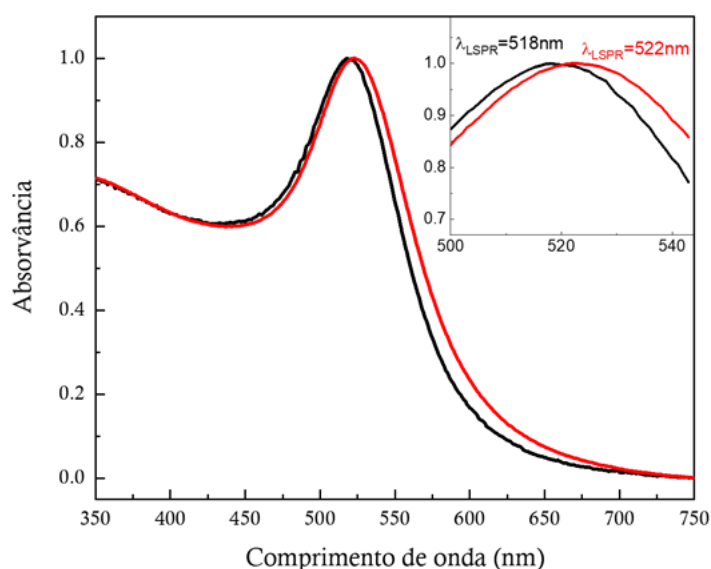


Figura 4.5 – Espectro de absorção de verificação de funcionalização das nanopartículas. O espectro das nanopartículas estabilizadas por citrato (AuNPs@citrato) está representado a preto com a banda de LSPR a 518nm e o espectro das nanopartículas funcionalizadas com 4-MBA (AuNPs@4-MBA) está representado a vermelho com a banda de LSPR a 522nm.

4.4.1 Conjugação dos anticorpos com as nanoesferas de ouro por interação electrostática

A ligação electrostática da nanopartícula ao anticorpo ocorre entre o grupo COOH do 4-MBA e os grupos NH₂ dos aminoácidos do anticorpo. Esta é uma interação fraca que envolve

apenas as cargas das moléculas, pelo que pode comprometer a estabilidade do bionanoconjugado ao longo do tempo para as aplicações a que se destina.

Como referido anteriormente, foram preparadas amostras de 500 μ L de AuNPs@4-MBA às quais foi adicionado o volume necessário de anticorpo para que fossem preparados os bionanoconjugados com diferentes rácios de anticorpo entre 0 e 2150. Tal como para a verificação de funcionalização, foram efetuados os espectros de absorção de nanopartículas estabilizadas por citrato, nanopartículas funcionalizadas com 4-MBA e os bionanoconjugados com Anti-HRP com o rácio mais elevado. Na **Figura 4.6** encontra-se representados esses espectros a preto, vermelho e azul, respetivamente.

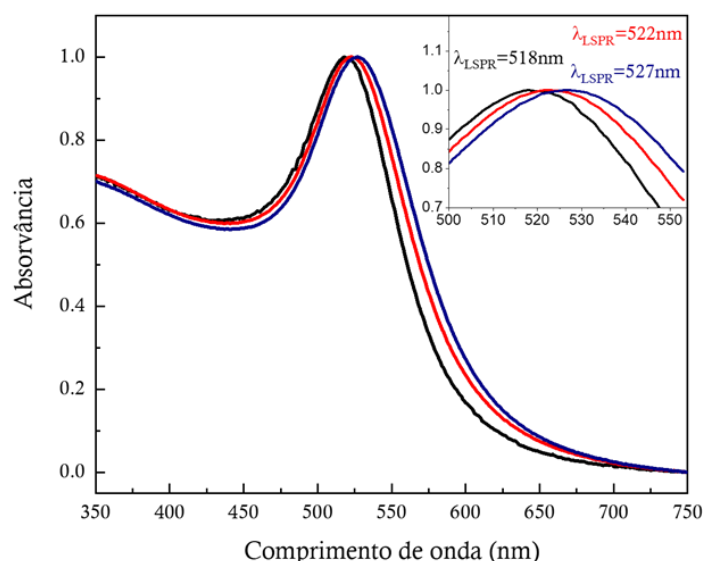


Figura 4.6 – Espectro de absorção das nanopartículas antes e depois da funcionalização e conjugação com Anti-HRP. O espectro das AuNPs@citrato está representado a preto com a banda de LSPR localizada a 518nm, o espectro das AuNPs@4-MBA está representado a vermelho com a banda de LSPR localizada a 522nm e a azul encontra-se o espectro das AuNPs@4-MBA@Anti-HRP com a banda de LSPR localizada a 527nm.

A banda de LSPR dos bionanoconjugados está localizada a 527nm, o que representa um desvio de 5nm em relação à banda de LSPR das AuNPs@4-MBA. Este desvio, tal como na verificação de funcionalização, indica que houve uma alteração da constante dielétrica do meio e confirma a ligação de uma molécula que não se encontrava anteriormente adsorvida à nanopartícula. Com isto em mente, foi efetuada a eletroforese em gel de agarose dos bionanoconjugados com os rácios 0, 7, 12, 50, 90, 200, 410, 880, 1030, 1150, 1485, 1750 e 2150. A imagem do gel resultante encontra-se na **Figura 4.7**.

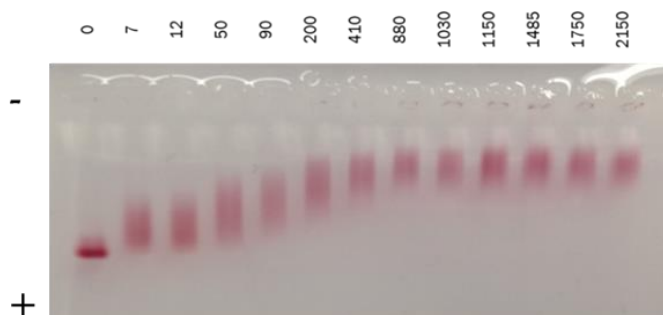


Figura 4.7 – Gel de agarose resultante da eletroforese dos bionanoconjugados preparados por interação electrostática das AuNPs@4-MBA com Anti-HRP. O primeiro poço corresponde ao rácio 0, onde apenas

há AuNPs@4-MBA e não foi adicionado anticorpo. Os rácios aumentam no sentido da esquerda para a direita da imagem e aumenta também a quantidade de anticorpo em solução.

As nanoprticulas funcionalizadas sem conjugo com o anticorpo apresentam maior mobilidade no gel, migrando mais que as restantes amostras.  medida que o rácio de anticorpo para nanoprticula aumenta, a mobilidade diminui o que faz com que os bionanoconjugados migrem menos.

A eletroforese efetuada tem o objetivo de determinar o rácio de anticorpo mínimo necessário para atingir a cobertura total da nanoprticula. Isto é determinado pela análise da imagem presente na **Figura 4.7** pelo programa *eReuss*, desenvolvido pelo professor Ludwig Kripphal. O *eReuss* calcula a distância percorrida por cada amostra desde o local onde é depositada a amostra (poço do gel) até ao ponto em que termina a corrida no gel. Com estes valores, são aplicadas as equações 3.3, 3.4 e 3.5 que permitem o cálculo da mobilidade eletroforética em $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$. Os valores são normalizados entre 0 e 1 de forma a ser possível obter o gráfico de mobilidade eletroforética normalizada em função dos rácios de anticorpo para AuNP. O gráfico em questão encontra-se representado na **Figura 4.8**.

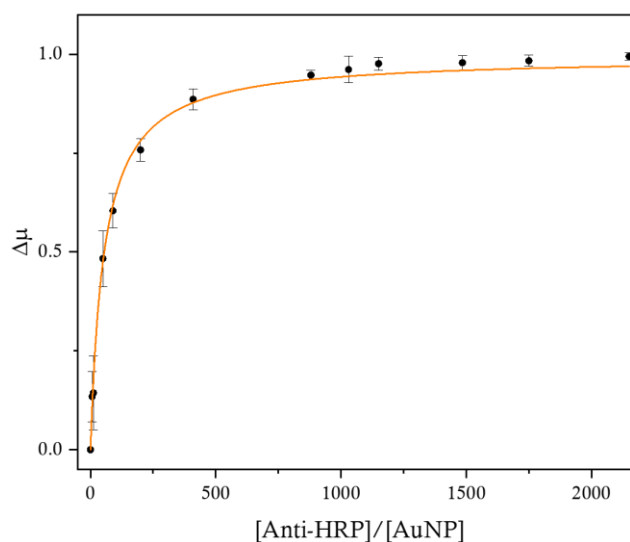


Figura 4.8 – Gráfico da mobilidade eletroforética normalizada para o valor de migração das AuNPs@4-MBA em função do rácio de Anti-HRP para AuNP. Os pontos representam o valor médio das distâncias que cada amostra percorre no gel de 3 ensaios efetuados nas mesmas condioes, com as respectivas barras de erro a representar o desvio padrão. A linha a laranja representa o ajuste dos dados experimentais  equação de *Langmuir*.

No gráfico representado na **Figura 4.8** estão apresentados os resultados da mobilidade eletroforética normalizada para cada rácio de anticorpo para AuNP, com o desvio padrão resultante dos ensaios em triplicado representados pelas respectivas barras de erro. A linha laranja representa o ajuste dos dados experimentais  equação de *Langmuir*. Esta provm da equação de Hill que descreve a capacidade de um ligando se ligar cooperativamente a um recetor (como por exemplo a nanoprticula), estando a afinidade da ligação relacionada com a concentração de ligando em solução.

Tanto na **Figura 4.7** como na **Figura 4.8**,  possível observar que perto do rácio 880 não há alteraoes significativas na mobilidade do bionanoconjugado sendo atingido um patamar. O início do patamar permite saber qual o rácio mínimo para que se obtenha uma completa cobertura da nanoprticula por moléculas de anticorpo. Desta forma, os bionanoconjugados obtidos por interação electroestática devem ser preparados com um rácio de cerca de 1000 anticorpos por cada nanoprticula de forma a garantir a cobertura total de todas as nanoprticulas presentes na amostra.

4.4.2 Conjugação dos anticorpos com as nanoesferas de ouro por ligação covalente

Após a determinação do rácio a utilizar no caso dos bionanoconjugados preparados por interação electrostática, foi explorada a viabilidade de existir uma ligação covalente entre o grupo carboxílico do 4-MBA (-COOH) que se encontra à superfície da nanopartícula e os grupos amina presentes nos aminoácidos dos anticorpos (-NH₂).

Os agentes de reticulação EDC e Sulfo-NHS que foram usados para promover a ligação covalente são também chamados de *zero length crosslinkers*, uma vez que promovem a ligação direta entre as duas moléculas de interesse sem que façam parte do complexo final formado. A ordem de adição e concentração do EDC e do Sulfo-NHS e o tempo que reagem com as nanopartículas é importante, visto que os intermediários formados são instáveis e podem induzir agregação da amostra. A ligação covalente pode ser alcançada apenas usando o EDC como agente de reticulação que irá ativar o grupo carboxílico, mas o intermediário que resulta da reação entre o grupo -COOH e EDC é instável em meio aquoso podendo sofrer hidrólise. Desta forma, é adicionado o Sulfo-NHS que estabiliza o intermediário formado e, após adição do anticorpo, é formada a ligação covalente entre o 4-MBA presente na superfície da nanopartícula e o anticorpo.¹¹⁶

O procedimento de conjugação aplicado inicialmente foi baseado no protocolo descrito por Bartczak *et al*¹¹⁶, onde os autores usam a eletroforese em gel de agarose de forma a comprovar a existência da ligação covalente entre a nanopartícula e o péptido em estudo.¹¹⁶ Foram estudadas diferentes concentrações de EDC e Sulfo-NHS mantendo constante o rácio de anti-HRP para AuNP (17:1) de forma a determinar a concentração ideal para a formação dos bionanoconjugados. As concentrações testadas variaram entre 10 e 0.001mM para o EDC e entre 20 e 0.002mM para o Sulfo-NHS, de acordo com a **Tabela 4.2**. As amostras controlo são AuNPs@4-MBA sem adição de EDC, Sulfo-NHS ou anticorpo (amostra 1), interação electrostática entre AuNP@4-MBA@Anti-HRP (amostra 2) e AuNPs@4-MBA@EDC/Sulfo-NHS sem anticorpo (amostra 3).

Tabela 4.2 – Concentração de EDC e Sulfo-NHS e rácio de anticorpo para nanopartícula usados em cada amostra.

Amostra	C _{EDC} (mM)	C _{Sulfo-NHS} (mM)	Rácio Anti-HRP/AuNP
1	0	0	0
2	0	0	17
3	1	2	0
4	10	20	17
5	5	10	17
6	1	2	17
7	0.2	0.4	17
8	0.1	0.2	17
9	0.01	0.02	17
10	0.001	0.002	17

Ao preparar as amostras, foi observado que as amostras com concentrações de EDC e Sulfo-NHS mais elevadas (entre 10 e 0.1mM e entre 20 e 0.2mM, respetivamente) sofriam agregação, como pode ser verificado visualmente na **Figura 4.9A**. As amostras não foram

analisadas por eletroforese em gel de agarose uma vez que a sua agregação impossibilita a análise por esta técnica. Em vez disso, foi traçado o espectro de absorção de cada amostra que se encontra representado na **Figura 4.9B**. As amostras estão identificadas no gráfico com o número da amostra ao lado de cada espectro correspondente. No caso dos espectros que estão próximos e não permite a sua identificação isolada, estão numeradas de acordo com a intensidade que apresentam (exemplo, a amostra 5 apresenta maior intensidade que a banda 3, 4 e 6).

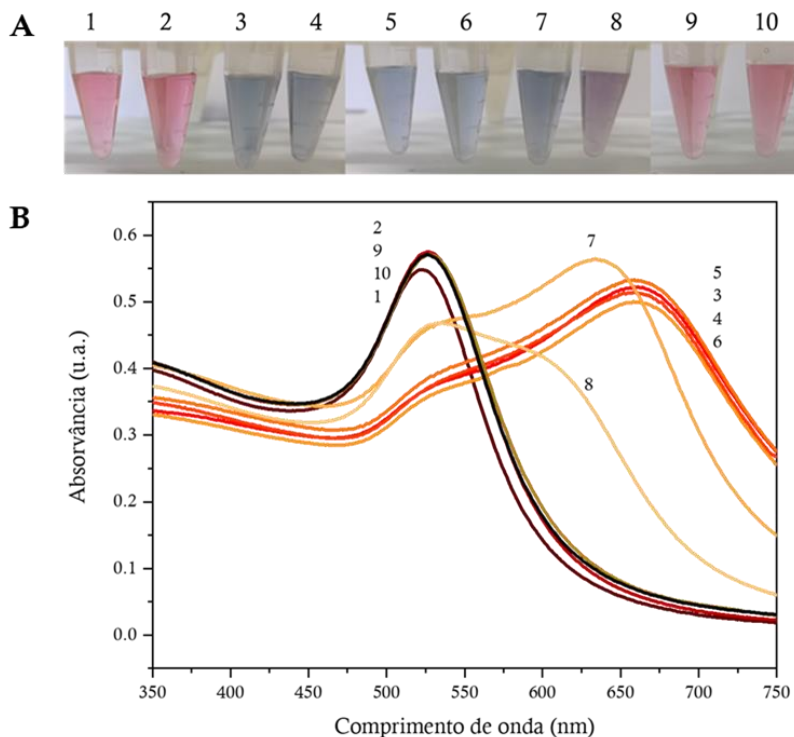


Figura 4.9 – Amostras de AuNPs após a adição de EDC, Sulfo-NHS e anti-HRP segundo a Tabela 4.2 (A) e os espectros de absorção das respetivas amostras. É possível detetar visualmente a agregação das amostras com concentrações de EDC e Sulfo-NHS mais elevadas e também por espectroscopia UV/Vis com o desvio da banda de LSPR das AuNPs para comprimentos de onda superiores (*red-shift*). Os números no gráfico dos espectros de absorção identificam a amostra a que se refere.

No espectro de absorção das amostras, é possível verificar um desvio do máximo da banda de LSPR das AuNPs para comprimentos de onda superiores. Tal como verificado visualmente, ocorre agregação de algumas das amostras preparadas. As amostras 9 e 10 são as que possuem as duas menores concentrações de EDC e Sulfo-NHS testadas e verifica-se que não sofreram agregação pois a banda de LSPR permanece localizada a cerca de 520nm. Desta forma, foram repetidas essas mesmas amostras tal como os controlos, como se indica na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3 – Concentração de EDC e Sulfo-NHS e rácio de anticorpo para nanopartícula usados em cada amostra.

Amostra	C _{EDC} (mM)	C _{Sulfo-NHS} (mM)	Rácio Anti-HRP/AuNP
A	0	0	0
B	0	0	17
C	0.01	0.02	17
D	0.001	0.002	17
E	0.01	0.02	0

As amostras preparadas com base na tabela referida anteriormente deram origem ao gel de agarose observado na **Figura 4.10**.

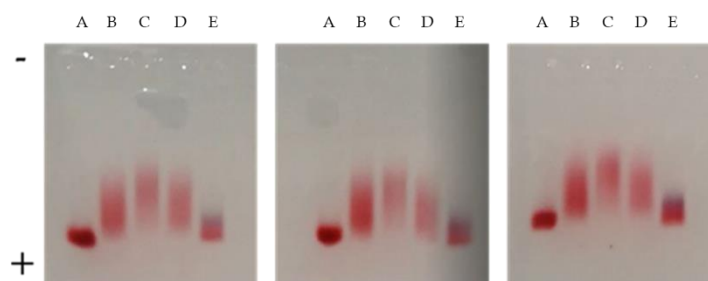


Figura 4.10 – Eletroforese em gel de agarose das amostras de bionanoconjugados preparados por ligação covalente do anticorpo com recurso ao uso dos agentes reticulantes EDC e Sulfo-NHS. São apresentados os géis resultantes dos triplicados efetuados para demonstrar que o método utilizado é reprodutível.

Por análise dos géis de agarose obtidos, é possível observar que a distância percorrida pelas AuNPs@4-MBA (amostra A) é semelhante à distância percorrida pelas AuNPs@4-MBA@EDC/Sulfo-NHS (amostra E), confirmando experimentalmente que se tratam de agentes de reticulação de tamanho zero e que não afetam o tamanho ou carga superficial da nanopartícula. A amostra 3 é a que mais se destaca pela menor migração que apresenta no gel. Segundo o que se encontra reportado na literatura, o facto de a amostra migrar menos no gel em relação às restantes amostras confirma a existência de uma ligação covalente entre o grupo carboxílico do 4-MBA e o anticorpo.¹¹⁶ Não existe no entanto literatura disponível que explique a razão pela qual a migração é menor.

Estando encontradas as concentrações de EDC e de Sulfo-NHS que permitem a ligação covalente (0.01mM e 0.02mM, respetivamente), os estudos prosseguiram no sentido de avaliar a possibilidade de aumentar o número de anticorpos ligados à nanopartícula por este método. Foram preparadas várias amostras nas quais foram mantidas constantes as concentrações de EDC e de Sulfo-NHS, variando apenas a concentração de Anti-HRP. De forma a comparar se a migração é efetivamente menor quando em comparação com a interação electrostática, foram preparadas amostras por interação electrostática e amostras por ligação covalente (representadas no gel da **Figura 4.11** com um asterisco (*)). Os rácios usados nos dois tipos de conjugação foram iguais e variaram entre 0 e 2000, como pode ser observado no topo da figura

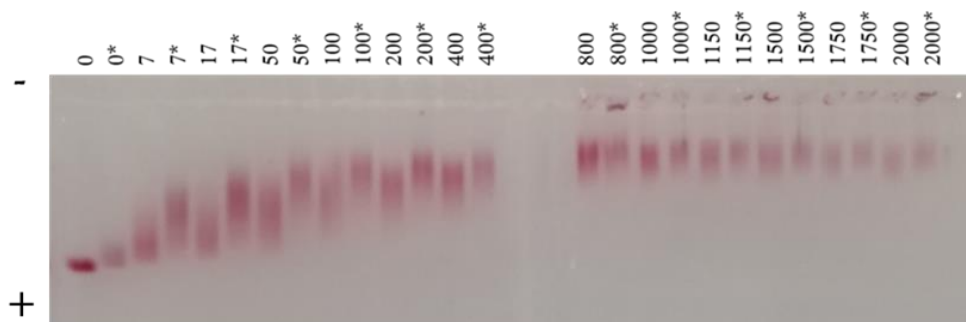


Figura 4.11 – Eletroforese em gel de agarose dos bionanoconjugados preparados por interação electroestática e dos bionanoconjugados preparados por ligação covalente. As amostras que dizem respeito aos bionanoconjugados por ligação covalente estão assinalados com um asterisco (*).

É observado o mesmo comportamento do gel apresentado na **Figura 4.10** em que os bionanoconjugados nos quais foi promovida a ligação covalente apresentam uma menor migração quando comparados com os bionanoconjugados do mesmo rácio preparados por interação electroestática. Foi igualmente usado o programa *eReuss* para calcular as distâncias percorridas pelas amostras, mas, em vez de determinar o rácio a que se atinge o patamar, foi construído o gráfico apresentado na **Figura 4.12**. Neste é possível observar de forma mais clara as diferenças nas migrações e verifica-se que independentemente do rácio de anticorpo para nanopartícula, o comportamento que confirma a ligação covalente mantém-se.

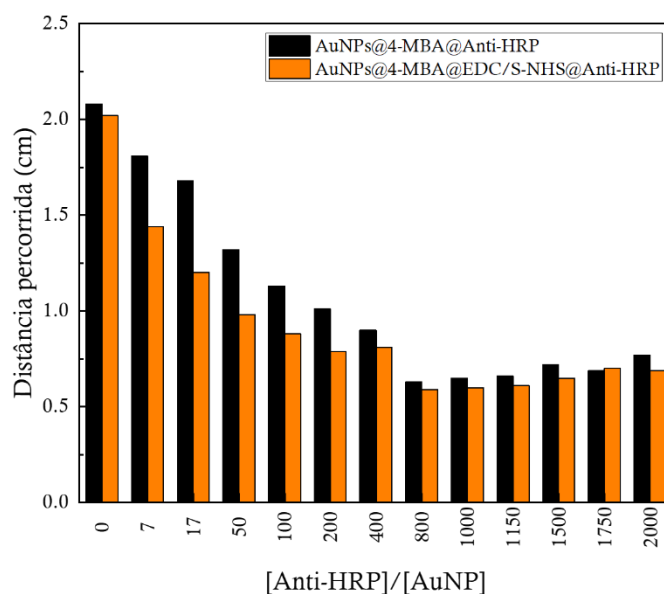


Figura 4.12 – Distância percorrida pelos bionanoconjugados preparados por interação electroestática (colunas a preto) e pelos bionanoconjugados preparados com ligação covalente (colunas a laranja). A tendência de menor migração dos bionanoconjugados cuja conjugação foi promovida pelos agentes reticulantes EDC e Sulfo-NHS verifica-se nos diferentes rácios de Anti-HRP/AuNP testados.

Uma vez confirmado que a ligação covalente era possível a qualquer um dos rácios de anticorpo anteriormente analisados, foram preparados bionanoconjugados com os valores destes rácios a variar entre 0 e 1000 para determinação do valor mínimo a que é atingida a cobertura total da nanopartícula. Foi escolhido como rácio máximo de 1000 uma vez que pela observação e análise da **Figura 4.11**, após este valor a migração dos bionanoconjugados não sofre alterações significativas. O gel resultante da eletroforese pode ser observado na **Figura 4.13**.

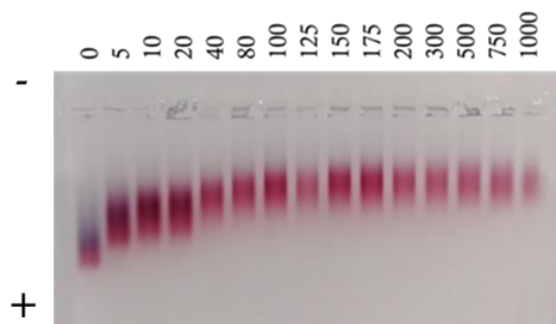


Figura 4.13 – Eletroforese em gel de agarose dos bionanoconjugados preparados por ligação covalente.

Tal como para os bionanoconjugados por interação electrostática, a imagem do gel resultante da eletroforese em gel de agarose foi analisado no programa *eReuss* e calculadas as distâncias percorridas por cada amostra. Foi calculada a mobilidade eletroforética de cada amostra em $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ e os valores normalizados entre 0 e 1. No gráfico representado na **Figura 4.14** estão apresentados os resultados da mobilidade eletroforética normalizada para cada rácio de anticorpo estudado, com o desvio padrão resultante dos ensaios em triplicado representados pelas respetivas barras de erro. A linha laranja representa o ajuste dos dados experimentais à equação de *Langmuir*.

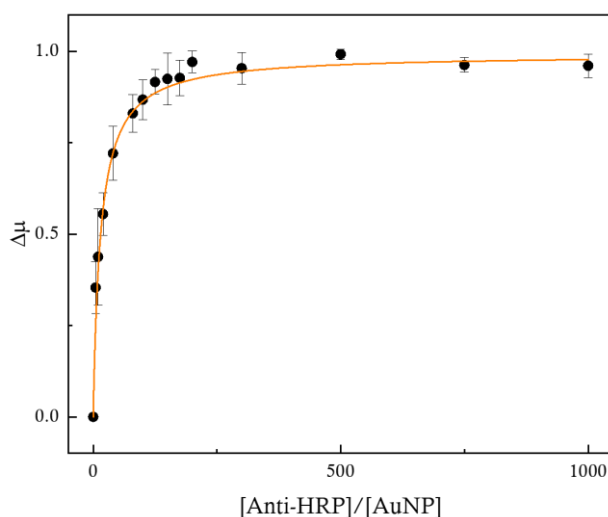


Figura 4.14 – Gráfico da mobilidade eletroforética normalizada para o valor de migração dos bionanoconjugados preparados por ligação covalente. Os pontos representam o valor médio das distâncias que cada amostra percorre no gel de 3 ensaios efetuados nas mesmas condições, com as respetivas barras de erro a representar o desvio padrão. A linha a laranja representa o ajuste dos dados experimentais à equação de *Langmuir*.

Tanto na **Figura 4.13** como na **Figura 4.14** é possível observar que perto do rácio 125 não há alterações significativas na mobilidade do bionanoconjugado sendo atingido um patamar. Desta forma, os bionanoconjugados obtidos por interação electrostática devem ser preparados com um rácio de cerca de 150 ou 175 anticorpos por cada nanopartícula de forma a garantir a cobertura total de todas as nanopartículas presentes na amostra.

Depois de preparados os bionanoconjugados, foram efetuados os ensaios enzimáticos de forma a determinar a capacidade de estes se ligarem a enzima específica do anticorpo usado e a sua atividade.

4.5 Ensaio enzimático

Os bionanoconjugados foram preparados com o anticorpo anti-HRP que é específico para a enzima HRP (peroxidase de rábano) que catalisa a oxidação do ABTS pelo H_2O_2 . Esta reação é monitorizada por espectroscopia de UV/Vis, acompanhando a absorvância a 405nm.

4.5.1 Enzima livre

Inicialmente, foram efetuados os ensaios enzimáticos de uma solução de HRP, como descrito no protocolo da *Sigma-Aldrich*⁹⁰ de forma a ser estudado o comportamento da enzima. Como descrito na secção 2.6.1, foram efetuados ensaios sem HRP (ensaio branco) e com HRP (ensaio teste). No ensaio branco, a 1mL de ABTS são adicionados 17 μ L de reagente D e 34 μ L de H_2O_2 . Desta solução, são retirados 100 μ L que são adicionados a 900 μ L de reagente A numa célula de quartzo e a absorvância a 405nm é registada durante 16 minutos em intervalos de 30 segundos. Para o ensaio de teste, a 1mL de ABTS são adicionados 17 μ L de HRP a 3.42×10^{-3} mg/mL e 34 μ L de H_2O_2 . São igualmente retirados 100 μ L da mistura reacional e são adicionados a 900 μ L de reagente A numa célula de quartzo. A absorvância a 405nm é registada durante 8 minutos em intervalos de 30 segundos.

Após obtidos os dados, foram representados em gráficos de dispersão aos quais foi feito o ajuste linear dos dados recolhidos. Os gráficos dos resultados obtidos no ensaio branco e no ensaio teste encontram-se representados na **Figura 4.15A e B**, respetivamente. Os ajustes lineares estão representados pela linha laranja e as respetivas equações encontram-se apresentadas no gráfico.

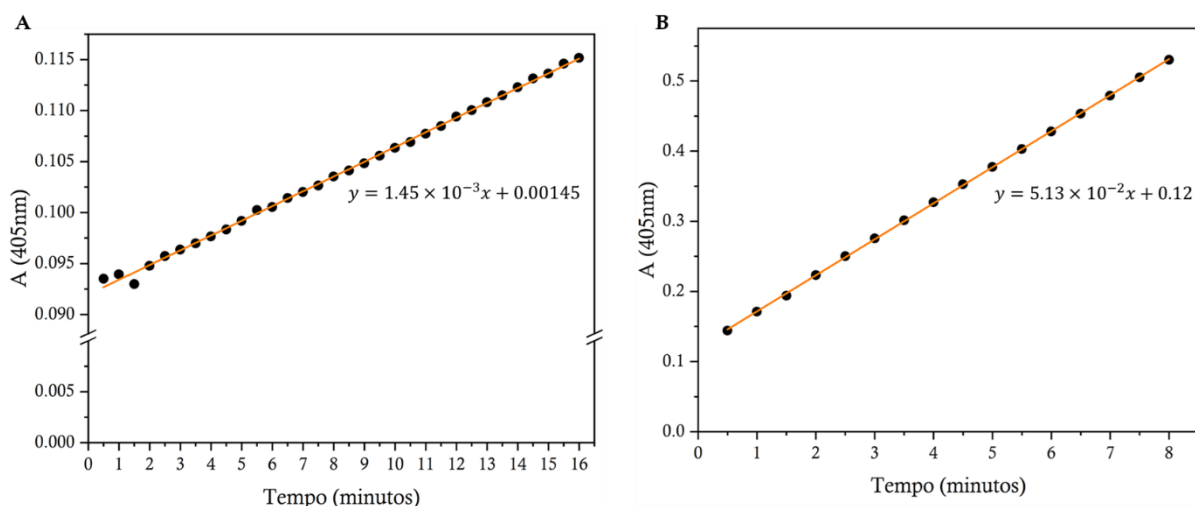


Figura 4.15 – Representação gráfica dos resultados do ensaio branco (A) e do ensaio teste (B) do ensaio enzimático com enzima livre. O ajuste linear está representado em cada gráfico pela linha laranja, tal como a respetiva equação.

Os ajustes lineares permitem obter a variação de absorvância a 405nm (ΔA_{405nm}) de cada ensaio pelo valor do declive da reta obtida. O valor de ΔA_{405nm} obtido para o ensaio branco é de 1.45×10^{-3} e para o ensaio teste é de 5.13×10^{-2} . Com estes valores e tendo em conta o valor do coeficiente de extinção molar de $36.8 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, é usada a **Equação 2.6** para o cálculo do número de unidades por mL de enzima. A média dos 3 ensaios efetuados foi de 42.03 ± 1.10 unidades/mL de enzima.

4.5.2 Bionanoconjugados

O ensaio enzimático foi usado para confirmar a ligação do anticorpo à superfície da nanopartícula. Os ensaios foram efetuados apenas para os bionanoconjugados preparados por ligação covalente e para o rácio anti-HRP para AuNP de 17:1. Antes de ser adicionada a enzima, foi necessário incubar com uma solução de BSA para bloquear a superfície da nanopartícula. O bloqueamento com BSA foi necessário para evitar a interação não específica da enzima com a

superfície da nanopartícula, o que poderia levar à obtenção de valores de atividade enzimática superior à correspondente para os anticorpos que se encontram à superfície da nanopartícula.

Depois da incubação dos bionanoconjugados com a BSA para bloqueamento da superfície da nanopartícula, estes foram incubados com HRP. O rácio de conjugação com a HRP foi de 17 moléculas de HRP para uma nanopartícula, o mesmo que foi usado para os anticorpos na preparação dos bionanoconjugados. Tal como para o ensaio enzimático de enzima livre, foram efetuados ensaios branco e ensaios teste. No ensaio branco, a 1mL de ABTS são adicionados 17 μ L de bionanoconjugados sem HRP e 34 μ L de H₂O₂. Desta solução, são retirados 100 μ L que são adicionados a 900 μ L de reagente A numa célula de quartzo e a absorvância a 405nm é registada durante 16 minutos em intervalos de 30 segundos. Para o ensaio de teste, a 1mL de ABTS são adicionados 17 μ L de bionanoconjugados com HRP e 34 μ L de H₂O₂. São igualmente retirados 100 μ L da mistura reacional e são adicionados a 900 μ L de reagente A numa célula de quartzo. A absorvância a 405nm é registada durante 8 minutos em intervalos de 30 segundos.

Após obtidos os dados, foram representados em gráficos de dispersão aos quais foi feito o ajuste linear dos dados recolhidos. Os gráficos dos resultados obtidos no ensaio branco e no ensaio teste encontram-se representados na **Figura 4.16A** e **B**, respetivamente. Os ajustes lineares estão representados pela linha laranja e as respetivas equações encontram-se apresentadas no gráfico.

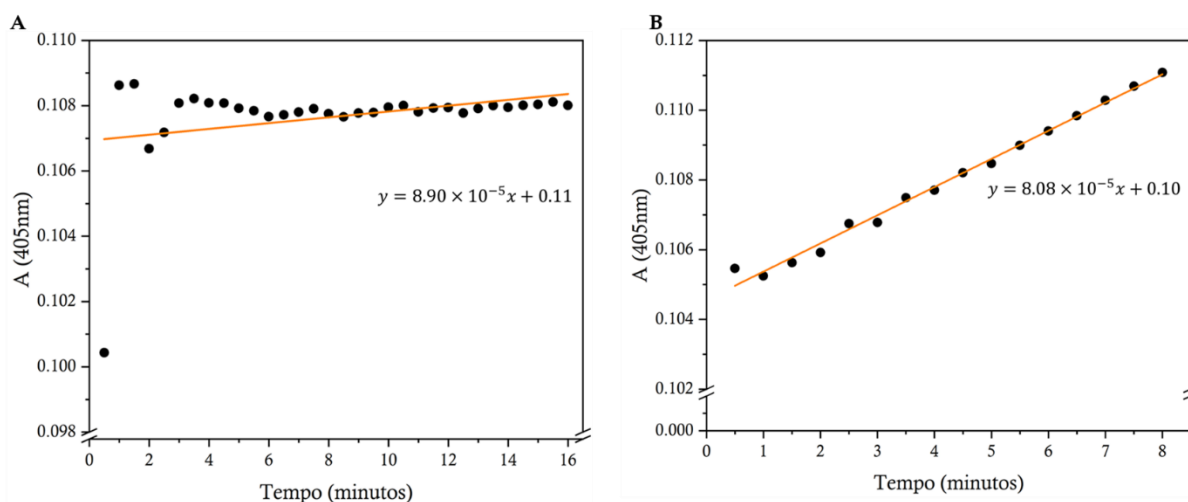


Figura 4.16 – Representação gráfica dos resultados do ensaio branco (A) e do ensaio teste (B) do ensaio enzimático com HRP conjugada com os bionanoconjugados. O ajuste linear está representado em cada gráfico pela linha laranja, tal como a respetiva equação.

Os ajustes lineares permitem obter a variação de absorvância a 405nm (ΔA_{405nm}) de cada ensaio pelo valor do declive da reta obtida. O valor de ΔA_{405nm} obtido para o ensaio branco é de 8.90×10^{-5} e para o ensaio teste é de 8.08×10^{-5} . Com estes valores e tendo em conta o valor do coeficiente de extinção molar de $36.8 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, é usada a **Equação 2.6** para o cálculo do número de unidades por mL de enzima. A média dos 10 ensaios efetuados foi de 0.49 ± 0.27 unidades/mL de enzima.

O valor de unidades/mL de enzima obtido para os bionanoconjugados é muito reduzido, sendo de apenas 0.49 unidades/mL de enzima, com um erro associado elevado, de cerca de metade do valor médio actividade obtido. Apesar de ser um valor baixo em relação ao obtido para enzima livre, é verificado que existe atividade por parte da enzima, o que permite concluir que a HRP está presente em solução por interação com os anticorpos.

São vários os fatores que podem contribuir para este resultado como a concentração de enzima HRP usada. No caso dos ensaios com enzima livre, a concentração de enzima que reage é de $3.42 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$ enquanto que nos bionanoconjugados, a concentração estimada de HRP que se encontra na amostra de bionanoconjugados e que será testada é de $1.12 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$, cerca de 3

vezes inferior. O rácio de anticorpo usado (17:1) é igualmente baixo, o que significa que haverá menos HRP ligada ao anticorpo e a catalisar a reação.

De forma a aumentar a eficácia dos bionanoconjugados, deve ser considerado o aumento do rácio de anticorpo por nanopartícula para valores de cerca de 100 como sugerido na secção 4.4.2. De forma a diminuir o erro associado às medições, pode ser considerado o uso de uma concentração de bionanoconjugados superior de forma a aumentar o número de bionanoconjugados com HRP presente em solução.

4.6 SERS de Bionanoconjugados

Após todos os passos de conjugação e verificação que os bionanoconjugados preparados possuem atividade enzimática e, consequentemente, anticorpos capazes de ligar a molécula de interesse, é necessário verificar que possuem sinal em Raman. Os espectros de SERS obtidos estão representados na **Figura 4.17**.

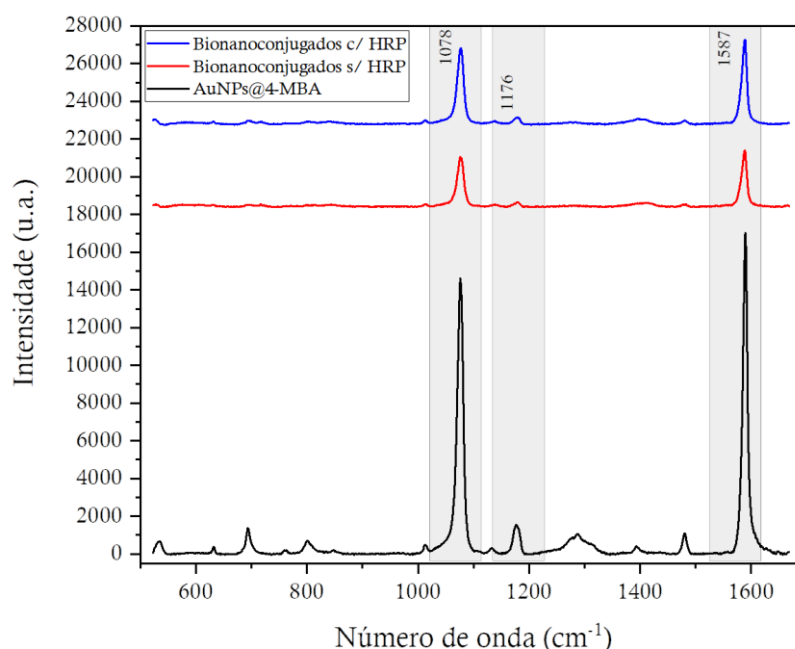


Figura 4.17 – Espectro de SERS dos bionanoconjugados com e sem a enzima HRP e de AuNPs funcionalizadas com 4-MBA. As AuNPs funcionalizadas com 4-MBA estão representadas a preto e os bionanoconjugados com e sem HRP estão representados a azul e vermelho, respetivamente.

Como pode ser observado na **Figura 4.17**, os bionanoconjugados apresentam as bandas características do 4-MBA a 1078cm^{-1} e 1587cm^{-1} , apesar de pouco intensas. A concentração das amostras de bionanoconjugados durante a sua preparação é de apenas 1.5nM em $500\mu\text{L}$, mas antes da análise por espectroscopia de Raman, foram concentradas por centrifugação, sendo ressuspensas num volume 5 vezes inferior ao inicial. Isso corresponde a uma concentração final de 7.5nM , considerando que não houve perda de nanopartículas por agregação em nenhum passo da preparação dos bionanoconjugados.

O desenvolvimento de bionanoconjugados em nanoestruturas anisotrópicas de ouro, como por exemplo as nanoestrelas, pode ser uma alternativa para o uso das nanoesferas de ouro de forma a obter uma sensibilidade maior na deteção da molécula de 4-MBA e, consequentemente, no ensaio de imunodeteção final.

4.7 Caracterização das nanoestrelas de ouro

A caracterização das nanoestrelas de ouro (AuNSs) foi feita por espectroscopia de UV/Visível entre os comprimentos de onda de 400 a 1000nm. O espectro da solução de AuNSs é caracterizado por duas bandas: uma banda muito intensa entre os 650 e 750nm (banda de LSPR) e uma segunda banda muito menos intensa entre os 500 e 600nm que pode não ser visível de forma individualizada em todos os espectros, podendo aparecer apenas como um “ombro”, dependendo da localização da banda mais intensa.⁸³

Na **Figura 4.18** está representado o espectro das AuNSs. É possível observar a banda de LSRP a 687nm e a seta a laranja presente no gráfico salienta a existência da segunda banda característica do espectro das AuNSs entre os 500 e 600nm. É usualmente chamado de “ombro” da banda de LSPR uma vez que existe sobreposição com a banda mais intensa. O espectro obtido está assim de acordo com a literatura.^{83,117}

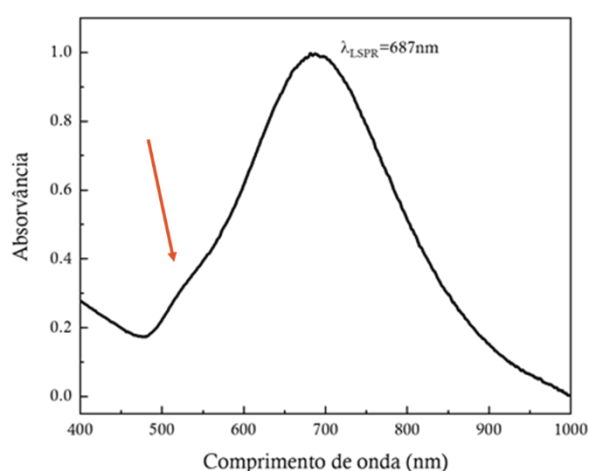


Figura 4.18 – Espectro de absorção das nanoestrelas de ouro após síntese ($\lambda_{\text{LSPR}}=687\text{nm}$). A seta a laranja salienta a existência da banda menos intensa no espectro.

A concentração de AuNSs foi estimada usando um intervalo de valores de coeficiente de extinção molar facultado pelo Mestre Miguel Almeida. O coeficiente de extinção molar usado foi entre $5 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e $9 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ consoante o máximo da banda mais intensa se encontrava perto dos 650 ou dos 750nm, respetivamente. O valor de concentração obtido numa síntese é de cerca de 1nM. Este método apresenta muito erro associado uma vez que é uma estimativa e o intervalo de comprimento de onda e coeficiente de extinção molar é grande.

4.8 Funcionalização das nanoestrelas de ouro

Após a síntese das nanoestrelas de ouro, procede-se à sua funcionalização. O rácio usado foi de 100000:1 e a **Figura 4.19** apresenta a comparação entre os espectros após síntese (linha a preto) e após a funcionalização (linha a vermelho).

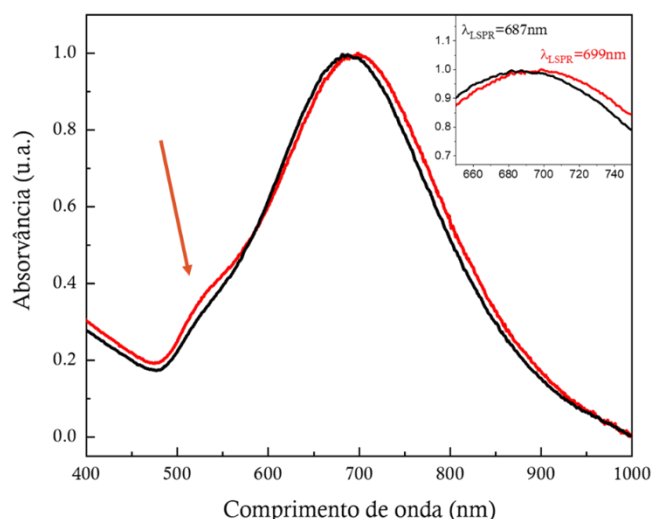


Figura 4.19 – Espectro de absorção das nanoestrelas de ouro após síntese (linha a preto, $\lambda_{LSPR}=687\text{nm}$) e após funcionalização com 4-MBA (linha a vermelho, $\lambda_{LSPR}=699\text{nm}$). A seta a laranja salienta a existência da banda menos intensa no espectro.

Ao observar a **Figura 4.19**, é possível observar um ligeiro desvio da banda LSPR para comprimentos de onda maiores (de 687nm para 699nm), o que significa que as AuNSs em solução estão corretamente funcionalizadas. A banda entre 500 e 600nm presente no gráfico e identificada pela seta a laranja é ligeiramente mais intensa e distinguível no espectro das nanopartículas funcionalizadas em comparação com o espectro das nanopartículas após a síntese. Uma possível explicação para este aumento poderá ser a perda de pontas de algumas das nanoestrelas em solução que voltam a formar nanopartículas esféricas, cuja banda LSPR característica é a cerca de 520nm.

4.9 SERS das nanoestrelas de ouro

Tal como para as nanoesferas de ouro, também as nanoestrelas de ouro foram funcionalizadas com diferentes percentagens de 11-MUA e 4-MBA. Foram efetuados triplicados de todas as amostras e o resultado encontra-se na **Figura 4.20**. Ao contrário das AuNPs, as AuNSs estavam à concentração de cerca de 1nM, cerca de 15 vezes menos concentradas.

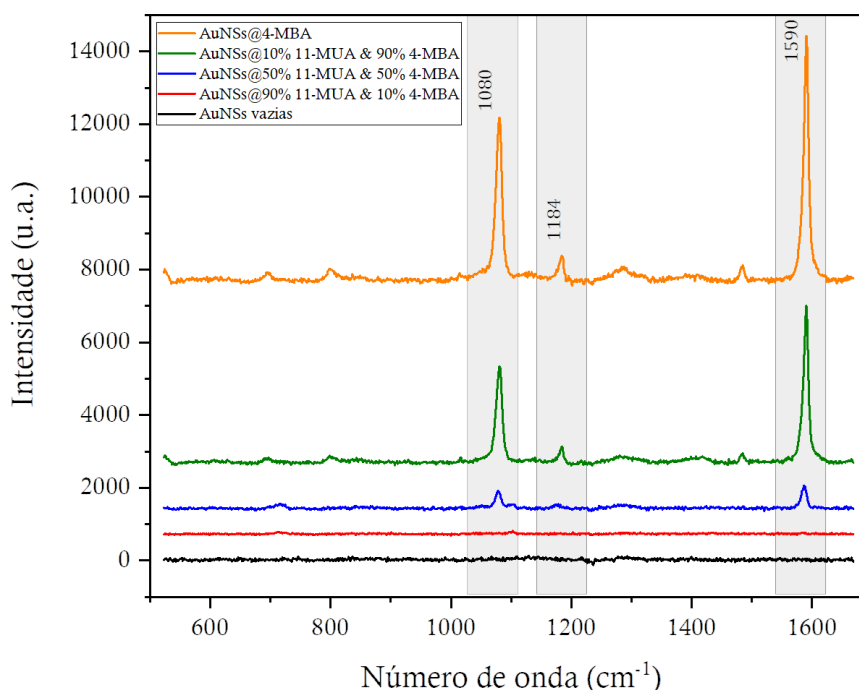


Figura 4.20 – Espectros de SERS das soluções de AuNSs funcionalizadas com diferentes percentagens de 11-MUA e 4-MBA.

Tal como observado no espectro de SERS das AuNPs, são observadas as bandas de Raman características do 4-MBA a 1080cm^{-1} e a 1590cm^{-1} e diminuem de intensidade à medida que a percentagem de 4-MBA presente na solução diminui. Apesar de os espectros terem sido obtidos a uma concentração cerca de 15 vezes inferior à das AuNPs, a percentagem de laser foi superior, pelo que não é possível comparar diretamente o comportamento das duas nanoestruturas.

4.10 Modificação de superfícies de vidro e silício

No trabalho descrito nesta dissertação, foi iniciado o estudo da formação da camada de silano em superfície de silício e vidro para posterior imobilização de anticorpos. Foram modificadas superfícies de silício e vidro, como descrito na secção 2.8.

O silano escolhido para proceder à modificação da superfície de silício e vidro foi o aminosilano APTES preparado em tolueno por ser o método mais usado para a silanização. O APTES permite a imobilização do anticorpo à superfície enquanto que atua como um espaçador o que permite mais liberdade ao anticorpo durante o passo de imobilização e captura do antigénio.⁸⁵ A ativação dos grupos hidroxilo foi feita por imersão em solução piranha. Após a ativação dos grupos -OH, foram testadas diferentes concentrações de APTES para determinar a que forma uma monocamada de silano.

A primeira abordagem para a produção da monocamada de silano foi efetuada numa bolacha de silício (*silicon wafer*) cortada em amostras de $2\text{cm} \times 1\text{cm}$. Após o procedimento descrito no ponto 2.8.1 do capítulo de materiais e métodos, as amostras foram analisadas por medição do ângulo de contacto de água e por elipsometria.

O primeiro ensaio de silanização foi efetuado na câmara limpa do CENIMAT na zona amarela e os resultados de medição do ângulo de contacto de água e de elipsometria estão apresentados na Figura 4.22 e Figura 4.23, respetivamente.

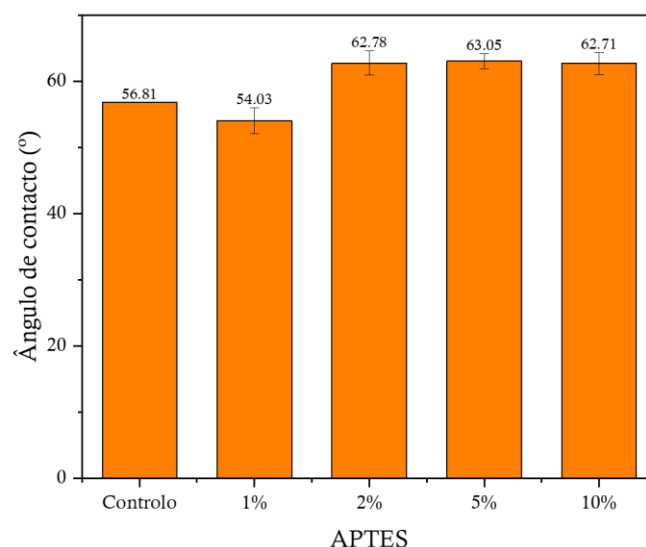


Figura 4.21 – Ângulo de contacto da água das amostras de silício após o processo de silanização com diferentes percentagens de APTES. Ensaio efetuado na câmara limpa do CENIMAT (zona amarela).

A amostra de controlo apenas foi tratada com solução piranha, não tendo passado por nenhum outro passo de silanização. Idealmente só possuirá uma camada de grupo -OH ativados, o que torna a superfície mais hidrofílica em comparação com a superfície silanizada.⁸⁸ Como é possível observar na **Figura 4.22**, a amostra de controlo é a mais hidrofílica com 56.81° de ângulo de contacto da água, à exceção da amostra de 1% de APTES que tem um ângulo de contacto da água médio de 54.03°. Segundo Gunda *et al*⁸⁸, o valor do ângulo de contacto da água na superfície controlo deveria ser de cerca de 41° e o valor no caso das superfícies silanizadas de cerca de 63°. Por análise apenas do WCA, os resultados obtidos nas amostras silanizadas com as percentagens de 2, 5 e 10% de APTES estão de acordo com a literatura, ao contrário das amostras controlo que apresenta um resultado acima do esperado e da amostra de 1% de APTES que apresenta um resultado abaixo do esperado.

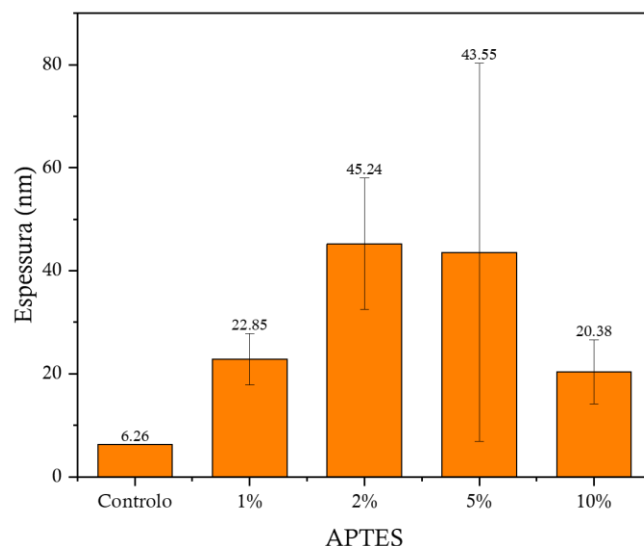


Figura 4.22 – Espessura da camada de silano das amostras de silício após silanização com diferentes percentagens de APTES. Ensaio efetuado na câmara limpa do CENIMAT (zona amarela).

Os resultados obtidos por elipsometria e apresentados na **Figura 4.23** não estão de acordo com os reportados na literatura. A amostra controlo deveria apresentar valores de cerca de 1.5nm tendo sido obtido experimentalmente o valor de 6.26nm enquanto que monocamada de silano deveria apresentar uma espessura de cerca de 4nm, ao contrário do que foi obtido

experimentalmente ao serem obtidos valores entre 20.38 e 43.55nm. Estes valores de espessura elevados apontam para a possibilidade da existência de multicamadas de silano na superfície da amostra. Para além da diferença entre os resultados esperados e obtidos, é de notar o elevado desvio dos valores obtidos nos triplicados, representado pelas barras de erro, o que indica que os resultados não são reprodutíveis.

O ensaio foi repetido, desta vez na zona branca na câmara limpa do CENIMAT na e os resultados de medição do ângulo de contacto de água e de elipsometria estão apresentados na **Figura 4.24** e **Figura 4.25**, respetivamente.

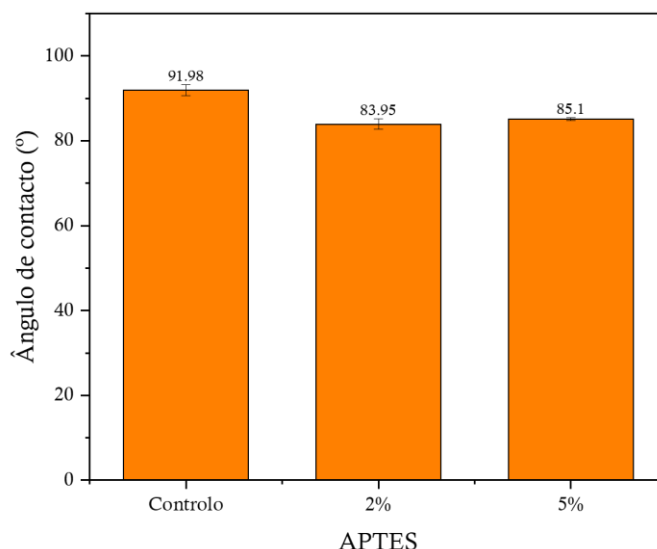


Figura 4.23 – Ângulo de contacto da água das amostras de silício após o processo de silanização com diferentes percentagens de APTES. Ensaio efetuado na câmara limpa do CENIMAT (zona branca).

Ao contrário das amostras preparadas anteriormente, os resultados apresentados na **Figura 4.24** não estão em concordância com a literatura. Os valores são muito superiores ao esperado (41° para amostra controlo e 63° para amostra silanizada) e as amostras apresentam um comportamento de maior hidrofobicidade.

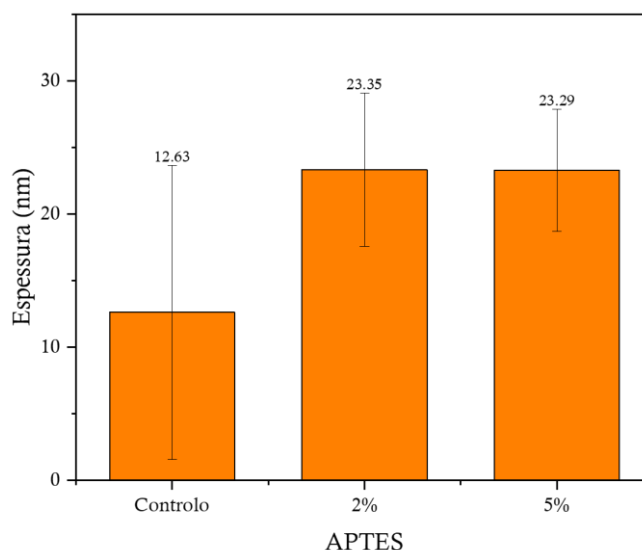


Figura 4.24 – Espessura da camada de silano das amostras de silício após silanização com diferentes percentagens de APTES. Ensaio efetuado na câmara limpa do CENIMAT (zona branca).

Em relação aos resultados de elipsometria obtidos e apresentados na **Figura 4.25**, a espessura de camada continua a ser superior à esperada, apresentando valores de 12.63nm para a

amostra controlo e cerca de 23nm para as amostras silanizadas. Tal como referido anteriormente, os valores de espessura elevados apontam para a possibilidade da existência de multicamadas de silano na superfície da amostra.

Como as superfícies de silício não estavam a obter os valores esperados, foi alterada a superfície e foram testadas amostras em vidro. O primeiro ensaio em vidro foi executado na zona branca da câmara limpa do CENIMAT e os resultados de ângulo de contacto da água e de elipsometria estão representados na **Figura 4.26** e **Figura 4.27**, respetivamente.

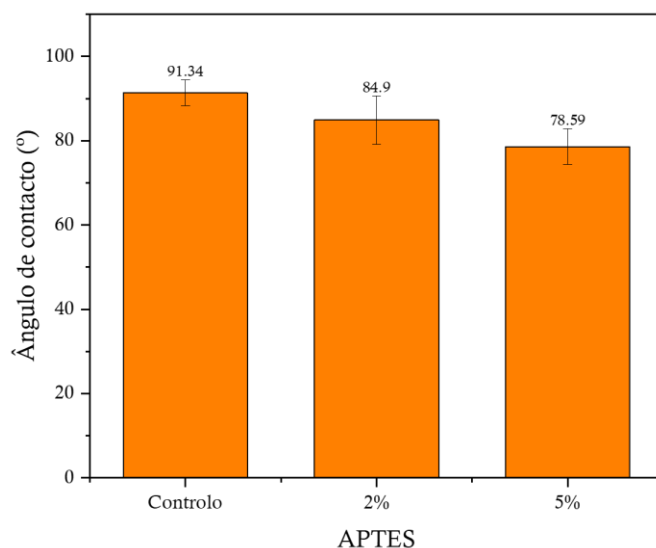


Figura 4.25 – Ângulo de contacto da água das amostras de vidro após o processo de silanização com diferentes percentagens de APTES. Ensaio efetuado na câmara limpa do CENIMAT (zona branca).

Tal como nos resultados das amostras de silício preparadas na zona branca da câmara limpa do CENIMAT, as amostras de vidro apresentam ângulos de contacto da água elevados para o esperado como apresentado na **Figura 4.26**, sendo possível observar um comportamento ligeiramente mais hidrofílico por parte das amostras silanizadas com 5% de APTES. Este comportamento é contrário ao esperado pois com a modificação da superfície com as moléculas de silano é esperado um comportamento mais hidrofóbico e não hidrofílico.

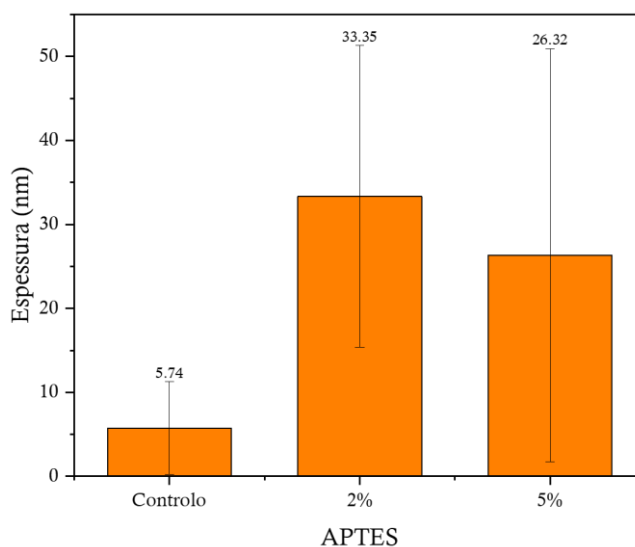


Figura 4.26 – Espessura da camada de silano das amostras de vidro após silanização com diferentes percentagens de APTES. Ensaio efetuado na câmara limpa do CENIMAT (zona branca).

Os resultados obtidos por elipsometria e apresentados na **Figura 4.27**, não estão de acordo com o esperado e reportado na literatura, apontando para a possibilidade da existência de multicamadas de silano na superfície da amostra.

O último ensaio apresentado foi feito no departamento de química no laboratório da professora Ana Lourenço com o auxílio da Doutora Daniela Peixoto. A diferença para os ensaios realizados anteriormente é a utilização de tolueno seco com CaCl_2 , procedimento executado pela Doutora Daniela Peixoto. Os resultados obtidos pela medição do ângulo de contacto da água e por elipsometria são apresentados na **Figura 4.28** e **Figura 4.29**, respetivamente.

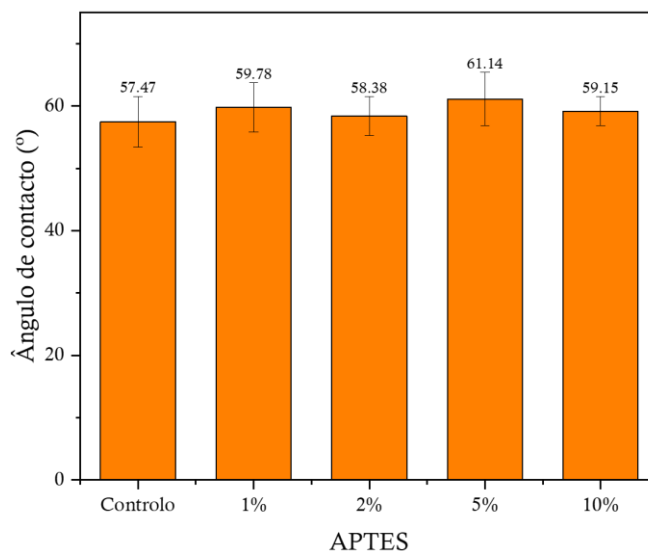


Figura 4.27 – Ângulo de contacto da água das amostras de vidro após o processo de silanização com diferentes percentagens de APTES. Ensaio efetuado com tolueno seco no departamento de química.

O ângulo de contacto obtido nas diferentes amostras e apresentados na **Figura 4.28**, tal como em ensaios anteriores, não está de acordo com o esperado e reportado na literatura. Em vez de ser observado um comportamento mais hidrofílico por parte das amostras controlo e mais hidrofóbico por parte das amostras silanizadas, todas elas apresentam o mesmo comportamento de hidrofobicidade.

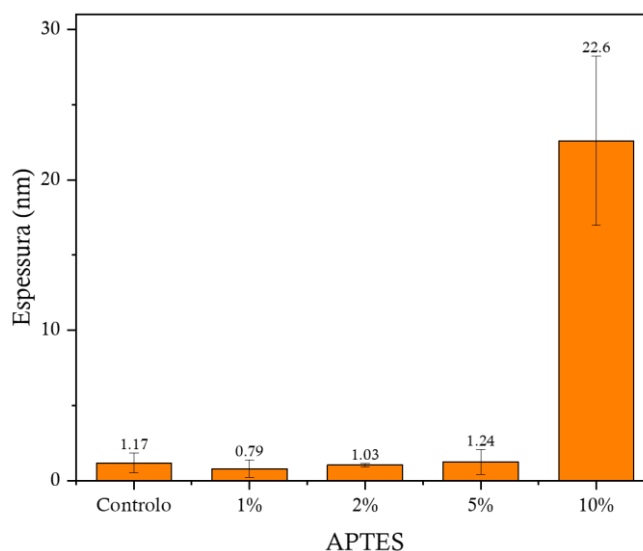


Figura 4.28 – Espessura da camada de silano das amostras de vidro após silanização com diferentes percentagens de APTES. Ensaio efetuado com tolueno seco no departamento de química.

Em relação aos resultados obtidos por elipsometria e apresentados na **Figura 4.28**, é de notar que as amostras controlo apresentam o valor de espessura de camada semelhante ao reportado na literatura. O resultado obtido experimentalmente é de 1.17nm e o reportado na literatura é de 1.5nm. Para as amostras silanizadas, é esperada uma espessura de camada superior à obtida nas amostras controlo, o que apenas é observado para a percentagem de 10% de APTES. No entanto, este valor é, tal como registado nos ensaios anteriores, muito superior ao esperado. O valor esperado de espessura para a camada de silano é de 3.9nm enquanto que o valor obtido foi de 22.6nm.

Para além da medição do ângulo de contacto da água e da determinação da espessura de camada, foram obtidas as imagens de AFM das amostras preparadas em superfície de vidro com APTES diluído em tolueno seco. As imagens de AFM estão apresentadas da **Figura 4.29**. A microscopia de força atômica permite obter informação acerca da topografia da superfície da amostra. Como se pode observar nas imagens obtidas, a topografia da superfície não é uniforme em nenhuma das amostras, o que permite concluir que não foi possível obter uma camada uniforme de silano em toda a superfície de vidro, como era pretendido. Os pontos brancos que estão nas imagens correspondem a locais de maior espessura (determinada por AFM), podendo referir-se a contaminações ou então a destruição da amostra por parte da solução piranha.

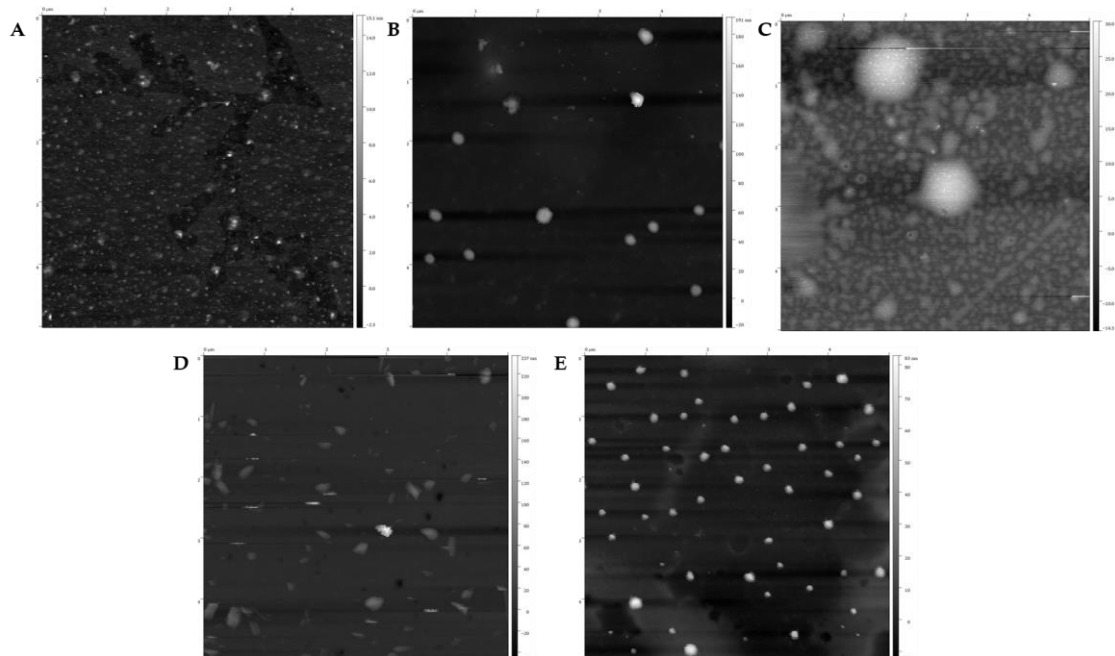


Figura 4.29 – Imagens de AFM das amostras do ensaio efetuado com tolueno seco no departamento de química. Amostra controlo (A), 1% APTES (B), 2% APTES (C), 5% APTES (D) e 10% APTES (E).

Tendo em conta os resultados obtidos em todos os ensaios efetuados em superfície de silício e de vidro, conclui-se que não foi possível obter superfícies silanizadas com uma monocamada de APTES. Os elevados valores de espessura obtidos em todos os ensaios, apontam para a existência de multicamadas de silano na superfície das amostras. Os parâmetros para a obtenção da monocamada de silano por APTES necessitam de otimização, como o tempo de imersão em solução piranha que pode ser longo de mais que danifique a superfície da amostra, o uso de outro método de ativação de grupos silano à superfície da amostra, a utilização de tolueno seco em câmara de luvas de forma a diminuir a presença de água durante o procedimento.

Capítulo 5 | CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A presente dissertação teve por objetivo principal o desenvolvimento de bionanoconjugados para a criação um ensaio de imunodeteção tipo *sandwich* por espectroscopia de Raman aumentada pela superfície (SERS) para a deteção de biomarcadores para integração num dispositivo de microfluídica. De forma a atingir os objetivos propostos, foram sintetizadas nanopartículas esféricas de ouro (AuNPs) que foram posteriormente funcionalizadas com 4-MBA, uma molécula ativa em Raman, para bionanoconjugação com um anticorpo (anti-HRP). A bionanoconjugação foi efetuada por interação electrostática entre o anticorpo e as moléculas de 4-MBA adsorvidas à superfície das nanopartículas e por ligação covalente recorrendo aos agentes reticulantes EDC e Sulfo-NHS. Após confirmada a existência da ligação covalente, foram efetuados os ensaios enzimáticos dos bionanoconjugados com a enzima HRP (específica para o anticorpo usado) e os bionanoconjugados foram analisados por Raman de forma a verificar que se detetava o sinal da molécula ativa em Raman após todos os passos de bionanoconjugação. Foram ainda sintetizadas nanoestrelas de ouro (AuNSs), funcionalizadas com 4-MBA e analisadas por Raman. Por fim, foi dado início ao desenvolvimento das superfícies com os anticorpos de captura necessários para a criação do ensaio de imunodeteção por SERS.

As AuNPs foram sintetizadas utilizando duas abordagens ao mesmo método de síntese de nanopartículas de ouro por redução de citrato desenvolvido por Turkevich: a síntese normal e a síntese inversa. As nanopartículas resultantes da síntese inversa apresentam menor tamanho e menor índice de polidispersibilidade em comparação com as nanopartículas sintetizadas pela síntese normal. A banda de LSPR está localizada a cerca de 518nm. A funcionalização das nanopartículas foi efetuada com o rácio de 5000:1 e a foi confirmada por eletroforese em gel de agarose pela migração das amostras no gel e por espectroscopia de UV/Vis ao ser observado o desvio da banda de LSPR de 518nm para 522nm. As AuNPs funcionalizadas com diferentes misturas de 11-MUA e 4-MBA foram avaliadas por espectroscopia de Raman e foram detetadas as duas bandas mais intensas do espectro de Raman a cerca de 1076cm^{-1} e 1588cm^{-1} nos espectros com maior percentagem de 4-MBA. A conjugação das nanopartículas com anti-HRP prosseguiu com a funcionalização a 100% de 4-MBA por apresentar maior intensidade de bandas em Raman.

Os bionanoconjugados preparados por interação electrostática necessitam de um rácio de cerca de 1000:1 de anti-HRP para AuNP de forma a garantir que as nanopartículas estão totalmente revestidas por anticorpo. Para além da verificação da conjugação por eletroforese em gel de agarose, pode também ser verificado por espectroscopia de UV/Vis onde é observado um desvio da banda de LSPR de 522nm para 527nm (em relação ao espectro das AuNPs funcionalizadas). Para a ligação covalente, foi determinado que a concentração ideal de EDC e de Sulfo-NHS para a preparar os bionanoconjugados é de 0.01nM e 0.02nM, respetivamente. A existência da ligação covalente foi verificada por eletroforese em gel de agarose. Determinada a concentração ideal dos agentes reticulantes, foi estudada a possibilidade de aumentar o rácio de anticorpo e concluiu-se que é possível aumentar o rácio de anticorpo para nanopartícula uma vez que o comportamento de ligação covalente se mantinha. Com isto, foi determinado o rácio entre 150 e 175 para a preparação dos bionanoconjugados com ligação covalente de forma a garantir a cobertura total da nanopartícula com anticorpos.

A capacidade dos anticorpos presentes nos bionanoconjugados de ligarem a enzima HRP foi avaliada pelo ensaio enzimático. A reação do ABTS com H_2O_2 é catalisada pela enzima HRP e é detetada pelo registo da absorvância a 405nm. O ensaio enzimático de enzima livre (não conjugada) foi de 42.03 ± 1.10 unidades/mL de enzima e o ensaio enzimático dos bionanoconjugados com HRP foi de 0.49 ± 0.27 unidades/mL de enzima. Apesar de o valor de atividade dos bionanoconjugados ser baixo em relação ao obtido para enzima livre, é verificado que existe atividade por parte da enzima, o que permite concluir que a HRP está presente em solução por interação com os anticorpos.

Os bionanoconjugados foram analisados por Raman para verificar que o sinal da molécula repórter de Raman era observável. Foi verificada a existência das bandas características do 4-MBA a 1078cm^{-1} e 1587cm^{-1} .

O espectro de absorção das nanoestrelas de ouro apresenta a banda de LSPR localizada entre 650 e 750nm. A concentração estimada das AuNSs em solução é de 1nM. A funcionalização das AuNSs com 4-MBA é verificada por espectroscopia de UV/Vis, onde é observado um desvio da banda de LSPR de 687nm para 699nm. As AuNSs funcionalizadas com diferentes misturas de 11-MUA e 4-MBA foram avaliadas por espectroscopia de Raman e foram detetadas as duas bandas mais intensas do espectro de Raman a cerca de 1080cm^{-1} e 1590cm^{-1} nos espectros com maior percentagem de 4-MBA.

As superfícies para imobilização de anticorpo foram silanizadas com diferentes percentagens de APTES, mas os resultados não permitiram determinar a percentagem de APTES que permite obter a monocamada de silano para ligação ao anticorpo. É um procedimento que necessita de otimização que pode passar por alterações nas condições do ensaio.

O objetivo principal deste trabalho foi atingido ao serem obtidos os bionanoconjugados com atividade enzimática (quando conjugados com a enzima HRP) e com sinal em Raman da molécula de 4-MBA. As tarefas futuras que podem ser desenvolvidas em futuros projetos no âmbito deste trabalho incluem:

- Otimizar o desenvolvimento dos bionanoconjugados apresentados neste trabalho com um rácio de anticorpo superior de forma a maximizar a atividade do ensaio enzimático;
- Desenvolvimento dos mesmos bionanoconjugados obtidos neste trabalho com AuNSs de forma a obter maior sensibilidade na análise por Raman;
- Otimizar a modificação de superfície para imobilização de anticorpos, experimentando outras abordagens, como o uso de outros métodos de imobilização ou o uso de outro composto de silano.

Capítulo 6 | REFERÊNCIAS

1. Parashar, U., Saxena, P. S. & Srivastava, A. Role of Nanomaterials in Biotechnology. *J. Nanomater. Biostructures* **3**, 81–87 (2008).
2. Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17–MR71 (2007).
3. Roduner, E. Size matters: why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 583 (2006).
4. Anu Mary Ealia, S. & Saravanakumar, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **263**, 032019 (2017).
5. Nanobiotechnology. *Springer Nature* Available at: <https://www.nature.com/subjects/nanobiotechnology>. (Accessed: 17th July 2018)
6. Gazit, E. & Mitraki, A. Introduction: Nanobiotechnology and Bionanotechnology. in *Plenty of Room for Biology at the Bottom* 1–15 (IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2013). doi:10.1142/9781848169319_0001
7. Chan, W. C. W. Bionanotechnology Progress and Advances. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12**, 87–91 (2006).
8. Park, S. & Hamad-Schifferli, K. Nanoscale interfaces to biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 616–622 (2010).
9. Franco, R. & Pereira, E. Gold Nanoparticles and Proteins, Interaction. in *Encyclopedia of Metalloproteins* (eds. Kretsinger, R. H., Uversky, V. N. & Permyakov, E. A.) 908–915 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-1533-6
10. Kumar, A. & Liang, X.-J. Gold Complexes as Prospective Metal-Based Anticancer Drugs. in *Encyclopedia of Metalloproteins* (eds. Kretsinger, R. H., Uversky, V. N. & Permyakov, E. A.) 875–887 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-1533-6
11. Rosi, N. L. & Mirkin, C. A. Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.* **105**, 1547–1562 (2005).
12. Allison, R. R., Mota, H. C., Bagnato, V. S. & Sibata, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—State of the art review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **5**, 19–28 (2008).
13. Bamdad, C. Gold Nanoparticle Platform for Protein-Protein Interactions and Drug Discovery. in *Encyclopedia of Metalloproteins* (eds. Kretsinger, R. H., Uversky, V. N. & Permyakov, E. A.) 887–895 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-1533-6
14. Peixoto de Almeida, M. *et al.* Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors. in *Comprehensive Analytical Chemistry* **66**, 529–567 (2014).
15. Pengo, P. *et al.* Gold nanoparticles with patterned surface monolayers for nanomedicine: current perspectives. *Eur. Biophys. J.* **46**, 749–771 (2017).
16. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* **60**, 1–8 (2016).
17. Vo-Dinh, T. & Cullum, B. Biosensors and biochips : advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**, 540–551 (2000).
18. Yoo, E.-H. & Lee, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* **10**, 4558–4576 (2010).
19. Newman, J. D. & Setford, S. J. Enzymatic Biosensors. *Mol. Biotechnol.* **32**, 249–268 (2006).
20. Tothill, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 55–62 (2009).

21. Monošík, R., Stred'anský, M. & Šturdík, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chim. Slovaca* **5**, 109–120 (2012).
22. Mehrotra, P. Biosensors and their applications – A review. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* **6**, 153–159 (2016).
23. Sawant, S. N. Development of Biosensors From Biopolymer Composites. in *Biopolymer Composites in Electronics* 353–383 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-809261-3/00013-9
24. Dzantiev, B. & Zherdev, A. Antibody-Based Biosensors. in 161–196 (2013). doi:10.1201/b15589-7
25. Mescher, A. L. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. (McGraw-Hill Education, 2016).
26. Harlow, E. & Lane, D. Antibody-Antigen interactions. in *Antibodies - A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, 1988).
27. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. Antigen Recognition by B-Cell and T-Cell Receptors. in *Immunology: The immune system in health and disease* (Garland Publishing New York, 2001).
28. Harlow, E. & Lane, D. Antibody molecules. in *Antibodies - A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, 1988).
29. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. Antigen recognition in the adaptive immune system. in *Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system* (Elsevier, 2016).
30. Armstrong, B. Antigen–antibody reactions. *ISBT Sci. Ser.* **3**, 21–32 (2008).
31. Tijssen, P. Kinetics and nature of antibody-antigen interactions. in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* **15**, 123–149 (1985).
32. Fracchiolla, N., Artuso, S. & Cortelezzi, A. Biosensors in Clinical Practice: Focus on Oncohematology. *Sensors* **13**, 6423–6447 (2013).
33. Kumar, N. & Upadhyay, L. S. B. *Polymeric gels for biosensing applications*. *Polymeric Gels* (Elsevier Ltd, 2018). doi:10.1016/b978-0-08-102179-8.00019-3
34. Peltomaa, R., Glahn-Martínez, B., Benito-Peña, E. & Moreno-Bondi, M. C. Optical Biosensors for Label-Free Detection of Small Molecules. *Sensors (Basel)*. **18**, (2018).
35. Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* (2017). doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
36. Sperling, R. A. & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–1383 (2010).
37. Polte, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm* **17**, 6809–6830 (2015).
38. D. Howes, P., Rana, S. & M. Stevens, M. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3835–3853 (2014).
39. Yasun, E. *et al.* Cancer cell sensing and therapy using affinity tag-conjugated gold nanorods. *Interface Focus* **3**, 20130006–20130006 (2013).
40. Liu, X. & Swihart, M. T. Heavily-doped colloidal semiconductor and metal oxide nanocrystals: an emerging new class of plasmonic nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3908–3920 (2014).
41. Eustis, S. & El-Sayed, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and

- nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 209–217 (2006).
42. Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O. M. & Iati, M. A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *J. Phys. Condens. Matter* **29**, 203002 (2017).
 43. Willets, K. A., Duyne, R. P. Van & Van Duyne, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **58**, 267–297 (2007).
 44. Ma, W. Y. *et al.* A numerical investigation of the effect of vertex geometry on localized surface plasmon resonance of nanostructures. *Opt. Express* **18**, 843 (2010).
 45. Panahi, Y. *et al.* Preparation, Surface Properties, and Therapeutic Applications of Gold Nanoparticles in Biomedicine. *Drug Res. (Stuttg.)* **67**, 77–87 (2016).
 46. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Anal. Chem.* **79**, 4215–4221 (2007).
 47. Turkevich, John; Cooper, P. H. J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **55**, 55–75 (1951).
 48. Kimling, J. *et al.* Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **110**, 15700–15707 (2006).
 49. Mühlpfordt, H. The preparation of colloidal gold particles using tannic acid as an additional reducing agent. *Experientia* **38**, 1127–1128 (1982).
 50. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 801–802 (1994).
 51. Kumar, S., Gandhi, K. S. & Kumar, R. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method †. *Ind. Eng. Chem. Res.* **46**, 3128–3136 (2007).
 52. Ojea-Jiménez, I., Bastús, N. G. & Puntès, V. Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **115**, 15752–15757 (2011).
 53. Thanh, N. T. K., Maclean, N. & Mahiddine, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem. Rev.* **114**, 7610–7630 (2014).
 54. Subbiah, R., Veerapandian, M. & S. Yun, K. Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Curr. Med. Chem.* **17**, 4559–4577 (2010).
 55. Thiruppathi, R., Mishra, S., Ganapathy, M., Padmanabhan, P. & Gulyás, B. Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging. *Adv. Sci.* **4**, 1–14 (2016).
 56. Sperling, R. A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M. & Parak, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1896 (2008).
 57. Oura, K., Katayama, M., Zotov, A. V., Lifshits, V. G. & Saranin, A. A. Atomic Structure of Surfaces with Adsorbates. in *Surface Science* 195–227 (2003). doi:10.1007/978-3-662-05179-5_9
 58. Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H. & Sedighimoghaddam, B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sens. Bio-Sensing Res.* **9**, 17–22 (2016).
 59. Alvarez-Puebla, R. A. & Liz-Marzán, L. M. SERS-Based Diagnosis and Biodetection. *Small* **6**, 604–610 (2010).
 60. Nimse, S. B., Sonawane, M. D., Song, K.-S. & Kim, T. Biomarker detection technologies

- and future directions. *Analyst* **141**, 740–755 (2016).
61. Valley, N., Greeneltch, N., Van Duyne, R. P. & Schatz, G. C. A Look at the Origin and Magnitude of the Chemical Contribution to the Enhancement Mechanism of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 2599–2604 (2013).
 62. Le Ru, E. & Etchegoin, P. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects* **1**, (Elsevier, 2009).
 63. Bumrah, G. S. & Sharma, R. M. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egypt. J. Forensic Sci.* **6**, 209–215 (2016).
 64. Hammes, G. G. *Spectroscopy For The Biological Sciences*. (Wiley, 2005).
 65. Fleischmann, M., Hendra, P. J. & McQuillan, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163–166 (1974).
 66. Jeanmaire, D. L. & Van Duyne, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **84**, 1–20 (1977).
 67. Albrecht, M. G. & Creighton, J. A. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5215–5217 (1977).
 68. Mosier-Boss, P. Review of SERS Substrates for Chemical Sensing. *Nanomaterials* **7**, 142 (2017).
 69. Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C. & Van Duyne, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 601–626 (2008).
 70. Ding, S.-Y., You, E.-M., Tian, Z.-Q. & Moskovits, M. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4042–4076 (2017).
 71. Giannini, V., Rodríguez-Oliveros, R. & Sánchez-Gil, J. A. Surface Plasmon Resonances of Metallic Nanostars/Nanoflowers for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Plasmonics* **5**, 99–104 (2010).
 72. Sergiienko, S., Moor, K., Gudun, K., Yelemessova, Z. & Bukasov, R. Nanoparticle–nanoparticle vs. nanoparticle–substrate hot spot contributions to the SERS signal: studying Raman labelled monomers, dimers and trimers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 4478–4487 (2017).
 73. Xu, H., Aizpurua, J., Käll, M. & Apell, P. Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. E* **62**, 4318–4324 (2000).
 74. Schlücker, S. Surface-enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 4756–4795 (2014).
 75. Li, X., Jiang, L., Zhan, Q., Qian, J. & He, S. Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **332**, 172–179 (2009).
 76. Wang, K., Li, S., Petersen, M., Wang, S. & Lu, X. Detection and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nanomaterials* **8**, 762 (2018).
 77. Champion, A., Ivanecy, J. E., Child, C. M. & Foster, M. On the Mechanism of Chemical Enhancement in Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11807–11808 (1995).
 78. Wang, X. *et al.* The gold-nanoparticle-based surface plasmon resonance light scattering and visual DNA aptasensor for lysozyme. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 2085–2091 (2011).

79. Betz, J. F., Yu, W. W., Cheng, Y., White, I. M. & Rubloff, G. W. Simple SERS substrates: powerful, portable, and full of potential. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 2224–2239 (2014).
80. Jo, D. H., Kim, J. H., Lee, T. G. & Kim, J. H. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 1603–1611 (2015).
81. Tian, F., Bonnier, F., Casey, A., Shanahan, A. E. & Byrne, H. J. Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape. *Anal. Methods* **6**, 9116–9123 (2014).
82. Burrows, N. D. *et al.* Anisotropic Nanoparticles and Anisotropic Surface Chemistry. *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 632–641 (2016).
83. Pallavicini, P., Cabrini, E. & Borzenkov, M. Gold Nanostar Synthesis and Functionalization with Organic Molecules. in *Gold Nanostars: Synthesis, Properties and Biomedical Application* 1–23 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-20768-1
84. Fales, A. M., Yuan, H. & Vo-Dinh, T. Development of Hybrid Silver-Coated Gold Nanostars for Nonaggregated Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. C* **118**, 3708–3715 (2014).
85. Vashist, S. K., Lam, E., Hrapovic, S., Male, K. B. & Luong, J. H. T. Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics. *Chem. Rev.* **114**, 11083–11130 (2014).
86. Cox, K. L. *et al.* Immunoassay methods. (2012). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>. (Accessed: 23rd September 2019)
87. Yu, Q., Wang, Q., Li, B., Lin, Q. & Duan, Y. Technological Development of Antibody Immobilization for Optical Immunoassays: Progress and Prospects. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **45**, 62–75 (2015).
88. Gunda, N. S. K., Singh, M., Norman, L., Kaur, K. & Mitra, S. K. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Appl. Surf. Sci.* **305**, 522–530 (2014).
89. Yuan, H. *et al.* Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging. *Nanotechnology* **23**, 075102 (2012).
90. Enzymatic Assay of Peroxidase (EC 1.11.1.7) 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) as a Substrate. *Sigma Quality Control Test Procedure* Available at: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/p6782enz.pdf. (Accessed: 13th July 2018)
91. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. (David Harris, 2007).
92. Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. (2010).
93. Serwer, P. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. *Electrophoresis* **4**, 375–382 (1983).
94. Kim, J.-Y., Kim, H.-B. & Jang, D.-J. Electrophoretic separation of gold nanoparticles according to bifunctional molecules-induced charge and size. *Electrophoresis* **34**, 911–916 (2013).
95. Jimenez-Sandoval, S. Micro-Raman spectroscopy: a powerful technique for materials research. *Microelectronics J.* **31**, 419–427 (2000).
96. Podraza, N. J. & Jellison, G. E. Ellipsometry. in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*

- 482–489 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.10991-6
97. Fujiwara, H. Introduction to Spectroscopic Ellipsometry. in *Spectroscopic Ellipsometry* 1–11 (John Wiley & Sons, Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470060193.ch1
 98. Spectroscopic Ellipsometry: Basic Concepts. Available at: https://www.horiba.com/en_en/spectroscopic-ellipsometry/. (Accessed: 12th December 2018)
 99. Butt, H., Graf, K. & Kappl, M. Adsorption. in *Physics and Chemistry of Interfaces* 177–205 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527602313.ch9
 100. Fujiwara, H. Principles of Optics. in *Spectroscopic Ellipsometry* 13–48 (John Wiley & Sons, Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470060193.ch2
 101. Fujiwara, H. Principles of Spectroscopic Ellipsometry. in *Spectroscopic Ellipsometry* 81–146 (John Wiley & Sons, Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470060193.ch4
 102. Yuan, Y. & Lee, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. in *Surface Science Techniques* (eds. Bracco, G. & Holst, B.) **51**, 3–34 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
 103. OCA – Optical contact angle measuring and contour analysis systems. Available at: <https://www.dataphysics-instruments.com/products/oca/>. (Accessed: 12th December 2018)
 104. Jagtap, R. N. & Ambre, A. H. Overview literature on atomic force microscopy (AFM): Basics and its important applications for polymer characterization. *Indian J. Eng. Mater. Sci.* **13**, 368–384 (2006).
 105. Johnson, D., Hilal, N. & Bowen, W. R. Basic principles of atomic force microscopy. in *Atomic Force Microscopy in Process Engineering* 1–30 (Elsevier Ltd, 2009). doi:10.1016/B978-1-85617-517-3.00001-8
 106. Küstner, B. *et al.* SERS Labels for Red Laser Excitation: Silica-Encapsulated SAMs on Tunable Gold/Silver Nanoshells. *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 1950–1953 (2009).
 107. Gellner, M., Kömpe, K. & Schlücker, S. Multiplexing with SERS labels using mixed SAMs of Raman reporter molecules. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1839–1844 (2009).
 108. Michota, A. & Bukowska, J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. *J. Raman Spectrosc.* **34**, 21–25 (2003).
 109. Li, R. *et al.* Vibrational spectroscopy and density functional theory study of 4-mercaptobenzoic acid. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **148**, 369–374 (2015).
 110. Raj, A. *et al.* IR, Raman and SERS spectra of 2-(methoxycarbonylmethylsulfanyl)-3,5-dinitrobenzene carboxylic acid. *J. Braz. Chem. Soc.* **20**, 549–559 (2009).
 111. Kai, S., Chaozhi, W. & Guangzhi, X. Multiple adsorbed states and surface enhanced Raman spectra of crotonic and sorbic acids on silver hydrosols. *J. Raman Spectrosc.* **20**, 267–271 (1989).
 112. Paquet-Mercier, F., Babaei Aznaveh, N., Safdar, M. & Greener, J. A microfluidic bioreactor with in situ SERS imaging for the study of controlled flow patterns of biofilm precursor materials. *Sensors (Switzerland)* **13**, 14714–14727 (2013).
 113. Yaffe, N. R. & Blanch, E. W. Effects and anomalies that can occur in SERS spectra of biological molecules when using a wide range of aggregating agents for hydroxylamine-reduced and citrate-reduced silver colloids. *Vib. Spectrosc.* **48**, 196–201 (2008).
 114. Zhang, Y., Wang, F., Yin, H. & Hong, M. Nonuniform Distribution of Capping Ligands Promoting Aggregation of Silver Nanoparticles for Use as a Substrate for SERS. *Adv. Nanoparticles* **02**, 104–111 (2013).

115. Oliveira, M. J. *et al.* Office paper decorated with silver nanostars - an alternative cost effective platform for trace analyte detection by SERS. *Sci. Rep.* **7**, 2480 (2017).
116. Bartczak, D. & Kanaras, A. G. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir* **27**, 10119–10123 (2011).
117. Chirico, G., Borzenkov, M. & Pallavicini, P. Gold nanostars: Synthesis, properties and biomedical application. *Gold Nanostars Synth. Prop. Biomed. Appl.* 1–74 (2015). doi:10.1007/978-3-319-20768-1

ANEXOS

I. Lista de reagentes e materiais usados

i. Lista de reagentes químicos.

Reagentes	Fornecedor
2,2'-azina-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS – C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₆ S ₄)	Roche
(3-aminopropil)triétoxissilano, 98% (APTES – C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si)	Sigma-Aldrich
Acetona, 99.5% (C ₃ H ₆ O)	Honeywell-Riedel-de-Haën
Ácido 11-mercaptoundecanóico, 95% (11-MUA – C ₁₁ H ₂₂ O ₂ S)	Sigma-Aldrich
Ácido 4-mercaptobenzóico, 99% (4-MBA – C ₇ H ₈ O ₂ S)	Sigma-Aldrich
Ácido ascórbico (C ₆ H ₈ O ₆)	Carlo Erba
Ácido Clorídrico, 37% (HCl)	Fisher Chemical
Ácido Bicinconínico (C ₂₀ H ₁₂ N ₂ O ₄)	Sigma-Aldrich
Ácido Nítrico, 70% (HNO ₃)	Sigma-Aldrich
Ácido Sulfúrico, 96% (H ₂ SO ₄)	Panreac
Ácido Tetracloroáurico, 30% (m/v) em HCl 99.9% (HAuCl ₄)	Sigma-Aldrich
Agarose	BioRad
Citrato de sódio tribásico dihidratado, 99% (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Etanol absoluto anidro HPLC, 99.9% (C ₂ H ₅ OH)	Carlo Erba
Fosfato de potássio dibásico, 99% (HK ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Fosfato de potássio monobásico, 99% (H ₂ KPO ₄)	Sigma-Aldrich
Glicerol, 87% (C ₃ H ₈ O ₃)	Panreac
Hidrocloreto N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, 99% (EDC – C ₈ H ₁₇ N ₃ ·HCl)	Sigma-Aldrich
Hidróxido de potássio (KOH)	Pronolab
Hidróxido de sódio (NaOH)	Sigma-Aldrich
Isopropanol, 99.8% (C ₃ H ₈ O)	Scharlau
N-hidroxisulfosuccinamida, 98% (Sulfo-NHS – C ₄ H ₄ NNaO ₆ S)	Sigma-Aldrich
Nitrato de prata, 99.8% (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	Sigma-Aldrich
Tolueno (C ₆ H ₅ CH ₃)	Fisher Chemical
Triton X-100	Fluka

ii. Lista de Proteínas

Proteínas	Fornecedor
Albumina de Soro Bovino, 98% (BSA)	Sigma-Aldrich
Anticorpo policlonal anti-peroxidase de rábano ABIN116806 (Anti-HRP)	Antibodies-online.com
Peroxidase de rábano (HRP)	Sigma-Aldrich
Standard de albumina de soro bovino (1mg/mL)	Sigma-Aldrich

iii. Lista de equipamentos e materiais.

Equipamentos	Marca	Modelo
Agitador microtubos com regulação de temperatura	bioSan	TS-100 (SC-18/02)
Balança	Radwag	AS 220/C/2
Células de quartzo	Hellma Analytics	
Centrífuga (rotores)	Centurion Scientific	K3 Series (BRK5424/BRK53/08)
Elipsómetro	Horiba-Jobin Yvon	UVISEL 2VUV
Espectrofotómetro	Varian	Cary 50 Bio UV/Visible
Fonte de tensão	BioRad	PowerPac Basic Power
Goniómetro de ângulo de contacto	Dataphysics	OCA 15Plus
Medidor de pH	Crison	Basic 20+
Microscópio de Raman	Renishaw	inVia Qontor
Placa de agitação	JPSelecta	Agimatic-N
Tina de eletroforese horizontal	BioRad	Mini-Sub Cell GT

