



Jarol Ramon Miranda Andrades

**Avaliação da resposta óptica
decorrente da interação entre
gentamicina e nanopartículas de ouro
esféricas e em forma de bastão
visando aplicação analítica.**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Co-orientadora: Prof^a. Andrea Rosane da Silva

Rio de Janeiro

Novembro de 2015



Jarol Ramon Miranda Andrades

**Avaliação da resposta óptica
decorrente da interação entre
gentamicina e nanopartículas de ouro
esféricas e em forma de bastão
visando aplicação analítica.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

Profa. Andrea Rosane da Silva

Co-Orientadora

CEFET/RJ

Prof. Maurício Lanznaster

UFF

Prof. Wagner Pacheco

UFF

Profa. Aurora Pérez Gramatges

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 16 novembro de 2015

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Jarol Ramon Miranda Andrades

Ficha Catalográfica

Miranda Andrades, Jarol Ramon

Avaliação da resposta óptica decorrente da interação entre gentamicina e nanopartículas de ouro esféricas e em forma de bastão visando aplicação analítica / Jarol Ramon Miranda Andrades ; orientador: Ricardo Queiroz Aucélio ; co-orientadora: Andrea Rosane da Silva. – 2015.

132 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2015.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Gentamicina. 3. Nanopartículas esféricas de ouro. 4. Nanopartículas de ouro na forma de bastões. 5. Ressonância plasmônica na superfície de nanopartículas de ouro. 6. Meio organizado com surfactante. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Silva, Andrea Rosane da. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Agradecimentos

Em primeiro lugar, dou graças a Deus, Pai Eterno, que me amou e predestinou como seu filho desde que eu estava no ventre de minha mãe, a seu filho amado Jesus Cristo, que morreu e pagou por meus pecados e que está à direita do Pai, intercedendo por toda a humanidade, por ter-me dado a oportunidade de fazer meus estudos de Pós-graduação nesta bela Universidade, PUC-Rio.

Ao Prof. Dr. Ricardo Aucélio pela oportunidade de trabalhar em sua linha de pesquisa pela confiança durante o processo deste mestrado. Me sinto orgulhoso de ter você como orientador.

À Prof^a Dr^a Andrea Rosane pelo seu imenso apoio, e por toda a paciência e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Aurora Perez por sua disponibilidade e apoio durante o transcurso desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Omar Pandoli, por disponibilizar tempo e ajuda no preparo das AuNPs-B. Muito obrigado.

Aos meus pais, Orlando Rafael Miranda e Concepción Lucia Andrades, e a meus irmãos Ely Johana e Carlos Andres, por eles serem a razão de meu esforço a cada dia.

A minha namorada e amiga Joseane Alves por seu apoio ao longo destes dois anos, pois sem ela meus dias no Rio de Janeiro não seriam especiais e felizes.

Ao Prof. Dr. Dunieskys e ao Prof. Eric pelo apoio nas análises morfológicas das nanopartículas, e pelos conhecimentos compartilhados.

A meus amigos e colegas, Marlin Pedrozo, Jesica, Stephanie, Wendy J., Carlos, Oliver, Wenndy P, Luis, Rafael, M. Fernanda, Mauricio, Joseany, Rosângel Anna, Paulo, Jefferson e Alex.

A toda família do LEEA, por seu apoio e colaboração durante o transcurso pesquisa.

Agradeço ao técnico Paulo, por sua colaboração e disponibilizar em ajudar com todos os materiais necessários e apoio técnico, sempre com grande alegria e disposição em fazê-lo; a Leila pelo apoio e conselhos sempre com um sorriso em sua boca cantando “é hoje”; ao Júnior por sua companhia em minhas jornadas noturnas de trabalho; a Alessandra por seu apoio profissional sempre disposta a ajudar; a Adriana também pela compressão e colaboração e à Sonia pelo apoio administrativo e empenho em resolver todos os assuntos pertinentes ao trabalho.

Ao departamento de Pós-graduação em Química da PUC-Rio, pelo apoio na pesquisa.

Um agradecimento muito especial a Fátima, pelo seu apoio incondicional durante estes 2 anos, mulher colaboradora e nobre, a considero a mãe dos estudantes de Pós-graduação em Química, sempre pronta para ajudar, Deus te continue abençoando.

Aos meus tios e primos, pelo apoio e carinho, em especial as minhas tias Darlenys, Mirella, Rosa, Mercedes, Cecilia; aos meus tios Dairo Bom, Jairo, Cesar, Antonio, Cesar Barrios; aos meus primos Andrea, Paola, Liceth, Jorge, Jesus, José, Elkin, David, Henry, Orlando, Jadi e tantos outros.

A todos os colegas da PUC-Rio que me apoiaram ao longo deste trabalho.

Ao CNPq e PUC-Rio, pela bolsa de estudos e isenção, pelo financiamento da pesquisa.

À FINEP e PETROBRAS por parte da estrutura montada no LEEA-PUC-Rio

Resumo

Andrades, Jarol Ramon Miranda; Aucélio, Ricardo Queiroz; Silva, Andrea Rosane da. **Avaliação da resposta óptica decorrente da interação entre gentamicina e nanopartículas de ouro esféricas e em forma de bastão visando aplicação analítica.** Rio de Janeiro, 2015. 132p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A gentamicina é um antibiótico aminoglicosídeo (AMG) amplamente utilizado na medicina humana e veterinária por exibir um amplo espectro de ação no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. No entanto, sua prescrição deve ser criteriosa devido aos possíveis efeitos colaterais como ototoxicidade e nefrotoxicidade. Os métodos espectroanalíticos usados na determinação de gentamicina quase sempre requerem a modificação da molécula com agentes de derivatização química já que os AMG não possuem grupos cromóforos relevantes. Esse tipo de procedimento é trabalhoso e na maioria dos casos implica em resultados com a exatidão questionável em função de dificuldades relacionadas, por exemplo, na reprodução do rendimento das reações de derivatização. Na presente dissertação, a influência da gentamicina (na forma de sulfato) no efeito da ressonância plasmônica nas superfícies das nanopartículas de ouro (AuNPs) foi estudada e utilizada para o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação desse AMG. Nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs-E), tanto em meio aquoso quanto em meio organizado por surfactantes, e nanopartículas de ouro na forma de bastão (AuNPs-B), em meio aquoso contendo resíduo do surfactante catiônico usado na sua síntese, foram estudados como sondas analíticas para a gentamicina. As AuNPs-E foram sintetizadas em condições próximas às descritas por Turkevich, enquanto as AuNPs-B foram obtidas na presença do surfactante catiônico CTAB, como indicado pelo procedimento de Nikoobakht e El-Sayed. Um estudo criterioso de ajuste de condições para a estabilidade da sonda e reprodutibilidade da resposta óptica da sonda na presença de gentamicina foi realizado. Dentre os fatores estudados incluem-se o valor do pH da sonda de trabalho, o tempo de

estabilização, o tipo e a concentração de surfactante. As condições finais para a determinação de gentamicina usando AuNPs-E foram: concentração de nanopartículas nas dispersões de trabalho de $4,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, pH 3,7 (pH original da dispersão AuNPs-E), concentração do surfactante Tween-20 de $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Para a sonda de AuNPs-B, as condições escolhidas foram: concentração de nanopartículas nas dispersões de trabalho de $3,8 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, pH 5,2 (pH original da dispersão AuNPs-B). Os sinais produzidos por essas sondas foram estáveis por pelo menos 2 h. As curvas analíticas foram construídas a partir do monitoramento da luz transmitida através da dispersão aquosa em 526 nm (decréscimo da banda de ressonância transversal) ou 681 nm (incremento de banda decorrente da aglomeração das AuNPs) para AuNPs-E, e em 662 nm (decréscimo da banda de ressonância longitudinal) no caso das AuNPs-B. Para ambas as sondas, independentemente do comprimento de onda monitorado, a faixa linear da resposta analítica cobriu duas ordens de magnitude de concentração (entre 10^{-9} à 10^{-7} mol L⁻¹). Os limites de detecção para a gentamicina foram de $1,7 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ no método baseado no uso da sonda de AuNPs-E e de $5,3 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ para o método em que se utilizou a sonda de AuNPs-B. Os métodos foram aplicados para análise de duas formulações (soluções injetáveis) de sulfato de gentamicina disponíveis no mercado para o tratamento de gado leiteiro. Os métodos mostraram-se seletivos em relação aos excipientes presentes nas soluções injetáveis (considerando as quantidades relativas destes nas formulações) e os resultados analíticos indicaram recuperações percentuais de gentamicina entre 96 e 98% (em relação ao valor descrito nas bulas dos medicamentos) sendo estatisticamente iguais às recuperações percentuais obtidas utilizando calorimetria com derivatização química com ninidrina, usado como método de referência.

Palavras-chave

Gentamicina; nanopartículas esféricas de ouro; nanopartículas de ouro na forma de bastões; ressonância plasmônica na superfície de nanopartículas de ouro; meio organizado com surfactante; formulações veterinárias.

Abstract

Andrades, Jarol Ramon Miranda; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor); Silva, Andrea Rosane da (Co-advisor). **Evaluation of optical response resulting from the interaction between gentamicin and spherical gold nanoparticles gold nanorods aiming analytical application.** Rio de Janeiro, 2015. 132p. MSc. Dissertation - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Gentamicin is an aminoglycoside (AMG) antibiotic widely used in human and veterinary medicine as they present a broad spectrum of action covering gram-positive and gram-negative bacteria. However, medical prescription of AMG must be made with care due to possible side effects such as nephrotoxicity and ototoxicity. Spectroanalytical methods used for the determination of gentamicin almost always require the modification of the analyte molecule by chemical derivatization agents since AMG does not have any relevant chromophore groups. Chemical derivatization is cumbersome and in most cases results in poor accuracy due to, for instance, difficulties to reproduce reaction yields. In the present work, the influence of gentamicin (as sulphate) on the plasmon resonance on the surface of gold nanoparticles (AuNPs) was studied and used to develop analytical methods for the determination of this AMG. Spherical gold nanoparticles (AuNPs-E), both in aqueous medium and in médium containing surfactants, as well as gold nanorods (AuNPs-B) in an aqueous medium containing residues of the cationic surfactant used in the synthesis, as analytical probes for gentamicin. The AuNPs-E were synthesized in conditions similar to those described by Turkevich while AuNPs-B were obtained in the presence of the cationic surfactant CTAB as described by El-Sayed and Nikoobakht. A careful study was carried out to establish the conditions for a stable and reproducible optical response of the analytical probe in the presence of gentamicin. Among these conditions includes the pH values of the working probe, stabilization time of the probe, the type and concentration of surfactant in

the system. The final conditions for the determination of gentamicin using AuNPs-E were 4.1×10^{-10} mol L⁻¹ of nanoparticle in the working dispersion, pH 3.7 (the original pH of the AuNPs-E aqueous dispersion), 1.0×10^{-8} mol L⁻¹ of the surfactant Tween-20. For the AuNPs-B probe, the chosen conditions were: 3.8×10^{-10} mol L⁻¹ of nanoparticles in the working dispersions, pH 5.2 (pH of the stock dispersion AuNPs B). The signals generated by these probes were stable for at least 2 h. The analytical curves were constructed by monitoring the light transmitted through the aqueous dispersion at 526 nm (decreasing of the transversal resonance band) or at 681 nm (increment of a band resulting from the agglomeration of AuNPs) to AuNPs-E, and 516 nm (decreasing of the transversal resonance band) or at 662 nm (decreasing of the longitudinal resonance band) in the case of AuNPs-B. For both of the probes, regardless of the monitored wavelength, the linear analytical response range covered two orders of magnitude (from 10^{-9} to 10^{-7} mol L⁻¹). The detection limits for gentamicin were 1.7×10^{-9} mol L⁻¹ in the method based on the use of AuNPs-E probe, and 5.3×10^{-9} mol L⁻¹ for the method based on the use of the AuNPs-B probe. The methods were applied for the analysis of two gentamicin sulfate based formulations (injectable solutions) commercially available for the treatment of dairy cattle. The methods were selective in relation to the excipients present in these injectable solutions (considering the relative amounts of these in the formulations) and analytical results indicated percent recoveries of gentamicin between 96 and 98% (relative to the values indicated in the medicine instructions) which was statistically equal to the percent recoveries obtained using the reference colorimetric method based on the chemical derivatization using ninhydrin.

Keywords

Gentamicin; spherical gold nanoparticles; gold nanorods; plasmon resonance on the surface of gold nanoparticles; aqueous systems organized with surfactant; veterinary formulations.

Sumário

1	Contextualização do trabalho	23
1.1.	Estrutura da dissertação	24
1.2.		25
	Objetivos	25
1.2.1.		25
	Objetivo Geral	25
1.2.2.	Objetivos Específicos	25
1.3.	Introdução	26
1.3.1.	Aminoglicosídeos	26
1.3.2.	Gentamicina	29
1.3.3.	Métodos analíticos para determinação de gentamicina	30
1.3.4.	Nanomateriais e nanopartículas metálicas	34
1.3.5.	Nanopartículas de ouro	37
1.3.6.	Interação entre AMG e nanopartículas de ouro	41
2	Materiais, Instrumentação e procedimentos experimentais	45
2.1.	Materiais e Reagentes	45
2.1.1.	Reagentes	45
2.1.2.	Outros materiais	46
2.2.	Instrumentação	47
2.3.	Procedimentos	47
2.3.1.	Síntese de nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs-E)	47

2.3.2. Síntese de nanobastões de ouro (AuNPs-B)	48
2.3.3. Preparo das soluções	48
2.3.4. Preparo das dispersões de trabalho de AuNPs	49
2.3.5. Preparo das soluções padrões de analito e de soluções de amostra no método colorimétrico baseado na derivatização com ninidrina	51
2.3.6. Procedimento de medição espectrofotométrica	51
2.3.7. Análises por microscopia eletrônica (varredura em modo de transmissão) – STEM	52
3 Resultados e discussão-Parte I	53
3.1. Características ópticas e morfológicas das nanopartículas de ouro sintetizadas	53
3.2. Estudos da sonda aquosa de AuNPs-E em função da presença de gentamicina	64
3.2.1. Magnitude da resposta	64
3.2.2. Resposta óptica e sua estabilidade	67
3.2.3. Efeito da variação do pH da dispersão na resposta óptica da sonda	69
3.3. Estudo com surfactantes	74
3.3.1. Estudo da interação das AuNPs-E com gentamicina em meio contendo surfactante catiônico	74
3.3.2. Estudo da interação das AuNPs-E com gentamicina em meio contendo surfactante aniônico	76
3.3.3. Estudo da interação das AuNPs-E com gentamicina em meio contendo surfactante não iônico	77
3.4. Características das dispersões de AuNPs-E como sondas analíticas para gentamicina	80
3.4.1. Precisão instrumental e intermediária	87

3.4.2. Robustez	88
3.5. Estudos da seletividade da sonda em relação aos componentes das matrizes de medicamentos comerciais de gentamicina	89
3.5.1. Ensaio de recuperação	93
4 Resultados e discussão-Parte II	97
4.1. Síntese de nanobastões de ouro	97
4.2. Morfologia das nanopartículas e cálculo da concentração	104
4.3. Estudos da sonda de AuNPs-B em função da presença de gentamicina	107
4.3.1. Magnitude da resposta	107
4.3.2. Estabilidade da resposta	109
4.3.3. Efeito da variação do pH da dispersão de AuNPs-B na resposta óptica da sonda	110
4.4. Características das dispersões de AuNPs-B como sondas analíticas para gentamicina	112
4.5. Estudos da seletividade dos componentes das matrizes em relação das mostras reais	116
4.5.1. Ensaio de recuperação	119
5 Conclusões	123
6 Trabalhos futuros	126
7 Referências bibliográficas	127

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estruturas dos AMG dissubstituídos nas posições 4 e 5 (neomicina e ribostamicina) e nas posições 4 e 6 (gentamicina e tobramicina) da 2-desoxiestreptamina e a estreptomicina. O anel em vermelho representa a 2-desoxi-estreptamina e o anel em azul a estreptidina 27
- Figura 2:** Estruturas dos componentes da gentamicina 30
- Figura 3:** Ilustração da superfície plasmônica ressonante nas nanopartículas (Adaptado de HUANG; EL-SAYED, 2010) 36
- Figura 4:** Espectro SPR transversal e longitudinal das nanobastões de ouro 39
- Figura 5:** Perfis espectrais de ressonância plasmônica medidos das dispersões de AuNPs sintetizadas com diferentes tempos de aquecimento a 100 °C diluídas em água: (a) 5 min; (b) 10 min; (c) 15 min; (d) 20 min; (e) 25 °C min e (f) 30 min após a adição do agente redutor. Precursor : HAuCl_4 ; agente redutor: citrato de sódio monobásico; 900 rpm de agitação. As dispersões sintetizadas foram diluídas com água na proporção de 50/50% v/v 55
- Figura 6:** Perfis espectrais de ressonância plasmônica medidos em três dispersões de AuNPs-E sintetizadas independentemente e diluídas em água: (a) síntese 1; (b) síntese 2; (c) síntese 3. Precursor: HAuCl_4 ; agente redutor: citrato de sódio monobásico; 25 min de aquecimento a 100 °C após a adição do agente redutor; 900 rpm de agitação. As dispersões sintetizadas foram diluídas com água na proporção de 50/50% v/v 56
- Figura 7:** Avaliação dos sinais médios das sondas, $\log(I_0/I)$, em dispersões diluídas constituídas por 1 parte de dispersão estoque de AuNPs e 1 parte de água (50% v/v de AuNPs-E no volume total), a partir das três sínteses independentes (A). (a) Dispersões de AuNPs na ausência de gentamicina, (b) dispersões de AuNPs-E na presença de gentamicina ($2,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) (c) dispersões de AuNPs na presença de gentamicina ($7,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$); (d) dispersões de AuNPs na presença de gentamicina ($14 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$);

(B) Monitoramento do sinal no comprimento de onda 526 nm (C) Monitoramento do sinal no comprimento de onda 681nm 58

Figura 8: Perfil espectral de ressonância plasmônica da dispersão estoque de AuNPs-E diluída em água. Precursor: H₂AuCl₄; agente redutor : citrato de sódio monobásico; 25 min de aquecimento a 100 °C após a adição do agente redutor; 900 rpm de agitação. A dispersão estoque foi diluída com água na proporção de 50/50% v/v 60

Figura 9: (A) imagem por STEM das AuNPs-E da dispersão estoque de AuNPs-E e (B) imagem por STEM processada a partir do programa Image J (FIJI) 61

Figura 10: Imagens por STEM das AuNPs-E da dispersão estoque (A) imagem original; (B) imagem depois do processamento através do programa Image J (FIJI) 62

Figura 11: Histogramas referentes ao processamento das imagens das AuNPs-E (imagem da Figura 6) indicando: (A) diâmetro do eixo maior, (B) diâmetro do eixo menor, (C) razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), (D) circularidade; (E) área de superfície 63

Figura 12: Espectros médios das dispersões de AuNPs-E na ausência e na presença de diferentes concentrações de sulfato de gentamicina [0,0; 2,4; 7,1; 9,2 ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹)] Linhas de a-d (A). (B) Monitoramento do sinal da sonda de AuNPs em 526 nm. (C) Monitoramento do sinal em 681 nm 66

Figura 13: Imagens por STEM: (A) dispersão de trabalho na ausência de sulfato de gentamicina (dispersão-branco); (B) dispersão de trabalho na presença de sulfato de gentamicina ($7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) 67

Figura 14: Estabilidade do sinal da sonda em função do tempo: em 526 nm e 681 nm (A) dispersão branco; (B) Estabilidade do sinal da sonda com ($4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de sulfato de gentamicina) em função do tempo monitorado em 526 e 681 nm 69

Figura 15: Intensidade de sinais medidos em, (a) 526 nm; e (b) em 681nm: (A) dispersões-branco e (B) dispersões de trabalho na presença de sulfato de gentamicina ($4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) na faixa de pH entre 2,5 e 9,0 72

Figura 16: Espectros das dispersões de trabalho de AuNPs-E ($4,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) na presença de gentamicina ($4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) com ajustes de pH nos valores: 2,5 (a); 3,0 (b); 3,5 (c); 3,6 (d); 3,7 (e); 3,8 (f); 3,9 (g); 4,1 (h); 4,5 (i); 5,5 (j); 6,0 (K); 6,5 (m); 7,0 (n); 7,5 (o); 8,0 (p); 8,5 (q) e 9,0 (r) 73

Figura 17: Monitoramento do valor do pH em dispersões de trabalho de AuNPs-E ($4,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) em função do aumento da concentração de gentamicina: 0,0; 0,9; 2,4; 3,4; 4,1; 7,1; 9,4; 9,6; 13,6 e 17,0 ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹) 73

Figura 18: Perfis espectrais das AuNPs-E em meio contendo CTAB e na presença de concentrações crescentes de gentamicina (a) 0,0; (b) $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (c) $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (d) $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Concentrações de CTAB: (A); superior à CMC (B); na CMC (C) inferior à CMC (D) na ausência de CTAB 76

Figura 19: Perfis espectrais das AuNPs-E em meio contendo SDS e na presença de concentrações crescentes de gentamicina (a) 0,0; (b) $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (c) $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e (d) $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Concentrações de SDS: (A); superior à CMC (B); na CMC (C) inferior à CMC (D) na ausência de SDS 77

Figura 20: Perfis espectrais das AuNPs-E em meio contendo Tween 20 e na presença de concentrações crescentes de gentamicina (a) 0,0; (b) $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (c) $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e (d) $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Concentrações de Tween-20: (A); superior à CMC (B); na CMC (C) inferior à CMC (D) na ausência de Tween-20 79

Figura 21: Perfis espectrais das AuNPs-E em meio contendo (A) Tween-20 ($1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e (B) na ausência de Tween 20 em função do aumento de concentração de gentamicina (a) 0,0; (b) $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (c) $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e (d) $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Concentrações de Tween 20: (A); superior à CMC (B); na CMC (C) inferior à CMC (D) na ausência de Tween 20 80

Figura 22: Espectros das dispersões de AuNPs ($4,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) na presença de gentamicina nas concentrações (a-l): 2,4; 4,3; 6,8; 7,7; 8,5; 9,4; 10,1; 11,9 e 13,6; 15,3 e 17,0 ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹) 82

- Figura 23:** Avaliação das mudanças espectrais da dispersão de AuNPs ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) em função do aumento da concentração de gentamicina com medição de sinal em comprimentos de onda fixos de 681 nm (a) e 526 nm (b) 82
- Figura 24:** (A) curva analítica construída em função da concentração de sulfato de gentamicina na sonda aquosa de AuNPs ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) monitoradas em 526 nm e (B) gráfico de resíduos em 526 nm 84
- Figura 25:** (A) curva analítica construída em função da concentração de sulfato de gentamicina na sonda aquosa de AuNPs ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) monitorada em 681 nm e (B) gráfico de resíduos em 681 nm 85
- Figura 26:** Perfis espectrais de SPR longitudinal e transversal medidos das dispersões de AuNPs-B sintetizadas com diferentes temperaturas: (a) 30°C; (b) 35°C; (c) 40°C; (d) 45°C e (e) 50°C; As dispersões sintetizadas foram diluídas com água na proporção de 1/6 v/v 99
- Figura 27:** Perfil espectral de SPR da dispersão de AuNPs-B sintetizada na temperatura de reação 30°C sob agitação de 400 rpm por 120 min. Espectro obtido com dispersão de síntese diluída com água na proporção de 16/84% v/v 99
- Figura 28:** Perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-B na ausência e na presença de gentamicina nas concentrações finais de (a) 0,0 (b) 1,7; (c) 3,4 e (d) 6,8 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Espectro obtido com dispersão de síntese diluída com água na proporção de 16/84% v/v 101
- Figura 29:** Comparação dos perfis espectrais obtidos de dispersões-branco preparadas com: (a) dispersão de síntese original e (b) dispersão de síntese submetida ao processo de limpeza (uma etapa de centrifugação). Espectro obtido com dispersão de síntese diluída com água na proporção de 16/84% v/v 102
- Figura 30:** Perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-B: na ausência de gentamicina e na presença de gentamicina nas concentrações finais de (a) 0,0; (b) 1,7; (c) 3,4; e (d) 6,8 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Espectro obtido

com dispersão de síntese (após limpeza com uma etapa de centrifugação) diluída com água na proporção de 16/84% v/v 103

Figura 31: Perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-B: na ausência de gentamicina e na presença de gentamicina nas concentrações finais de (a) 0,0; (b) 1,7; (c) 3,4; e (d) 6,8 ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹). Espectro obtido com dispersão de síntese (após limpeza com duas etapas de centrifugação) diluída com água na proporção de 16/84% v/v 104

Figura 32: Imagens por STEM das AuNPs-B da dispersão estoque. (A) imagem original; (B) imagem depois do processamento através do programa Image J (FIJI) 105

Figura 33: Histogramas resultantes do processamento das imagens da AuNPs-B (imagem da Figura 7) indicando: (A) diâmetro do eixo maior, (B) diâmetro do eixo menor, (C) circularidade; (D) razão de aspectos (eixo maior/eixo menor); (E) área superficial 106

Figura 34: Resposta óptica da sonda de AuNPs-B na presença de concentrações crescentes de sulfato de gentamicina (a) 0,0; (b) 2,4; (c) 7,1; e (d) 11 ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹) (A); Monitoramento do sinal em 516 nm, (B); e monitoramento do sinal em 662 nm (C) 108

Figura 35: Estabilidade do sinal da resposta da dispersão-branco da sonda de AuNPs-B ($3,8 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) em função do tempo (A): em 516 nm (a) e 662 nm (b). (B) Estabilidade do sinal da sonda de AuNPs-B ($3,8 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) na presença de $4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de gentamicina, em função do tempo: Monitorando-se o sinal da resposta da sonda nos comprimentos de onda em 516 nm (a) e 662 nm (b) 110

Figura 36: Estabilidade do sinal das dispersões-branco ($3,8 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) (A), e Estabilidade do sinal da sonda de AuNPs-B ($3,8 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) na presença de $4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de gentamicina (B). Ambas em diferentes valores de pH no meio (3,9; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,5). Monitorando-se o sinal da resposta da sonda nos comprimentos de onda em 662 nm (a) e 516 nm (b) 112

Figura 37: Perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-B na presença de concentrações crescentes de sulfato de gentamicina: (a) 0,0 ; (b)

$6,8 \times 10^{-9}$; (c) $2,4 \times 10^{-8}$; (d) $3,4 \times 10^{-8}$; (e) $7,1 \times 10^{-8}$; (f) $9,4 \times 10^{-8}$; (g) 10
($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) 113

Figura 38: Imagens por STEM: (A) dispersão-branco de AuNPs-B na
ausência de sulfato de gentamicina e (B) dispersão de trabalho de Au
NPs-B na presença de sulfato de gentamicina ($7,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) 114

Figura 39: (A) curva analítica para concentrações de gentamicina na faixa
de $6,8 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ com monitoramento em 662 nm , e (B)
gráfico de resíduos em 662 nm 115

Tabelas

Tabela 1: Aminoglicosídeos com maior utilidade na terapêutica (Adaptado de Stead, 2000)	26
Tabela 2: Sinais médios da avaliação das três partidas de síntese de AuNPs-E na presença de concentrações crescentes de gentamicina	59
Tabela 3: Estimativa das características morfológicas das AuNPs-E da dispersão estoque	64
Tabela 4: Equações das curvas analíticas de gentamicina medida com a sonda de AuNPs-E	85
Tabela 5: Limites de detecção e de quantificação para o sinal monitorado em 529 e 681 nm	86
Tabela 6: Precisão instrumental e precisão intermediária da sonda de AuNPs-E em relação à medida de sinal produzido por duas concentrações diferentes de sulfato de gentamicina	87
Tabela 7: Quantidades esperadas dos componentes (excipientes) por 1 mL de solução injetável de sulfato de gentamicina (por 100 mg do princípio ativo)	91
Tabela 8: Monitoramento em 526 nm, referente a percentagem de variação do sinal da dispersão de trabalho da sonda de AuNPs-E contendo $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de gentamicina, em presença de proporções crescentes dos excipientes orgânicos e inorgânico contidos na patentes das soluções injetável de gentamicina	92
Tabela 9: Monitoramento em 681 nm, referente a porcentagem de variação do sinal da dispersão de trabalho da sonda de AuNPs-E contendo $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de gentamicina, em presença de proporções crescentes excipientes orgânicos e inorgânico contidos na patentes das solução injetável de gentamicina	92

Tabela 10: Recuperação das amostras simuladas e das amostras reais de soluções injetáveis de gentamicina utilizando a sonda de AuNPs-E, com monitoramento dos sinais em 526 nm e 681 nm	95
Tabela 11: Recuperação das amostras controle e das amostras reais de soluções injetáveis utilizando o método colorimétrico	95
Tabela 12: Resultado do teste-F e do teste t-student aplicados aos valores alcançados nos determinação de gentamicina utilizando o método da literatura (colorimétrico) e o método da sonda de AuNPs-E	96
Tabela 13: Estimativa das características morfológicas das AuNPs-B da dispersão estoque	107
Tabela 14: Limites de detecção e de quantificação para o sinal da sonda de AuNPs-B monitorado em 662 nm	115
Tabela 15: Precisão da sonda de AuNPs-B monitorada em 662 nm	116
Tabela 16: Porcentagem de interferência $[\log (I_0/I)_{\text{analito}} / \log (I_0/I)_{\text{analito}} + \text{excipiente}] \times 100$ das substâncias químicas que faz parte das matrizes da paciente de gentamicina monitorando-se a variação do sinal em 662 nm	119
Tabela 17: Recuperação das amostras controle e das amostras reais de soluções injetável de gentamicina utilizando a sonda de AuNPs monitorado em 662 nm	120
Tabela 18: Recuperações das amostras controles C, das amostras reais (soluções injetável A e B sulfato de gentamicina) utilizando o método colorimétrico	121
Tabela 19: Resultado do teste-F e do teste t-student aplicados aos valores alcançados nos determinação de gentamicina utilizando o método da literatura (colorimétrico) e o método da sonda de AuNPs-B	122

Lista de Abreviaturas

AMG	Aminoglicosídeos
AuNPs-E	Nanopartículas de ouro esféricas
LEEA-PUC-Rio	Laboratório de Espectroanalítica e Eletroanalítica Aplicada da PUC-Rio
pH	Potencial hidrogeniônico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AuNPs-B	Nanopartículas de ouro em forma de bastão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
Tween20	Polioxietilen(20)sorbitanmonolaurato
LCF/PUC-Rio	Laboratório de caracterização de fluidos
CMC	Concentração micelar crítica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Ka	Constante de acidez
LOD	Limite de detecção
mg	Miligrama
µg	Micrograma
Pg	Picograma
mL	Mililitro
SPR	Ressonância plasmônica de superfície

mm	Milímetros
STEM	Microscopio eletrônico por varredura de transmissão
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
min	Minutos
°C	Graus Celsius
H	Horas
ALOD	Limite de detecção absoluto
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ALOD	Limite de detecção absoluto

1

Contextualização do trabalho

A gentamicina, um antibiótico aminoglicosídeo (AMG), é produzido por *Micromonospora*. Ela é amplamente utilizada na medicina veterinária devido ao amplo espectro de ação frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. Entretanto, requer-se critério e cuidado na sua prescrição. Resíduos de antibióticos em alimentos de origem animais são considerados como um importante risco para a saúde devido a resistência antimicrobiana.

Uma vez que na estrutura da gentamicina não existem ligações insaturadas ou potenciais cromóforos, antibiótico interage fracamente com a radiação na região do visível e UV próximo, ou seja, as absorvidades molares dos AMG são insignificantes o que dificulta a sua quantificação de forma direta. Nas últimas décadas uma série de métodos analíticos foram investigadas a fim de monitorar os níveis de resíduos de gentamicina em matrizes biológicas.

A maioria dos métodos descritos para a determinação de gentamicina são baseados na derivatização com *o*-ftalaldeído, estes métodos de derivatização são muito demorados e em muitos casos possuem baixa sensibilidade. Os esforços têm sido investidos para estabilizar nanopartículas. Vários estudos têm sido surgido na utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) conjugadas com antibióticos como potenciais agentes bactericidas.

A literatura também relata efeitos decorrentes da interação entre AuNPs e AMG com a diminuição da intensidade da banda de ressonância plasmônica de superfície característica das AuNPs e, no caso das nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs-E), o aparecimento de uma banda decorrente de agregação.

A proposta do presente é avaliar o potencial analítico da interação direta de nanopartículas esférica (AuNPs-E) e em forma de bastão (AuNPs-B) com o sulfato de gentamicina, desta forma, as amostras não são submetidas a nenhuma etapa de pré-tratamento, fazendo-se com que os análises sejam feitas diretamente por

espectrofotometria com medição de alteração da intensidade da radiação transmitida pela dispersão de (AuNPs-E e AuNPs-B) na presença de sulfato de gentamicina. Desta maneira esta metodologia além de ser simples, e econômica, não gera resíduos tóxicos, o qual esta acordo no principio da química verde.

1.1.Estrutura da dissertação

A presente dissertação está estruturada em seis capítulos. No Capítulo 2, apresenta-se uma revisão bibliográfica, na qual se faz uma definição dos aminoglicosídeos expressando as informações mais importantes sobre esses compostos. Desta forma direcionou-se a pesquisa para o estudo da gentamicina, tornando-a analito alvo para o desenvolvimento deste trabalho. Seguidamente é relatada uma breve fundamentação teórica sobre nanopartículas metálicas centrado-se nas características e propriedades das AuNPs, de igual forma nesse mesmo capítulo também, são abordados informações da literatura referente as pesquisas de que relatam a interação entre AuNPs e os aminoglicosídeos.

No Capítulo 3 relata-se uma descrição dos procedimentos experimentais abordados, fazendo menção dos materiais, reagentes e instrumentações que foram necessárias para a realização do trabalho.

O Capítulo 4 aborda o desenvolvimento de método analítico para a determinação gentamicina usando sonda aquosa de nanopartículas de ouro esféricas.

No Capítulo 5 descreve-se o desenvolvimento do método analítico para a determinação gentamicina usando sonda em meio micelar de nanopartículas de ouro em forma de bastão.

Ao final da dissertação, o Capítulo 6 descreve-se todas as conclusões relacionadas com os objetivos almejados.

1.2.

Objetivos

1.2.1.

Objetivo Geral

- Desenvolver e ajustar condições para obtenção de sondas analíticas de nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs-E) e em forma de bastão (AuNPs-B) para determinação de gentamicina em amostras de medicamento veterinário, visando comparar o desempenho das sondas para determinação de gentamicina.

1.2.2.

Objetivos Específicos

- Ajustar as condições de síntese de nanopartículas de ouro esféricas (baseado no procedimento de Turkevich) e de nanopartículas de ouro em forma de bastão (baseado no procedimento de Nikoobakht e El-Sayed) para obtenção de sondas com perfil óptico adequado para fins analíticos.
- Caracterizar ambas nanopartículas de ouro AuNPs-E e AuNPs-B.
- Ajustar condições para obtenção de sinal de SPR estável e que variava proporcionalmente com a concentração de gentamicina.
- Estudar o efeito da interação entre gentamicina e AuNPs-E na dispersão aquosa em presença de surfactantes.
- Avaliar os parâmetros de mérito das sondas de AuNPs-E e AuNPs-B.
- Avaliar a capacidade seletiva das respostas analíticas.
- Utilizar os métodos para determinar gentamicina em formulações veterinárias.

1.3. Introdução

1.3.1. Aminoglicosídeos

Pesquisas com actinomicetos do solo realizadas por Waksman e seus colaboradores resultaram no isolamento da estreptomicina, que inibiu o crescimento das culturas de bacilos da tuberculose. Essa pesquisa deu início à era dos antibióticos conhecidos como aminoglicosídeos (AMG) (ZEMBOWER *et al.*, 1998; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006). Posteriormente, foram descobertos outros AMG de origem natural com ação antimicrobiana derivadas dos actinomicetos e de outros semi-sintéticos, como os indicados na Tabela 1 (STEAD, 2000).

Tabela 1: Aminoglicosídeos com maior utilidade na terapêutica (Adaptado de Stead, 2000).

Aminoglicosídeos	Data da descoberta	Origem
Estreptomicina	1944	Natural
Neomicina	1949	Natural
Canamicina	1957	Natural
Gentamicina	1963	Natural
Tobramicina	1967	Natural
Amicacina	1972	semi-sintético
Netilmicina	1975	semi-sintético

Os AMG são moléculas constituídas por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à uma hexose ou aminociclitol. Com exceção da estreptomicina, cuja hexose é a estreptidina, nos aminoglicosídeos este aminociclitol é a 2-desoxi-estreptamina, sendo dissubstituída nas posições 4 e 5 ou 4 e 6 (Figura 1) (MAGNET; BLANCHARD, 2005).

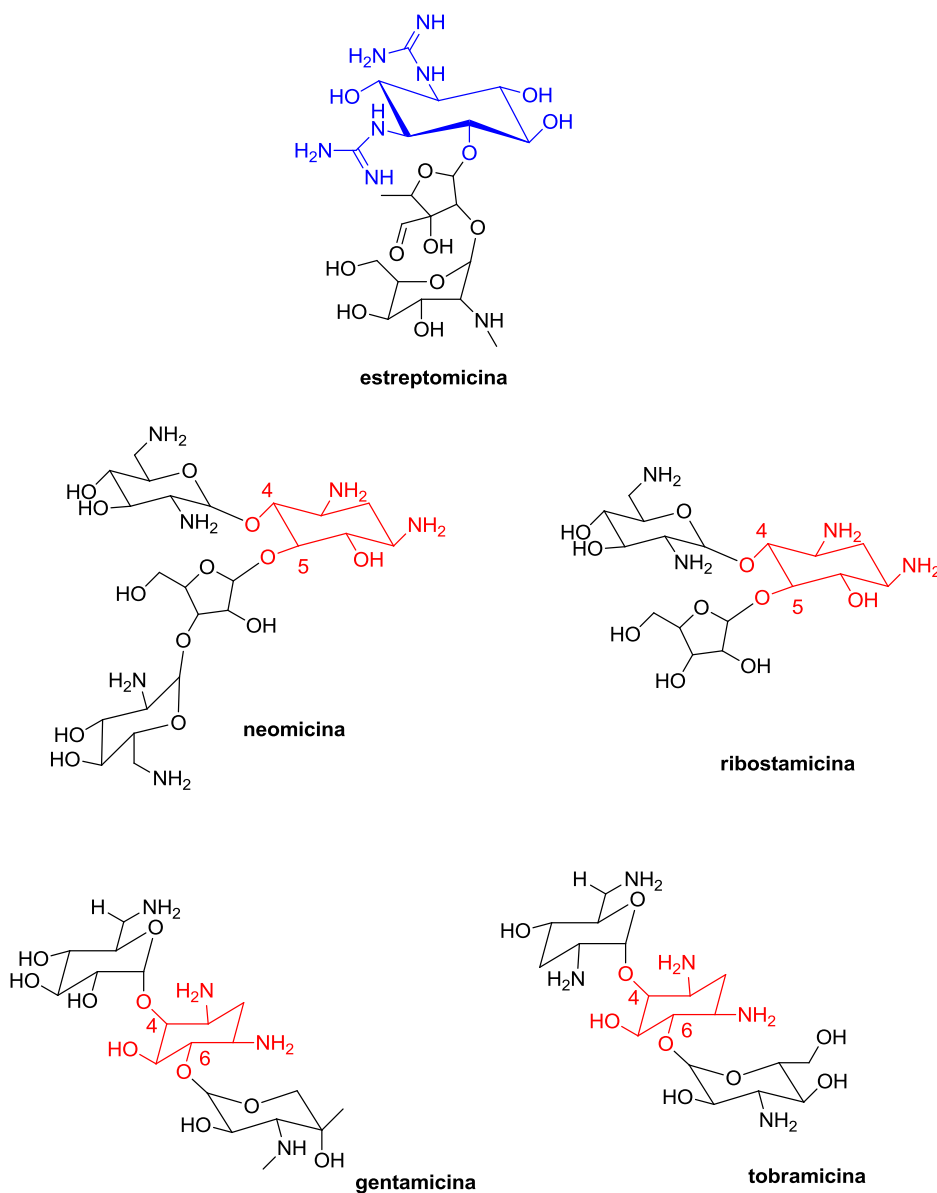


Figura 1. Estruturas dos AMG dissubstituídos nas posições 4 e 5 (neomicina e ribostamicina) e nas posições 4 e 6 (gentamicina e tobramicina) da 2-desoxi-estreptamina e a estreptomicina. O anel em vermelho representa a 2-desoxi-estreptamina e o anel em azul a estreptidina.

Estruturalmente, os AMG possuem um grande número de radicais hidroxila e amina caracterizando-os como substâncias básicas, catiônicas de caráter polar.

Quando na forma de sal (sulfato em geral) elas são altamente solúveis em água. A atividade antimicrobiana ocorre principalmente em meio aeróbio e em pH alcalino e o caráter polar implica em relativa insolubilidade em lipídios, resultando em pouca absorção pelo trato gastrointestinal, penetrando na barreira hemato-encefálica (ZEMBOWER *et al.*, 1998; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006). A insolubilidade dos AMG em lipídios resulta na diminuição de sua concentração em secreções e nos tecidos, pois tem dificuldade de atravessar as membranas biológicas que não tenham um mecanismo de transporte adequado. A eliminação dos AMG ocorre pelos rins, através de filtração glomerular (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

A natureza catiônica dos AMG contribui para a atividade antimicrobiana, exercendo seu efeito bactericida ao se ligarem ao ribossomo bacteriano. Como o ribossomo é o responsável pela síntese das cadeias polipeptídicas, os AMG interagem com a superfície celular ligando-se eletrostaticamente a resíduos carregados negativamente na membrana externa de bacilos Gram-negativos em um processo com gasto mínimo de energia. O transporte através da membrana celular é dependente de energia e de oxigênio, direcionando a atuação dos AMG em microorganismos aeróbicos. Após a entrada no interior da célula, os AMG se ligam à subunidade 30S do ribossomo. Os que contêm anel 2-deoxi-estreptamina também têm a capacidade de se ligarem à subunidade 50S, diminuindo a síntese protéica e produzindo falhas na tradução causando alteração no funcionamento da membrana celular com saída de constituintes essenciais, o que resulta na morte celular (ZEMBOWER *et al.*, 1998; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

O uso clínico dos AMG visa combater infecções causadas por microorganismos aeróbicos e bacilos gram-negativos, incluindo *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e Espécies de *Salmonella*, além de agentes patogênicos Gram-positivos tais como *Staphylococcus* e alguns *estreptococos*, (ZEMBOWER *et al.*, 1998; MAGNET; BLANCHARD, 2005; HERMANN, 2007). Entretanto, o uso clínico deve ser feito com critérios por conta dos efeitos tóxicos como a nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular. (STEAD, 2000; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006). A nefrotoxicidade está relacionada com a ligação do fármaco com o túbulo proximal. Acredita-se que existam receptores específicos no túbulo proximal, onde ocorre endocitose do AMG

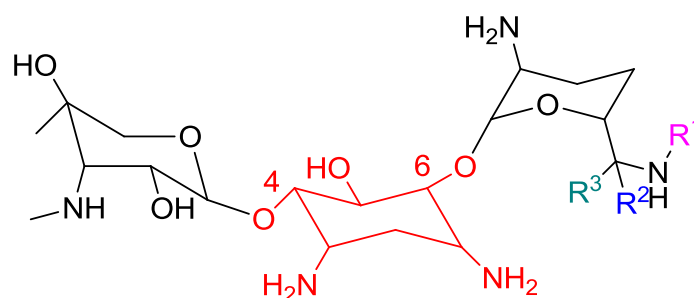
(OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006). A ototoxicidade é referente à acumulação progressiva dos AMG no ouvido interno que é, em grande parte, irreversível e o bloqueio neuromuscular agudo e apneia têm sido observado em pacientes com *miastenia gravis*¹, porém, o bloqueio neuromuscular pode ser invertido com a infusão de gluconato de cálcio(GOODMAN; GILMAN, 2010).

1.3.2. Gentamicina

A gentamicina foi descoberta em 1963, isolada a partir de duas bactérias, a *Micromonospora purpúrea* e a *Micromonospora echinospora* (MASSACHUSETTS *et al.*, 1963). A gentamicina é um fármaco de extrema importância no tratamento de várias infecções grave causadas por bacilos Gram-negativos aeróbicos e *Enterococcus sp* (preferentemente infecções ginecológicas, abdominais, pneumonia e infecções por *Pseudomonas aeruginosa*). Além disso, é bastante acessível por conta de seu baixo custo. Ela é também de uso veterinário, para o tratamento de mastites em bovinos, havendo relatos de contaminação do leite nos animais sob administração do medicamento (MARTINS *et al.*, 2014).

A administração da gentamicina é feita por vias parenteral, oftálmica e tópica (GOODMAN; GILMAN, 2010; RENAME, 2010). Este AMG é composto por dois aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica a posições 4 e 6 do 2-desoxi-estreptamina. A gentamicina é constituída por uma mistura de substâncias designadas como gentamicina C1, C1a, C2, C2a e, ainda, por um componente em menor quantidade, o C2b (Figura 2) (COOPER; MARIGLIANO; TRAUBEL, 1971; COOPER; YUDIS, 1971; COPPER *et al.*, 1971; BAERE; BACKER, 2000; KÜHN *et al.*, 2008; CSERVEN; RADULOVI; VU, 2011; CAUDRON *et al.*, 2013; BIJLEVELD *et al.*, 2014).

¹*Miastenia gravis*: doença caracterizada por distúrbios da transmissão neuromuscular resultando em fraqueza e fadiga da musculatura voluntária (ALMEIDA *et al.*, 2000).



Gentamicina	R ¹	R ²	R ³	Massa g mol ⁻¹
C1	CH ₃	CH ₃	H	477,31
C1a	H	H	H	449,28
C2	H	CH ₃	H	463,30
C2a	H	H	CH ₃	463,30
C2b	CH ₃	H	H	463,30

Figura 2: Estruturas dos componentes da gentamicina

A gentamicina é comercializada na forma de sulfato de gentamicina, a fim assegurar a sua solubilidade em meio aquoso. A escolha do sulfato como contra-íons de estabilização se deve a pequena diferença entre o pK_a do sulfato e dos cátions da gentamicina, o que proporciona, por exemplo, a estabilidade do fármaco (SIKARRA *et al.*, 2012).

1.3.3. Métodos analíticos para determinação de gentamicina

Na estrutura da gentamicina não se tem grupos cromóforos relevantes que propiciem a determinação de quantidades ultratraço deste AMG de forma direta a partir de métodos espectroscópicos. Apesar disso, Flurer *et al.* detectaram por absorciometria (em 195 nm) direta diferentes gentamicinas, após a separação destes

por eletroforese capilar por zona com tampão borato (pH 9.4) (FLURER; WOLNIK, 1994; FLUER, 1995). O limite de detecção (LOD) de 2 g L^{-1} indicou o baixo poder de detecção do método. Em um trabalho similar, porém usando tampão fosfato, Curiel *et al.* Determinaram absorciometricamente as gentamicinas diretamente após a separação eletroforética em capilar. O surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi usado como fase pseudoestacionária (LOD de 2 g L^{-1}) (CURIEL *et al.*, 2007). A determinação absorciométrica (em 415 nm) de sulfato de gentamicina foi feita após a derivatização do analito com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno. A menor concentração da curva analítica foi $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e o método permitiu analisar gentamicina em formulações farmacêuticas (RYAN, 1984). Frutos *et al.*, propôs um método colorimétrico para a quantificação de sulfato de gentamicina (em 400 nm) após a reação de derivatização com ninidrina reagente, este reage com os grupos aminas presentes na estrutura do AMG. A resposta analítica linear cobriu a faixa entre 30 e 120 mg L^{-1} (FRUTOS *et al.*, 2000a). El-Didamony *et al.*, determinaram indiretamente sulfato de gentamicina após a oxidação deste AMG com KMnO_4 em meio com ácido sulfúrico. O sinal analítico medido foi o produzido pelo efeito que o excesso de reagente oxidante causou no indicador (amarantina em 521 nm; laranja ácido 7 em 485 nm; indigocarmina em 610 nm e azul de metileno em 664 nm). O menor LOD obtido foi $5,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ quando se mediu esse efeito no corante indigocarmina (EL-DIDAMONY *et al.*, 2006). O método foi aplicado em formulações farmacêuticas (comprimidos e soluções injetáveis) e os autores obtiveram recuperações satisfatórias. A determinação absorciométrica de diferentes gentamicinas, usando derivatização química com benzeno-1,2-dicarboxaldeído (OPA) e ácido mercaptoacético, foi realizada após a separação eletroforética usando ciclodextrina como fase pseudoestacionária (KAALE *et al.*, 2000). Os valores de LOD variaram de 0,13 a $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ (medidos em 330 nm) dependendo da estrutura da gentamicina.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High performance liquid chromatography*) foi usada na determinação de diferentes gentamicinas usando detecção absorciométrica (em 365 nm) após derivação química com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (ISOHERRANEN; SOBACK, 2000; ARCELLONI *et al.*, 2001). O LOD de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,07 \text{ mg L}^{-1}$ para gentamicina C_1) foi alcançado, as análises foram realizadas em ágar (ARCELLONI *et al.*, 2001),

e os testes de recuperação foram realizados em amostras de plasma sanguíneo (recuperação de 72%), e em amostras de urina (recuperação de 92% (ISOHERRANEN; SOBACK, 2000). A derivatização química com OPA foi usada para a detecção absorciométrica (em 330 nm) de diferentes gentamicinas amostras de leite e de tecido bovino (músculo, fígado e pulmão) por HPLC. Valores de LOD de $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ (em leite) e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (em amostras de tecido bovino) foram alcançados (Kaale, E., Leonard, S. *et al.*, 2000).

A determinação fluorimétrica de sulfato de gentamicina (em 465/530 nm) foi realizada após derivatização química com 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (AL-MAJED *et al.*, 2003). LOD de $0,11 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) foi alcançado, porém a faixa linear dinâmica foi estreita (até $4,2 \text{ mg L}^{-1}$). O método foi usado para a determinação do analito em amostras de formulações farmacêuticas (creme de uso tópico e colírio), e de plasma sanguíneo fortificado com sulfato de gentamicina (após extração líquido-líquido). O nível de sinal produzido pelo branco da reação de derivatização (em geral o que limita a sensibilidade dos métodos medidos em batelada) não foi indicado. A determinação de diferentes AMG, entre estes a gentamicina, foi realizada após a formação de um complexo de transferência de carga entre a gentamicina e safranina em meio com pH 8 que foi extraído em clorofórmio antes de se realizar a medição de fluorescência em 521/545 nm (no caso da gentamicina) (OMAR *et al.*, 2013). LOD de $1,2 \text{ ng L}^{-1}$ e determinações feitas em amostras de plasma sanguíneo humano (fortificado com analito) e de formulações farmacêuticas (solução injetável e creme para uso tópico) foram realizadas. Para as amostras de plasma a recuperação média alcançou apenas 82,7%. Outra abordagem fluorimétrica foi proposta com base na transferência de energia do AMG para o íons Eu^{3+} complexados ao analito em meio aquoso com pH 3,5. A fluorescência em 616 nm, característica do íon lantanídeo, foi afetada pela presença do AMG e seu valor normalizado com o sinal do Eu^{3+} em 592 nm, que é de uma transição não afetada pela presença do AMG (RIZK; ZAKHARI; CARREIRA, 1995). O método cobriu uma faixa de concentração de gentamicina entre 10 e 70 mg L^{-1} e as determinações foram feitas em preparações farmacêuticas (solução injetável e creme para uso tópico) com recuperações entre 98 e 99%. O sulfato de gentamicina também foi determinado por detecção fluorimétrica (340/455 nm) em suspensões de lipossomas após derivatização química com OPA (GUBERNATOR;

DRULIS-KAWA; KOZUBEK, 2006). A quantidade de gentamicina quantificada pelo método ficou entre 0,5 e 4,0 μg . Esse mesmo procedimento foi adaptado para HPLC de modo a se permitir a determinação de diferentes gentamicinas em amostras de tecido bovino (SAR; LEROY; NLCOLAS, 1993). A detecção fluorimétrica foi feita em 340/440 nm com LOD de até 25 ng g^{-1} (em amostras de músculo).

HPLC acoplada com detecção por espectrometria de massa (MS) foi intensamente usada na quantificação de gentamicina em amostras diversas. Abordagens usando triplo quadrupolo tandem MS, MS com ionização elétrica do analito na névoa (electrospray) com e sem armadilha para íons (íon trap) entre outras abordagens, são reportadas (CHERLET; BAERE; BACKER, 2000; HELLER *et al.*, 2005; LOFFLER; TERNES, 2003; TURNIPSEED *et al.*, 2009; STYPULKOWSKA *et al.*, 2010; BAIETTO *et al.*, 2010; VUCICEVIC-PRCETIC; CSERVENAK; RADULOVIC, 2011; LEHOTAY *et al.*, 2013; BIJLEVELD *et al.*, 2014). Em alguns casos, a derivatização do analito foi necessária (TURNIPSEED *et al.*, 2009). Amostras variadas foram analisadas como tecidos como rins, músculos, em leite, plasma sanguíneo e em formulações farmacêuticas. Procedimentos de tratamento de amostra como extração e microextração em fase sólida e líquido-líquido foram aplicados para permitir a limpeza das amostras. Valores de LOD variam de 12,8 mg mL^{-1} (leite)(TURNIPSEED *et al.*, 2009) a 0,5 ng g^{-1} (tecidos biológicos) (CHERLET; BAERE; BACKER, 2000). HPLC com detecção eletroquímica (amperometria pulsada) com eletrodo de trabalho de ouro foi usado para determinar diretamente as diferentes gentamicinas(ADAMS *et al.*, 1998). Apesar da tendência do eletrodo de ouro perder a resposta em função da passivação da sua superfície, o método foi usado para quantificar gentamicinas em amostras de formulações farmacêuticas com LOD absoluto de 20 ng. Duas abordagens fizeram uso da detecção amperométrica em eletrodos modificados com anticorpos anti-gentamicina que, na presença de gentamicina, desencadeia um processo redox, que por sua vez, gera o sinal eletroquímico (ES *et al.*, 2001; KHALDEEVA *et al.*, 2002). Por conta da reação imunológica, tem-se um processo bem seletivo. Limites de detecção de 1 ng L^{-1} foi reportado e amostras de leite e de formulações farmacêuticas foram analisadas.

Finalmente, análise por injeção em fluxo foi usada para se determinar indiretamente a gentamicina em amostras de formulações farmacêuticas a partir da reação com o peróxi-oxalato na presença de acetilcisteína (produção de quimiluminescência, devido a reação com o analito que gera uma cadeia de transferência de energia para um fluoróforo) ou do luminol (por supressão de luminescência) (FERNANDEZ-RAMOS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2010). O ambiente de baixo sinal de fundo propiciou valores de LOD de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ (FERNANDEZ-RAMOS *et al.*, 2006) e $2,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (SANTOS *et al.*, 2010). Os métodos foram aplicados na análise de formulações farmacêuticas (colírios e formulações injetáveis).

1.3.4. Nanomateriais e nanopartículas metálicas

A Química dos Materiais é um ramo emergente que se dedica à síntese (preparação), caracterização, compreensão de propriedades e estudos de aplicações de compostos que possuem alguma função objetivando o desenvolvimento ou melhoras tecnológicas (ZARBIN, 2007). Apesar do recente reconhecimento da Química dos materiais, por anos a denominada Ciência dos materiais era restrita a Engenharias concentrando-se nos aspectos macroscópicos dos materiais. Entretanto, com o desenvolvimento de novas técnicas de análise e o surgimento de novos materiais com diferentes propriedades, estabeleceu-se a Química dos Materiais (ZARBIN, 2007).

Nanotecnologia é um termo que se refere a um conceito de tecnologia que vai além do controle de materiais e da engenharia em microescala. O termo nanotecnologia se refere ao estudo do fenômeno e da manipulação de sistemas físicos que produzem informações significativas em uma escala conhecida como nano ($10^{-9} \text{ m} = 1 \text{ nm}$) com dimensões típicas que não excedam 100 nm em pelo menos uma dimensão, permitindo a caracterização, produção e aplicação de sistemas e componentes em nanoescala (CASANOVA, 2010). Em nanomateriais, as propriedades físico-químicas estão relacionadas aos efeitos quânticos e de

superfície que ocorrem nesses sistemas. O emprego de ferramentas da química para preparar, caracterizar e compreender as propriedades de nanopartículas com tamanhos, formas, composições e estruturas distintas corresponde à nanoquímica. Este conceito de nanoquímica é de extrema importância, pois está interligado aos conceitos de química verde, na qual propõe processos limpos, com maior eficiência energética e a utilização de menor quantidade de matéria o que resulta em menos resíduo químico e a possibilidade de utilização de fontes renováveis (CASANOVA, 2010; SANTOS, 2014).

As nanopartículas metálicas possuem propriedades físicas e químicas dependentes do seu tamanho e forma. A redução do tamanho às dimensões nanométricas levam os materiais a possuírem comportamento intermediário entre o bulk (sólido massivo) e o molecular. Além disso, outra propriedade diretamente relacionada com a diminuição do tamanho das partículas é o aumento de sua área superficial, melhorando a sua eficiência em aplicações que sejam dependentes de sítios superficiais, como a catálise (OTUBO, 1999). A redução do tamanho das partículas faz com que os fenômenos sejam compreendidos pela física quântica, pois, à medida que as dimensões das partículas diminuem a influência das forças gravitacionais e do atrito diminuem ao passo que outras como forças eletrostáticas (dependentes das configurações eletrônicas) tornam-se relevantes (SANTOS, 2014).

As nanopartículas são termodinamicamente instáveis e têm a tendência natural de se agregar e crescer, tornando-se um grande desafio o preparo de nanopartículas estáveis e monodispersas, tanto com relação ao tamanho quanto com relação à forma. Dessa maneira, diversas pesquisas buscam novas metodologias para a síntese ou funcionalização voltados para o aumento da estabilidade química (CASANOVA, 2010).

No caso das nanopartículas muito pequenas, existe um aumento considerável da fração de átomos na superfície. Estes átomos apresentam diferentes características com respeito aos do interior das nanopartículas, devido a menor coordenação e maior exposição ao meio externo. Os átomos na superfície podem-se associar através de ligações com outras espécies que podem alterar a estrutura eletrônica das nanopartículas, e desse mesmo modo, modificando também as propriedades físicas habilitam os estados eletrônicos.

As propriedades ópticas das nanopartículas são dominadas pelos efeitos de superfície e se deve à interação luz-matéria a níveis nanoscópicos. Estas propriedades podem ser controladas pelo tamanho das nanopartículas. As nanopartículas metálicas tem a particularidade de gerar bandas de ressonância plasmônica de superfície (SPR do inglês *Surface Plamon Resonance*) localizadas, quando interagem com a radiação eletromagnética. A posição espectral dessas bandas de SPR depende tanto do tamanho quanto da forma das nanopartículas, sendo responsável pelas diferentes colorações das dispersões aquosas ou filmes de nanopartículas. Entre as nanoestruturas metálicas mais conhecidas encontram-se as partículas de forma esféricas, as de forma de bastões, e as películas com núcleo dielétrico. Mais recentemente tem-se reportado outras nanopartículas na forma de cubos, triângulos, estrelas e ovoides. Os plasmons de superfície são as propriedades ópticas mais destacadas das nanopartículas sendo derivados de oscilações coletivas da densidade de carga eletrônica superficial que ocorre na interfase metal/dielétrico. Em relação a este, existe um campo eletromagnético que se propaga ao longo da interfase, cuja amplitude decai exponencialmente na direção normal à superfície, conforme demonstrado na Figura 3.

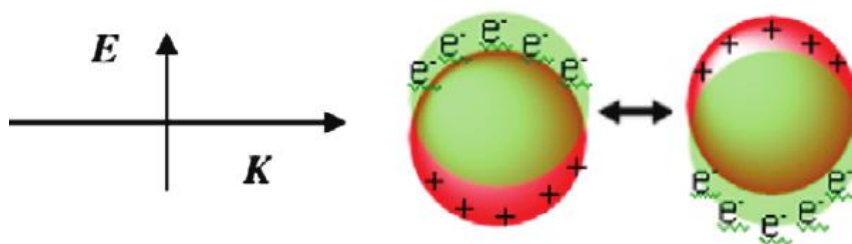


Figura 3: Ilustração da superfície plasmônica ressonante nas nanopartículas (Adaptado de HUANG; EL-SAYED, 2010).

1.3.5. Nanopartículas de ouro

A primeira síntese de ouro coloidal foi relatada em meados do século XIX por Faraday e desde então muitos métodos de preparação de nanopartículas vem sendo desenvolvidos (CASANOVA, 2010). A redução do ouro em meio aquoso é um método extremamente versátil, de custo relativamente baixo comparado a outros métodos de produção de nanoestruturas metálicas, além de apresentar vantagem de controle das propriedades individuais das nanopartículas, possibilidade de manipulação pós-síntese, e a fácil modificação química da superfície das nanopartículas no momento da preparação (CASANOVA, 2010, JAIN; EL-SAYED; EL-SAYD, 2007, BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2008, ROCHA, 2008). Apesar de existirem inúmeros métodos para a síntese de nanopartículas de ouro, a síntese coloidal, é a mais comum e baseia-se em quatro componentes: meio, precursor, agente redutor e estabilizante. Na qual, o meio é a fase líquida onde a reação química irá ocorrer e o precursor é o composto químico que irá fornecer o material para formar as partículas. Os agentes redutores podem ser compostos químicos que fornecem elétrons por meio de uma reação química diretamente ou sob efeito de algum agente externo, que pode ser luz ou temperatura, por exemplo. Os ligantes estabilizantes recobrem a superfície das nanopartículas, mantendo-as afastadas umas das outras e dispersas no meio (ROCHA, 2008). Na síntese de nanopartículas, as substâncias que atuam como estabilizadores controlam tanto a velocidade de redução dos íons metálicos como o processo de aglomeração, incluindo processos químicos como a adsorção de íons (MUNOZ, 2013).

Como foi mencionado anteriormente, Faraday foi o primeiro em reportar síntese de nanopartículas de ouro, ele propôs o método da redução de um sal de ouro hidratado em disulfeto de carbono, obtendo-se uma mistura de bifásica, na qual a parte aquosa de cor vermelho-tinto continha partículas de ouro dispersas. Turkevitch (1951) produziu nanopartículas de ouro esféricas a partir de uma mistura reacional aquosa de ácido cloroáurico (HAuCl_4) e citrato de sódio (redutor) na presença de aquecido e sob agitação constante. Deste modo, a velocidade de agitação, a temperatura de aquecimento, a proporção entre o precursor ouro e o citrato de sódio, assim como a ordem de adição dos reagentes influenciam na

distribuição de tamanho e forma das nanopartículas, e conseqüentemente nas propriedades óticas (MUNOZ, 2013).

Como dito, os efeitos de cor das nanopartículas de ouro são conseqüência do confinamento quântico dessas partículas e estão relacionados a mudanças na superfície plasmônica ressonante. Quando partículas de metal são expostas à luz, o campo eletromagnético da luz induz a uma oscilação dos elétrons livres (elétrons da banda de condução) do metal. Esta oscilação coletiva coerente de elétrons em torno das partículas faz com que a superfície resulte em uma separação de cargas respectiva à estrutura iônica, formando um dipolo oscilante ao longo da direção do campo elétrico da luz (Figura 3) (HUANG; EL-SAYED, 2010).

A amplitude de oscilação atinge o máximo a uma frequência específica, na qual induz uma forte absorção da luz incidente formando a banda de SPR. A banda SPR é muito mais forte para nanopartículas como ouro e prata comparando-se com as de outros metais. A intensidade da banda SPR e o perfil espectral dependem dos fatores que afetam a densidade de carga do elétron na superfície das partículas, ou seja, o tipo de metal, tamanho de partícula, forma, estrutura, composição e a constante dielétrica como descrito pela teoria de Mie (HUANG; EL-SAYED, 2010).

Quando as AuNPs tendem à esfericidade, uma única de banda de SPR ocorre na faixa torno de 500 nm. Na medida em que o tamanho das AuNPs aumentam a banda tende a se alargar e diminuir de intensidade por conta do efeito na ressonância de elétrons. Quando se aglomeram, uma banda decorrente de acoplamento de plasmon aparece na faixa de 700 nm, com diminuição da banda de SPR original. Quando as AuNPs são na forma de bastões é observado a formação de duas bandas (Figura 4), uma delas mais intensa e correspondente a oscilações de elétrons ao longo do eixo (banda longitudinal) e uma outra banda mais fraca na região do visível num comprimento de onda semelhante ao do ouro (banda transversal). Enquanto a banda transversal é insensível às alterações de tamanho, a banda longitudinal é deslocada em grande parte do visível ao infravermelho fazendo com que a cor muda de azul para vermelho (HUANG; EL-SAYED, 2010).

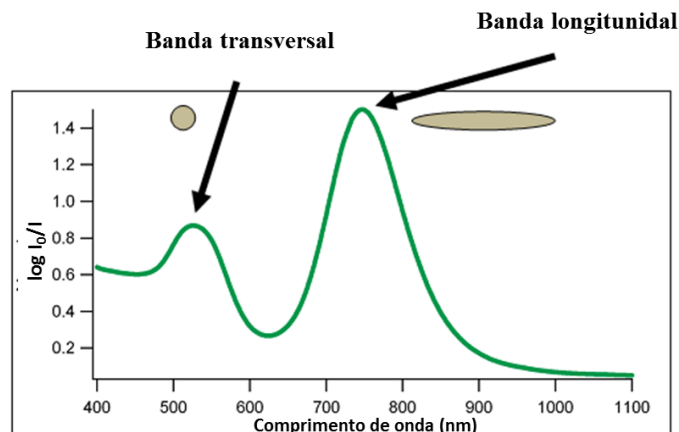


Figura 4: Espectro SPR transversal e longitudinal das nanobastões de ouro.

As nanopartículas de ouro em forma de bastão podem ser geradas utilizando a técnica mediada por “semente”, relatada por Nikoobakht e El-Sayed, na qual são geradas nanopartículas de ouro esféricas na presença de um forte agente redutor. Essas nanopartículas são adicionadas à solução de crescimento que contém o precursor de ouro, que será reduzido e depositado sobre as sementes. Nesse caso, usualmente emprega-se na solução de crescimento um agente redutor mais fraco, tal como o ácido ascórbico (NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003). O processo de crescimento é acertado para ser cineticamente controlado, de tal modo que o sal do metal é primeiro reduzido para um estado intermediário de modo que apenas a redução catalisada na superfície da nanopartículas é permitida. Os agentes tensoativos podem ser adicionados para induzir crescimento anisotrópico. Por exemplo, as sementes, as concentrações de sal e de estabilizador e outros parâmetros podem ser ajustados para gerar nanobastões. O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) é amplamente usado na síntese de nanobastões, este composto faz seletivamente uma bicamada apertada nas fases laterais dos nanobastões, o que deixa as extremidades mais expostas, facilitando o crescimento anisotrópico ao longo do eixo longitudinal. Além disso, os nanobastões estão carregados positivamente e sua repulsão mútua previne a agregação de modo que a dispersão encontra-se numa forma estável.

A compreensão do processo de extinção de luz por nanopartículas foi primeiramente estudada pelo físico Gustave Mie, que tratou o termo absorção (A)

de luz como uma unidade de extinção (δ_{ext}), ou seja, a quantidade de luz que chega ao detector de um espectrofotômetro, após atravessar uma suspensão diluída de nanopartículas, é uma contribuição da radiação absorvida pelas nanopartículas (δ_{abs}) e da radiação espalhada (dispersada) (δ_{sca}). Onde a extinção (absorvância total) é dada por $\delta_{\text{ext}} = \delta_{\text{abs}} + \delta_{\text{sca}}$. A extinção está associada com a secção transversal das partículas esféricas (Equação 1), podendo-se relacionar a radiação espalhada com o tamanho da partícula (Equação 2). A Equação 3 foi formulada por Mie para o coeficiente de extinção em nanopartículas, considerando a intensidade de radiação absorvida por uma amostra (ZAMARION, 2008; CASANOVA, 2010; SANTOS, 2014).

$$\delta_{\text{ext.}} = (2\pi/k^2) \sum (2L+1) \text{Re}(a_L + b_L) \quad (1)$$

$$\delta_{\text{abs}} = (2\pi/k^2) \sum (2L+1) (a_L^2 + b_L^2) \quad (2)$$

$$\delta_{\text{sca}} = (2\pi/EmK_0^2) \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \text{Re}(a_n + b_n) \quad (3)$$

Onde, k é um parâmetro proporcional à dimensão da partícula, L está relacionado à ordem de excitação ($L=1$, excitação dipolar), a_L e b_L são parâmetros expressos por funções do tipo Ricatti-Bessel empregadas na resolução das equações de Maxwell. Re indica que a parte real dos parâmetros é empregada, a_n e b_n são os coeficientes de Mie e n é a ordem da excitação do multipolo esférico das nanopartículas (ZAMARION, 2008; CASANOVA, 2010; SANTOS, 2014).

A soma de ondas parciais está relacionada à resposta óptica das nanopartículas metálicas. O índice do somatório indica a ordem de onda parcial descrita pelo harmônico esférico vetorial correspondente ao campo elétrico ou magnético, e também à ordem de excitação multipolar na nanopartículas. Assim, $n = 1$ corresponde a campos de dipolo e $n = 2$ corresponde a campos de quadrupolo com as respectivas excitações coletivas multipolares nas partículas. Nessas equações, a e b são constantes (Castilho *et al.*, 2011; Santos, 2014).

A análise da banda espectral da superfície plasmônica ressonante fornece informações sobre tamanho, estrutura e agregação das nanopartículas. O perfil dos espectros no UV-vis e o coeficiente de extinção são importantes para calcular

a concentração ou estimar o tamanho das nanopartículas conforme Equação 4 e Equação 5 (LIU *et al.*, 2007).

$$N = (\pi\rho D^3)/(6M) \quad (4)$$

$$C = N_T/(NVNA) \quad (5)$$

Onde, N é o número de átomos de ouro calculado para o sistema; D é o diâmetro das partículas (nm); ρ é a densidade do bulk de esferas de ouro cujo valor é $19,3 \text{ g cm}^{-3}$; M é massa molar do ouro cujo valor é 197 g mol^{-1} ; N_T é o número total de átomos de ouro encontrado através da massa inicial da fonte de ouro; V é o volume da solução sintetizada (em litros), e N_A é a constante de Avogadro (LIU *et al.*, 2007; SANTOS, 2014).

1.3.6. Interação entre AMG e nanopartículas de ouro

A interação entre AMG e AuNPs tem sido estudada visando compreender a natureza da interação e o potencial uso das nanopartículas como meio de transporte de AMG no organismo vivo ou no efeito sinérgico da ação dos AMGs quando associados às nanopartículas. No entanto, pode-se dar destaque ao número de trabalhos que tentam fazer uso das propriedades das AuNPs, tais quais ou modificadas de algum jeito, para sondar os AMGs no intuito de detecta-los ou quantifica-los.

Um dos primeiros trabalhos relacionando a influência dos AMG na ressonância plasmônica de superfície das AuNPs esféricas (AuNPs-E) foi publicado em 2007 por Grace *et al.*, os autores avaliaram três AMG, dentre eles a gentamicina. As AuNPs-E foram revestidas com os AMG num meio reacional contendo o antibiótico dissolvido (NIRMALA GRACE; PANDIAN, 2007). Apesar do objetivo do trabalho ter sido a avaliação do potencial antibiótico do sistema AMG-AnNPs-E, técnicas como espectroscopia no UV-vis e no infravermelho, além de microscopia eletrônica de transmissão, foram usadas para estudar a interação das

drogas com a superfície das AuNPs-E. Os resultados demonstraram uma forte afinidade das nanopartículas com pelos os grupos nitrogenados dos aminoglicosídeos.

Em 2009, Wang *et al.*, descreveram a utilização de AuNPs-E revestidas com prata como sondas para determinação de AMG em plasma humano (canamicina A, neomicina, gentamicina, e paromicina) por espectrometria de massas com dessorção e ionização por laser. O LOD para gentamicina foi de 180 nmol L^{-1} (WANG *et al.*, 2009). Zhu *et al.* (2011) desenvolveram um método analítico utilizando nanobastões de ouro AuNPs-B modificados com anticorpos para determinação quantitativa de gentamicina. Neste estudo a dispersão coloidal de síntese de AuNPs-B, que continham o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), foi submetida a um processo para a remoção de excesso do surfactante no meio, de modo a facilitar o capeamento da superfície das AuNPs-B com os anticorpos e forçar a organização dos nanobastões na forma de aglomerados empilhados. Na presença de gentamicina, a interação do AMG com o anticorpo força a separação dos aglomerados nas estruturas manométricas individuais, proporcionando o aumento da intensidade das bandas de SPR de modo diretamente proporcional à quantidade de gentamicina. Desta forma os autores relataram um LOD de $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$ ($7,1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) e uma faixa de resposta linear até 20 ng mL^{-1} ($2,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) (ZHU *et al.*, 2011).

Em 2012, Derbyshire *et al.* (2012) combinaram aptameros de RNA com AuNPs-E para a determinação de canamicina, paromomicin, dihydrostreptomycin, estreptomicina, apramicina, tobramicina, neomicina e gentamicina. Os aptameros foram adsorvidos fisicamente na superfície das AuNPs-E, estabilizando-as na forma dispersa. A presença dos AMG promoveu a aglomeração das AuNPs com a diminuição da banda de SPR transversal e aumentando a banda de acoplamento de plasmon por aglomeração, com conseqüente mudança na coloração da dispersão do rosa para o azul. Essa mudança foi gradual e proporcional à concentração de AMG, o que permitiu a quantificação dos AMG a partir da variação do sinal normalizado pela razão das intensidades medidas em 650 nm (banda decorrente da aglomeração) e a de 530 nm (banda de SPR transversal). Esse sinal (I_{650}/I_{530}) permitiu a melhor

linearização da resposta analítica, que cobriu a faixa entre 180 e 500 nmol L⁻¹ (DERBYSHIRE et al., 2012).

Apyari *et al.* (2013) descreveram um método espectrofotométrico para a determinação de neomicina baseado na agregação das AuNPs-E sintetizadas em presença de etilenodiaminotetracetato de sódio, o qual desempenhou um papel importante na dispersão e no mascaramento de cátions de metais. O método permitiu determinar, neomicina com limite de detecção de 28 ng mL⁻¹ ($3,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) usando a razão dos sinais (I₇₀₀/I₅₂₀) (APYARI *et al.*, 2013). No mesmo ano de 2013, Wang *et al.* desenvolveram um método para determinação de três AMG (tobramicina, gentamicina, amicacina) utilizando AuNPs como sondas analíticas. O método baseou-se na alteração da cor da dispersão coloidal, induzida pela agregação das AuNPs. A concentração de gentamicina, amicacina e tobramicina puderam ser determinadas relacionando com a variação do sinal normalizado I₆₅₀/I₅₁₈. Desta maneira o autor relatou LOD de $6,1 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, para a gentamicina (WANG *et al.*, 2013).

Recentemente, em 2014, Santos *et al.*, desenvolveram um método para a determinação de tobramicina na presença de estreptomicina, utilizando dispersões coloidais de AuNPs-E. A síntese de AuNPs foi realizada empregando um uma variação do processo utilizado por Turkevich. A quantificação de tobramicina foi feita monitorando-se as intensidades de sinais nos comprimentos de onda de 526 nm (banda de SPR transversal) ou em 681 nm (banda de aglomeração), na faixa de concentração de $4,0 \times 10^{-9}$ até $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de tobramicina. A resposta analítica apresentou boa linearidade mesmo não se utilizando a razão entre os sinais, que outros autores reportaram. Os autores provaram que na faixa de concentração em questão, a estreptomicina, não provoca efeito no sinal da sonda de AuNPs-E. O LOD reportado foi $3,8 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ para a tobramicina (em 681 nm).

Em 2015, Gokhan e Onur relatam a detecção de amins primaria utilizando AuNPs dopadas com európio e capeadas com ácido lipóico. O ensaio foi baseado na fluorescência do complexo formado entre amins primarias e ácido lipóico na superfície das nanopartículas dopadas com európio. Este método foi utilizado para a determinação de três aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, e tobramicina) em amostras de leite. A quantificação dos AMG foi determinada através da extinção

de fluorescência em 315 nm em pH 5. Os autores reportaram LOD de $7,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para a gentamicina (CAGLAYAN; ONUR, 2015).

2

2.1. Materiais, Instrumentação e procedimentos experimentais

2.1.

2.1.1. Materiais e Reagentes

2.1.1.

2.1.1.1. Reagentes

Para preparação de todas as soluções e dispersões aquosas utilizou-se água ultrapura (purificada em sistema Milli-Q, Millipore, modelo Simplicity185, EUA). Na síntese das nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs-E) foi usado citrato de sódio monobásico P.A. (99,5%) e ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, > 99,9%) ambos da Sigma-Aldrich (EUA). Na síntese das nanopartículas de ouro em forma de bastão (AuNPs-B) foi empregado além do $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, 98%), nitrato de prata (99,0%), ácido ascórbico (99%) e borohidreto de sódio (99,9%) todos também adquiridos da Sigma-Aldrich.

As soluções padrões de gentamicina foram preparadas utilizando sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich). As instruções do padrão de sulfato de gentamicina indicam que em sua composição se tem $\leq 45\%$ de sulfato de gentamicina C_1 ($M = 575,6 \text{ g mol}^{-1}$), $\leq 30\%$ de sulfato de gentamicina C_{1a} ($M = 547,5 \text{ g mol}^{-1}$) e $\leq 35\%$ de sulfato de gentamicina C_2 ($M = 561,6 \text{ g mol}^{-1}$). Ponderando as percentagens pelo fator 110 (soma das percentagens máximas indicadas para cada tipo de gentamicina) se teria: 41% de sulfato de gentamicina C_1 ; 27% de sulfato de gentamicina C_{1a} e 32% de sulfato de gentamicina C_2 . Ou seja, a massa molar ponderada do sulfato de gentamicina usada para se calcular a concentração molar dos padrões foi de $563,5 \text{ g mol}^{-1}$.

Nos testes para avaliação de interferências foram utilizados ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), metabissulfito de sódio (>99%), metilparabeno (>99%), propilparabeno (>99%), e cloridrato de bromexima (>99%), todos obtidos da Sigma-Aldrich.

Além do CTAB, os outros surfactantes usados foram surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS) e polioxietilen(20)sorbitanmonolaurato (Tween-20) da Sigma Aldrich. Etanol, hidróxido de sódio e ácido sulfúrico (98%) foram comprados da Merck, ninidrina (95%) e fosfato de potássio monobásico foram comprados na Sigma Aldrich.

Os produtos farmacêuticos (ampolas com soluções injetáveis comerciais) utilizados para avaliar os métodos analíticos foram identificados como A e B. A formulação A contém 44 mg de sulfato de gentamicina por mL de solução (indicado pelo fabricante) com densidade entre 1,01 e 1,04 g mL⁻¹). Esta formulação foi adquirida no comércio local e o laboratório Ourofino (Brasil) é o responsável pela sua produção. A formulação B contém 40 mg de sulfato de gentamicina por mL de solução (indicado pelo fabricante), o laboratório responsável é o Chemitec (Brasil), e a mesma também foi adquirida no comércio local. Ambas as formulações são indicadas para uso veterinário.

2.1.2. Outros materiais

Na preparação das soluções foram empregadas micropipetas manuais de volumes ajustáveis entre 500 a 5000 µL, 100 a 1000 µL, e de 10 a 100 µL (Brand, Alemanha), todas calibradas pelo *Laboratório de caracterização de fluidos – LCF/PUC-Rio*. Balões volumétricos (250,00; 100,00; 50,00; 25,00; 10,00; e 5,00 mL) e pipetas volumétricas de vidro (25,00; e 10,00 mL) foram usados.

2.2. Instrumentação

As medições espectrofotométricas no UV-vis foram realizadas em um espectrofotômetro UV/Vis do tipo duplo feixe, modelo Lambda 35 da Perkin Elmer (EUA). As imagens das dispersões coloidais de nanopartículas de ouro foram adquiridas com um microscópio eletrônico de transmissão operando no modo de varredura (STEM) modelo JSM-6701 F da JEOL (Japão).

Nas medições de pH utilizou-se pHmetro modelo MPA 210 Tecnopon (Brasil) com eletrodo de membrana de vidro combinado com um de referência de Ag/AgCl_(KCl sat). Na remoção do excesso de CTAB das dispersões coloidais AuNPs-B empregou-se uma centrífuga (Thermo Scientific, modelo Sorwal Biofugue Stratus, EUA).

Na síntese das AuNPs-E e das AuNPs-B utilizou-se chapa de aquecimento com agitação magnética modelo Go Stirrer, MS-HPro (Go-Lab, China).

2.3. Procedimentos

2.3.1. Síntese de nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs-E)

As sínteses das nanopartículas de ouro esféricas foram realizadas com base no procedimento descrito por Turkevich (1951), usando citrato de sódio monobásico como agente redutor e o ácido cloroáurico como fonte de ouro. Em um balão volumétrico de fundo chato de 250,00 mL, adicionou-se 95 mL de solução de HAuCl₄.3H₂O contendo o total de 5 mg de ouro. A solução foi aquecida até entrar em ebulição sob agitação magnética constante (900 rpm). Em seguida, 5 mL de uma solução (1% m/v) de citrato de sódio monobásico foi adicionada mantendo-se agitação e aquecimento por mais 25 min. Ao final, obteve-se uma dispersão aquosa límpida e de coloração vermelho-tinto que foi denominada dispersão-estoque.

2.3.2. Síntese de nanobastões de ouro (AuNPs-B)

As sínteses das nanopartículas de ouro em forma de bastão (AuNPs-B) foram feitas com base no procedimento descrito por Nikoobakht e El-Sayed (NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003). A síntese visou obter AuNPs-B com abundância longitudinal de ressonância plasmônica de superfície abaixo de 850 nm. Para tal, a denominada solução-semente foi preparada em um balão de fundo redondo de 10 mL onde se misturou 5 mL de uma solução $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de CTAB, 5,0 mL de uma solução $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, sob agitação vigorosa (observando-se mudança na coloração de amarelo para alaranjado). Em seguida, adicionou-se 0,60 mL de uma solução gelada e recém preparada de borohidreto de sódio (10 mmol L^{-1}). A agitação foi mantida por 2 min, tempo no qual se observou a mudança de coloração da solução para marrom. Esta solução foi estocada à temperatura ambiente. A síntese das AuNPs-B foi feita em um balão de fundo redondo de 25 mL onde se adicionou as seguintes soluções aquosas: 5 mL de solução de CTAB (200 mmol L^{-1}); 0,25 mL de solução AgNO_3 (4 mmol L^{-1}) e 5,0 mL de solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol L^{-1}) sob agitação. Em seguida adicionou-se 70 μL de uma solução 80 mmol L^{-1} de ácido ascórbico, e o meio tornou-se incolor. Na etapa final foi feita a adição de 12 μL da solução semente ao meio reacional, permitindo o crescimento dos nanobastões na dispersão. A reação foi mantida a 30°C em um banho termostaticado, sob agitação por 2 h.

2.3.3. Preparo das soluções

Soluções estoque de sulfato de gentamicina foram preparadas diariamente pela dissolução de 0,024 g do padrão em 5,00 mL de água ($8,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ou $4,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Volumes apropriados dessa solução foram usadas para preparar as dispersões de trabalho na etapa de otimização dos métodos e para construção das curvas analíticas. Para o método colorimétrico, usado para comparação de resultados, a solução padrão de sulfato de gentamicina foi preparada em concentração mais elevada ($3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Soluções estoque dos surfactantes CTAB ($1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), SDS ($1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e Tween-

20 ($7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (usadas nos estudos que avaliaram o efeito do surfactante na interação entre a gentamicina e as AuNPs-E), as soluções de metabissulfito de sódio, EDTA disódico (usados nos estudos de potenciais interferentes) e de ninidrina (usada no método colorimétrico comparativo) foram preparadas dissolvendo massas apropriadas destas substâncias em água ultrapura. As soluções de metilparabeno, propilparabeno e bromexina (usados nos estudos de potenciais interferentes) foram preparadas dissolvendo massas apropriadas destas substâncias em etanol (metilparabeno, propilparabeno) e metanol (bromexina). As amostras das formulações farmacêuticas de uso veterinário (soluções injetáveis aquosas) foram preparadas diluindo-se volumes apropriados em água ultrapura, de modo a se obter soluções diluídas com concentração de sulfato de gentamicina de $4,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (com base no valor original indicado na bula). Alíquotas dessas soluções foram adicionadas nas dispersões de trabalho para quantificação dos medicamentos nos métodos propostos. Para o método colorimétrico (comparativo), as solução das amostras foram preparadas de modo a se obter soluções diluídas em água contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (com base no valor original indicado na bula).

2.3.4. Preparo das dispersões de trabalho de AuNPs

Todas as dispersões aquosas de AuNPs-E e AuNPs-B usadas como sondas analíticas (dispersões de trabalho) foram feitas em recipientes de vidro já que as AuNPs tentem a adsorver na superfície de recipientes de material plástico (Santos *et al.*, 2014). Após contato com as dispersões de AuNPs, todo o material de vidro foi lavado com detergente Extran (Merk) seguido da imersão, durante 12 h, em banho de ácido nítrico 10 % v/v. Esse material foi enxaguado por cinco vezes com água destilada e posteriormente com água ultrapura.

A dispersão-mãe (40% v/v) foi preparada diluindo 40,00 mL da dispersão de síntese de AuNPs-E em água ultrapura, num balão volumétrico de 100,00 mL. Alíquotas de 4,00 mL dessa dispersão foram transferidas para balões volumétricos de 5,00 mL, onde se adicionou alíquotas de solução padrão de sulfato de gentamicina ou de soluções amostra, além de algum outro coadjuvante (surfactante

no estudo do efeito de surfactantes ou potencial interferente no estudo de interferências). Em seguida, o volume do balão foi ajustado para 5,00 mL com adição de água ultrapura.

Nos estudos com surfactantes, alíquotas dos mesmos foram adicionadas às dispersões de trabalho de modo a se ter, após ajuste final de volume as seguintes concentrações de surfactante: i) abaixo da concentração crítica de micela (CMC), ii) próximo à CMC e iii) acima da CMC. Para o CTAB, i) $6,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ii) $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, iii) $3,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; para o SDS, i) $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ii) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, iii) $1,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; para o Tween-20, i) $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ii) $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, iii) $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

As dispersões de trabalho de AuNPs-B foram preparadas adicionando-se 800 μL da dispersão de síntese centrifugada de AuNPs-B em balões volumétricos de 5,00 mL, seguido da adição de volumes apropriados de solução padrão de sulfato de gentamicina ou de solução diluída das amostras. O volume final das dispersões foi ajustado com a adição de água ultrapura.

Nos estudos de interferência, seja nas dispersões de trabalho AuNPs-E ou de AuNPs-B, incorporou-se, antes do ajuste final de volume com água ultrapura, 25 μL de solução $4,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina e 25 μL de uma das seguintes soluções (nas concentrações indicadas): metabisulfito de sódio ($0,48 \mu\text{g L}^{-1}$, $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ e $4,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); metilparabeno ($0,48 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,24 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,048 \mu\text{g mL}^{-1}$); Propilparabeno ($0,0048 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,024 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,0048 \mu\text{g mL}^{-1}$); EDTA ($0,0048 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,024 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,0048 \mu\text{g mL}^{-1}$); solução de hidróxido de sódio ou ácido sulfúrico (na faixa de pH de 3,0 a 5,5).

2.3.5.

Preparo das soluções padrões de analito e de soluções de amostra no método colorimétrico baseado na derivatização com ninidrina

Na adaptação do método proposto por Frutos e colaboradores (FRUTOS *et al.*, 2000b), uma solução aquosa 1,25% (m/v) de ninidrina foi preparada em tampão fosfato (pH 7,4; 200 mmol L⁻¹). As soluções padrões foram preparadas misturando 830 µL da solução estoque de ninidrina com volumes apropriados de solução estoque de sulfato de gentamicina (200 µg mL⁻¹), e ajustando o volume final para 5,00 mL com tampão fosfato (pH 7,4; 200 mmol L⁻¹). No caso das amostras, as soluções diluídas dos medicamentos foram misturadas nos balões contendo as soluções estoque de ninidrina antes da diluição com solução tampão. Na solução-branco, a solução estoque de ninidrina foi diretamente diluída com tampão fosfato (pH 7,4; 200 mmol L⁻¹). Essas soluções foram aquecidas a 95 °C, por 15 min. Em seguida, elas foram colocadas num banho de gelo para resfriamento até a temperatura ambiente de tal forma a serem analisadas no espectrofotômetro.

2.3.6.

Procedimento de medição espectrofotométrica

As medições espectrofotométricas foram feitas em modo de batelada. Nas dispersões de trabalho de AuNPs-E e AuNPs-B as varreduras foram feitas de 300 a 900 nm e de 400 a 900 nm respectivamente. As medições quantitativas foram feitas em 526 nm (máximo da banda plasmônica transversal das AuNPs-E) e em 681 nm da banda de agregação das AuNPs-E ou ainda em 662 nm (máximo da banda plasmônica longitudinal das AuNPs-B). A banda espectral passante foi de 10 nm e a velocidade de varredura foi de 1000 nm min⁻¹. No método determinação colorimétrico após a derivatização com ninidrina, as varreduras foram feitas de 200 a 600 nm com medição de absorvância em 400 nm.

As cubetas de quartzo foram periodicamente lavadas com detergente Extran, imersas em solução de ácido nítrico (10% v/v) e posteriormente lavadas com água ultrapura.

2.3.7.**Análises por microscopia eletrônica (varredura em modo de transmissão) – STEM**

Imagens obtidas por STEM foram feitas após a aplicação de 2,5 μL de dispersão aquosa de nanopartículas em grades de carbono, deixando-se o solvente evaporar completamente à temperatura ambiente. As imagens foram feitas na presença e na ausência de sulfato de gentamicina. O equipamento foi operado com 30 kV e distância de trabalho de 6,1 mm.

3 Resultados e discussão-Parte I

3.1. Características ópticas e morfológicas das nanopartículas de ouro sintetizadas

As nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs-E) utilizadas no desenvolvimento do método analítico para determinação de gentamicina foram produzidas seguindo o método de redução de citrato de sódio monobásico relatado por Turkevich e colaboradores (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Seguindo tal procedimento, com ajustes mínimos necessários, aqueceu-se uma solução aquosa ($2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) do agente precursor, no caso o ácido cloroáurico, mantendo-se agitação vigorosa constante. Quando a temperatura atingiu 100°C misturou-se rapidamente o agente redutor citrato de sódio monobásico, um dos agentes redutores testados no trabalho original de Turkevich. Menos de um minuto após a adição do citrato de sódio, a solução desenvolveu uma coloração vermelho-tinto, que atingiu uma tonalidade mais intensa após alguns minutos, indicando a formação das AuNPs em dispersão coloidal.

Em seu trabalho, Turkevitch não apresentou informação alguma sobre o tempo requerido de aquecimento para formar a quantidade máxima de AuNPs de um tamanho específico dispersas em água, lembrando que o tamanho das nanopartículas e a quantidade das mesmas devem guardar uma relação inversamente proporcional (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Assim sendo, o primeiro estudo dessa dissertação consistiu em ajustar o tempo máximo de aquecimento do meio reacional, mantendo-se constantes a temperatura (a de ebulição, entre 100 e 101°C) e a velocidade de agitação de sistema (900 rpm). O objetivo foi obter uma dispersão coloidal com perfil espectral (de SPR das nanopartículas de ouro) alongado e intenso, em termos da diferença entre a

intensidade do pico máximo e a base da banda espectral, de tal forma a permitir a melhor visualização das mudanças de intensidade quando da sua utilização como sonda analítica.

Para tal, o tempo de aquecimento foi medido a partir do momento em que o citrato de sódio foi adicionado à solução. O efeito do tempo de aquecimento na qualidade das dispersões de AuNPs foi avaliado em função do perfil espectral de extinção (medido ao longo da faixa entre 400 a 900 nm como o logaritmo da razão entre a intensidade da radiação incidente, I_0 , e a intensidade da radiação transmitida, I). Muito embora não obtendo diretamente um valor numérico para o tamanho médio das AuNPs nem de quantidade de AuNPs no meio, a mudança da forma do perfil espectral é decorrente do conjunto de mudanças na morfologia e quantidade das AuNPs. Porém, nesse momento da pesquisa não se tinha disponível um microscópio eletrônico de varredura no modo de transmissão para se avaliar como tais características repercutiram no perfil espectral.

Alíquotas de 1 mL das dispersões de síntese de AuNPs foram coletadas em intervalos 5 min, até 30 min, e colocadas em tubos de ensaio de vidro de 10 mL. As alíquotas coletadas foram diluídas com água ultrapura na proporção de 1:1 (em volume) com a finalidade de ajustar a intensidade da banda de ressonância plasmônica (medição máxima em 526 nm, característica da banda transversal) em valores de $\log(I_0/I)$ na faixa entre 0,1 e 0,5 unidades. Na Figura 5 pode se verificar que a intensidade da banda de ressonância transversal das AuNPs cresce em função do aumento do tempo de aquecimento, alcançando o perfil mais intenso (em relação à linha base medida em 800 nm) após 25 min (diferença entre o sinal medido em 526 nm e o medido em 800 nm foi de 0,1980 unidades com 5 min de aquecimento e de 0,3956 unidades após 25 min). Outra importante observação foi a manutenção do máximo das bandas em 526 nm, o que indica que o tamanho médio das AuNPs produzidas ao longo do processo, não importando o tempo de aquecimento, se mantém constante. Deslocamentos desse valor de comprimento de onda máximo estão relacionados com a variação de tamanho das AuNPs. Vale salientar que a presença de apenas uma banda espectral com queda brusca para a linha base indicou que o perfil das AuNPs é esférico (AuNPs-E).

Já nas dispersões aquecidas por 30 min, observou-se um aumento significativo da linha base do espectro (entre 600 e 900 nm) em relação ao aumento

da intensidade do pico (medido em 526 nm), ou seja, a diferença entre os sinais medidos em 526 nm e 800 nm foi de 0,3441 unidades. Tal aumento da linha base e a menor taxa de diminuição de sinal, a partir do máximo de 526 nm, é característico de desvio do formato esférico e/ou agregação das AuNPs-E na transição para material em bulk.

Após a escolha das condições para a obtenção das AuNPs-E, três partidas de síntese foram realizadas de tal forma a verificar a repetibilidade do perfil espectral das dispersões de AuNPs, que são mostrados na Figura 6. Observou-se que a largura e a intensidade da banda com máximo em 526 nm assim como a intensidade da linha base entre 600 e 900 nm foram similares nas três partidas (coeficiente de variação, CV, de 1,8% do sinal medido em 526 nm).

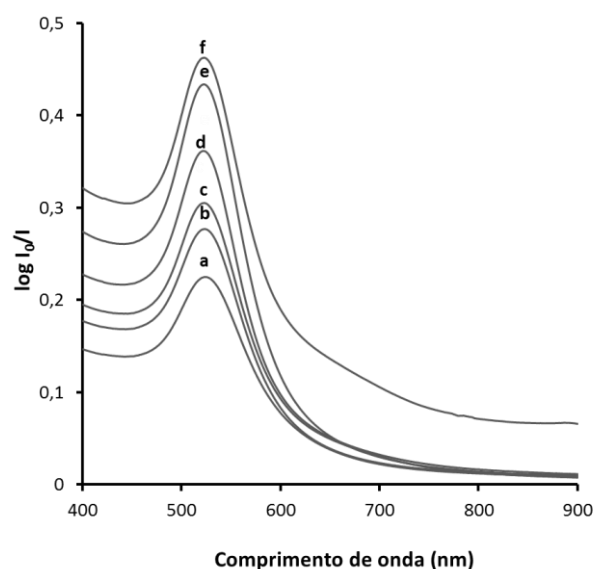


Figura 5: Perfis espectrais de ressonância plasmônica medidos das dispersões de AuNPs sintetizadas com diferentes tempos de aquecimento a 100 °C e diluídas em água: (a) 5 min; (b) 10 min; (c) 15 min; (d) 20 min; (e) 25 min e (f) 30 min após a adição do agente redutor. Precursor: H₂AuCl₄; agente redutor: citrato de sódio monobásico; 900 rpm de agitação. As dispersões sintetizadas foram diluídas com água na proporção de 50/50% v/v.

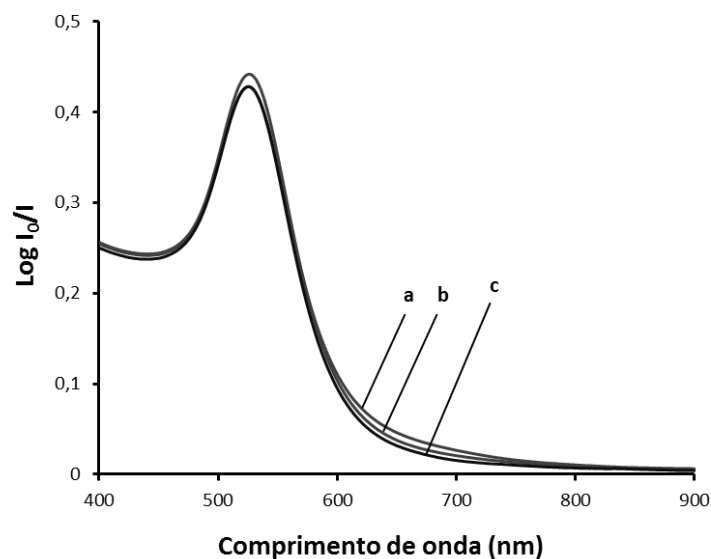


Figura 6: Perfis espectrais de ressonância plasmônica medidos em três dispersões de AuNPs-E sintetizadas independentemente e diluídas em água: (a) síntese 1; (b) síntese 2; (c) síntese 3. Precursor: HAuCl_4 ; agente redutor: citrato de sódio monobásico; 25 min de aquecimento a $100\text{ }^\circ\text{C}$ após a adição do agente redutor; 900 rpm de agitação. As dispersões sintetizadas foram diluídas com água na proporção de 50/50% v/v.

Como já mencionado, os trabalhos recentes da literatura Wang *et al.* (2013), mostraram que o perfil espectral de ressonância plasmônica de AuNPs-E dispersas em água é sensível à presença de AMG, por exemplo, a tobramicina que foi objeto de estudo de Santos *et al.* (SANTOS, 2014). Na presente dissertação, a gentamicina foi selecionada como molécula de interesse em termos de determinação quantitativa. Sendo assim, nesse ponto do trabalho, era crucial avaliar se as respostas espectrais das três dispersões de AuNPs-E seriam similares em função da presença de gentamicina. Assim sendo, três alíquotas de cada uma das dispersões foram selecionadas e, após diluídas com água (na proporção de 40% de dispersão de AuNPs e 60% de água, em volume), obteve-se o espectro original de uma alíquota de cada uma das dispersões diluídas (dispersões-branco), além dos espectros após a adição de gentamicina (sulfato) em três níveis de concentração final ($2,6 \times 10^{-8}$ e $1,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), sendo o efeito produzido por cada nível de AMG medido em uma alíquota diferente de cada uma das dispersões. Os espectros obtidos das três diferentes dispersões de AuNPs na ausência e na presença de gentamicina podem ser visualizados na Figura 7.

As medições quantitativas (em três réplicas autênticas de dispersões diluídas) foram realizadas em 526 nm (máximo da banda de ressonância transversal) e em 681 nm, na banda produzida pela agregação de AuNPs induzida pela gentamicina. Na Tabela 2 os sinais medidos são mostrados, podendo-se concluir que o efeito causado no espectro das AuNPs foi dependente da concentração gentamicina e foi reprodutivo (valores de CV abaixo de 1,0%).

Os resultados mostraram que na medida em que a concentração de gentamicina aumentava na sonda, os sinais medidos em 526 nm decresciam em quanto que o sinal monitorado em 662 nm, aumentava (Figura 7A). Tal decréscimo no comprimento de onda 526 nm apresentou tendências lineares, sendo o valor de R^2 igual a 0,993, assim mesmo o incremento do sinal mostrou uma tendência lineal de R^2 igual a 0,997 em 681 nm, como é indicado na Figura 7B e Figura 7C. A sensibilidade do decréscimo de sinal em 526 nm foi de $(-4,5 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1})$ enquanto que em 681 apresentou uma sensibilidade de $(1,8 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1})$.

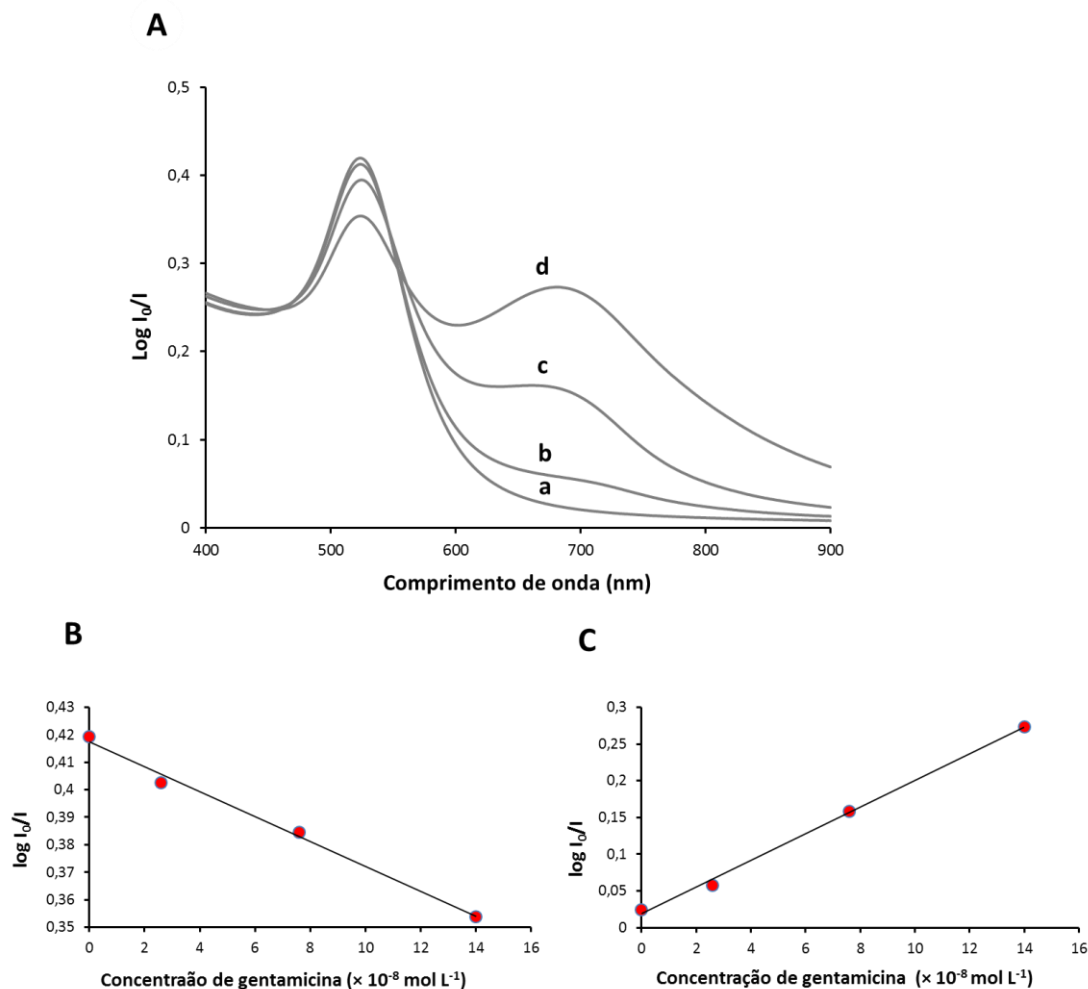


Figura 7: Avaliação dos sinais médios das sondas, $\log(I_0/I)$, em dispersões diluídas constituídas por 1 parte de dispersão estoque de AuNPs e 1 partes de água (50% v/v de AuNPs-E no volume total), a partir das três sínteses independentes (A). (a) Dispersões de AuNPs na ausência de gentamicina, (b) dispersões de AuNPs-E na presença de gentamicina ($2,6 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}); (c) dispersões de AuNPs na presença de gentamicina ($7,6 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}) (d); dispersões de AuNPs na presença de gentamicina (14×10^{-8} mol L^{-1}); (B) Monitoramento do sinal no comprimento de onda 526 nm (C) Monitoramento do sinal no comprimento de onda 681nm.

Tabela 2: Sinais médios da avaliação das três partidas de síntese de AuNPs-E na presença de concentrações crescentes de gentamicina.

Concentração de gentamicina ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹)	Sinal Médio Monitorado em 526 nm	%C.V	Sinal Médio Monitorado em 681 nm	%C.V
2,6	0,4285 \pm 0,0015	0,36	0,0588 \pm 0,0002	1,00
7,6	0,4151 \pm 0,0013	0,32	0,1585 \pm 0,0012	0,13
14	0,3865 \pm 0,0008	0,21	0,2753 \pm 0,0011	0,60

Por conta da similaridade dos perfis espectrais e das respostas similares em função da presença de sulfato de gentamicina, as três dispersões de AuNPs-E sintetizadas foram misturadas para se obter a chamada dispersão estoque (volume final em torno de 2,5 L), cujo perfil espectral se encontra na Figura 8, e que foi utilizado ao longo de todo o trabalho experimental. A estabilidade dessa dispersão foi avaliada pela medição diária de uma alíquota diluída em água (na proporção de 40% de dispersão de AuNPs e 60% de água, em volume) cujo valor não variou mais do que 0,01 unidade de log (I_0/I) e cujo pH nunca foi diferente de 3,7.

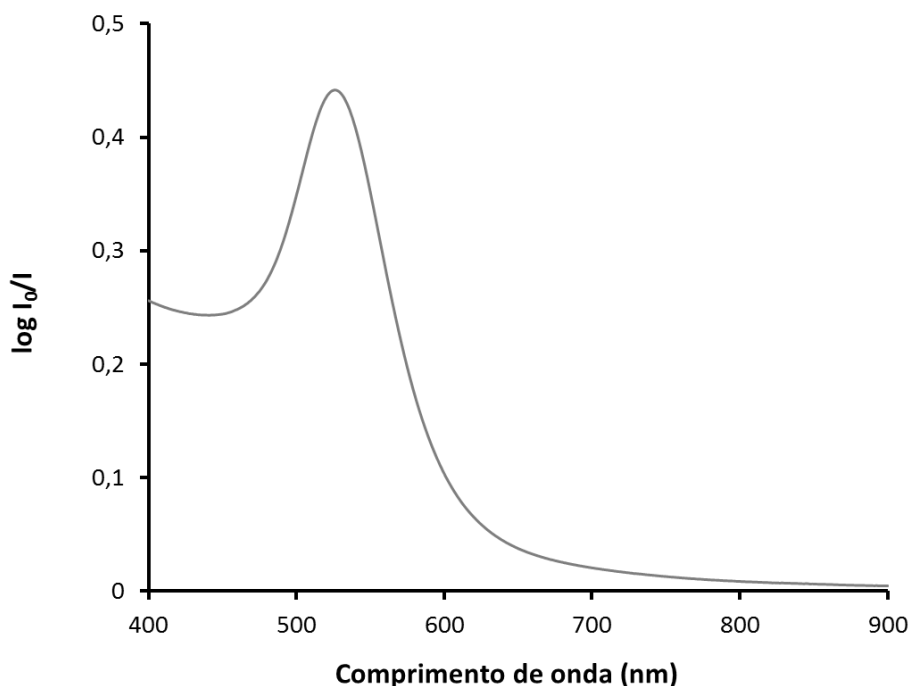


Figura 8: Perfil espectral de ressonância plasmônica da dispersão estoque de AuNPs-E diluída em água. Precursor: H₂AuCl₄; agente redutor: citrato de sódio monobásico; 25 min de aquecimento a 100 °C após a adição do agente redutor; 900 rpm de agitação. A dispersão estoque foi diluída com água na proporção de 50/50% v/v.

A imagem de microscopia das AuNPs-E, Figura 9, obtida da dispersão estoque apontou para a formação de um grande número de nanopartículas, a maior parte tendendo ao formato esférico. No entanto, a microscopia também permite visualizar que uma menor proporção de AuNPs que apresentaram a forma triangular (ver no detalhe circulado na micrografia). Outra característica da dispersão estoque foi a razoável aglomeração das AuNPs-E, o que é um indício da formação de uma grande quantidade de nanopartículas, podendo isso também ter ocorrido em função da agitação não ter sido intensa o suficiente, ao longo da síntese, de modo a manter o material mais disperso no sistema aquoso. Em termos de tamanho, os diâmetros das nanopartículas esféricas variaram de 13,6 a 25,2 nm. Na Figura 9B duas nanopartículas com diâmetros estimados podem ser visualizadas.

Ao se observar os dados da literatura das dispersões de AuNPs sintetizadas com citrato de sódio, por Turkevich *et al.* (1951) também foi verificado AuNPs majoritariamente esféricas e de diâmetros médios de 20 nm, quando a síntese foi feita a 100°C, e de 18 nm com síntese realizada a 70°C. Uma pequena fração de

AuNPs triangulares também foi verificada, assim como algumas AuNPs aglomeradas e outras isoladamente dispersas no meio aquoso (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951).

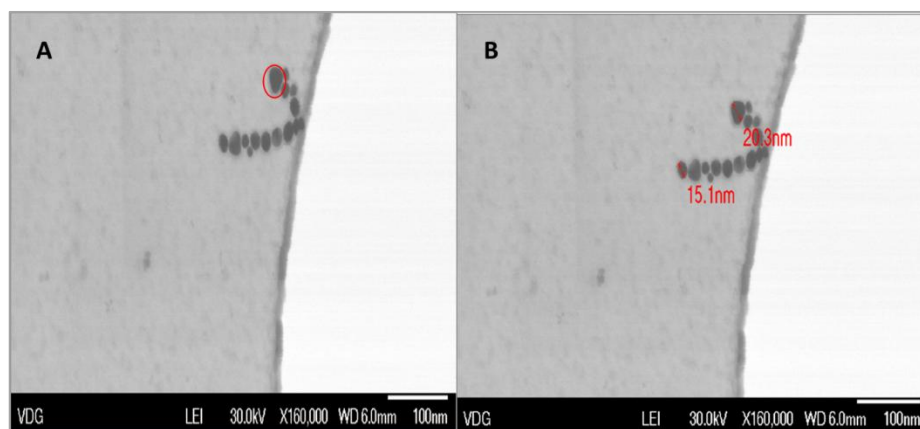


Figura 9: (A) imagem por STEM das AuNPs-E da dispersão estoque de AuNPs-E e (B) imagem por STEM processada a partir do programa Image J (FIJI).

A análise morfológica das AuNPs-E da dispersão estoque foi feita por meio do processamento das imagens utilizando o programa Image J (FIJI), como indicado na Figura 10. O aumento do contraste entre a imagem das AuNPs e o plano do fundo permitiu que fosse realizada a estimativa de parâmetros (circularidade, diâmetro dos eixos, razão de aspectos e área) das nanopartículas presentes em um espaço amostral específico que, idealmente, representa a dispersão como um todo. Cada avaliação produziu um histograma que permitiu verificar a variedade das características da população de AuNPs-E produzidas.

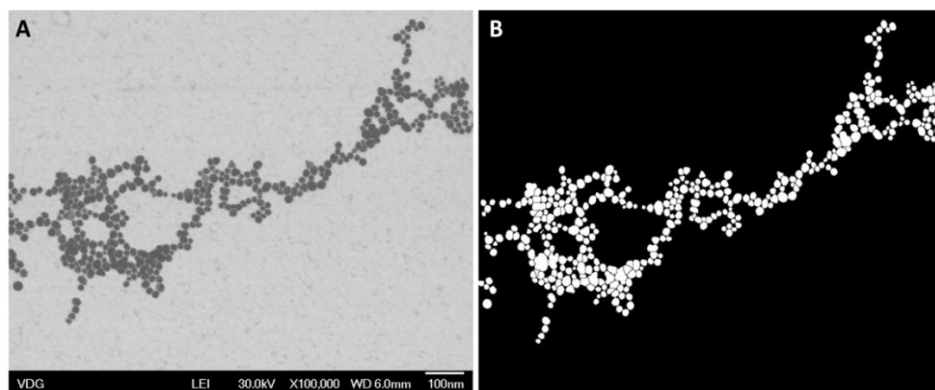


Figura 10: Imagens por STEM das AuNPs-E da dispersão estoque (A) imagem original; (B) imagem depois do processamento através do programa Image J (FIJI).

Os histogramas dos parâmetros relacionados com a morfologia das AuNPs-E estão apresentados na (Figura 11). É possível observar que existe uma mudança das dimensões do eixo maior de 10 a 45 nm (Figura 11A) e do eixo menor de 2,5 a 30 nm (Figura 11B), ademais, o tamanho médio do eixo maior das AuNPs-E foi 19,4 nm, enquanto para o eixo menor o valor médio foi de 15,4 nm. Assim, o diâmetro médio das AuNPs-E foi 17,4 nm, valor que foi considerado no cálculo da concentração de AuNPs-E da dispersão estoque. O diâmetro médio dessas AuNPs-E (17,4 nm) obtidas no presente trabalho coincide com os obtidos recentemente por Santos *et al.* em duas condições de síntese: uma usando citrato de sódio monobásico em meio com pH 3,8 (diâmetro médio de 17,6 nm) e a outra com uso de citrato de sódio tribásico em meio com pH 6,7 (diâmetro médio de 17,5 nm), em ambos os casos com aquecimento da solução de ouro seguido da adição do citrato (SANTOS, 2014).

A razão de aspectos (valor do eixo maior/valor do eixo menor de cada uma das AuNPs-E) foi igual a 1,21, sendo que a fração mais numerosa de AuNPs-E se encontravam na faixa entre 1,0 e 1,3 como pode-se observar na Figura 11C). Isso demonstrou que existe pequena variação de diâmetros dos eixos maiores em relação aos menores na maior parte das AuNPs-E amostradas, com apenas uma pequena fração de nanopartículas com valores do eixo maior entre 1,5 a 2,2 vezes o diâmetro eixo menor. Em consequência as AuNPs-E apresentaram uma boa circularidade (0,89) com o histograma indicando a maior parte das AuNPs-E na faixa de 0,80 e 0,95 (Figura 11D). Em termos comparativos, as circularidades das AuNPs

sintetizadas por Santos *et al.* (2014) usando citrato de sódio monobásico em meio com pH 3,8 e com uso de citrato de sódio tribásico em meio com pH 6,7 foram respectivamente 0,85 e 0,86.

Finalmente, a maior fração das nanopartículas apresentou áreas entre 100 a 250 nm² (Figura 6E) com área média de 228 ± 134 nm². Para as AuNPs sintetizadas por Santos *et al.* (2014) as áreas foram de 242 ± 153 nm² (AuNPs sintetizadas com uso de citrato monobásico de sódio em pH 3,8) e de 240 ± 151 nm² (AuNPs sintetizadas com uso de citrato tribásico de sódio em pH 6,7).

Com base nos resultados, cujos valores médios e desvios-padrões são resumidos na Tabela 3, pode-se assumir que as AuNPs-E produzidas efetivamente apresentaram um aspecto esférico).

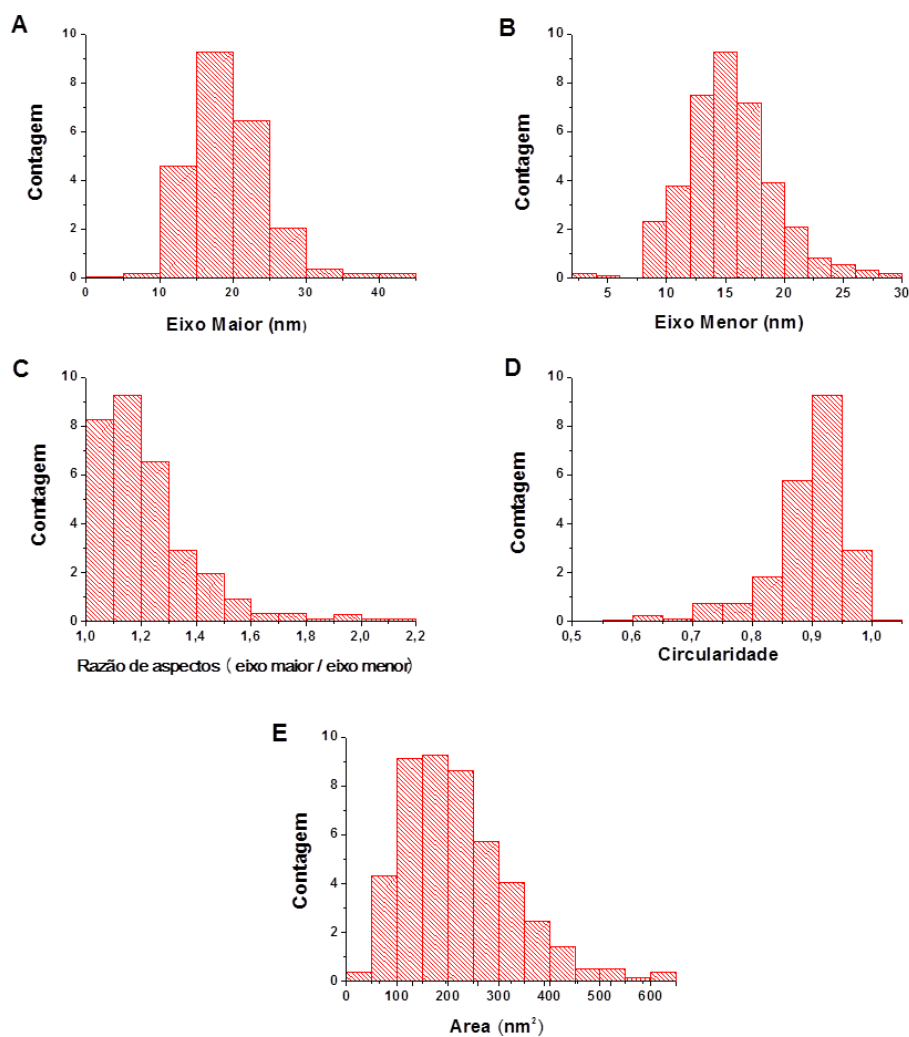


Figura 11: Histogramas referentes ao processamento das imagens das AuNPs-E (imagem da Figura 6) indicando: (A) diâmetro do eixo maior, (B) diâmetro do eixo menor, (C) razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), (D) circularidade; (E) área de superfície.

Tabela 3: Estimativa das características morfológicas das AuNPs-E da dispersão estoque.

Medias das dimensões da AuNPs-E					
Eixo maior (nm)	Eixo menor (nm)	Diâmetro médio (nm)	Razão de aspectos	Circularidade Média	Área (nm²)
19,4 ± 5,8	15,4 ± 4,1	17,4 ± 5,0	1,2 ± 0,2	0,89 ± 0,07	228,1 ± 133,5

A concentração de AuNPs-E na dispersão estoque foi determinada a partir do valor do diâmetro médio das nanopartículas e de parâmetros experimentais e físicos já mencionados (ver Equação 5). Com tais valores, a concentração estimada de AuNPs-E foi de $1,7 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

3.2.

Estudos da sonda aquosa de AuNPs-E em função da presença de gentamicina

3.2.1.

Magnitude da resposta

Com a finalidade de avaliar a resposta óptica das AuNPs-E em função da presença de sulfato de gentamicina, estabeleceu-se um protocolo para a preparação das aqui denominadas dispersões de trabalho, aquelas onde se iriam adicionar as alíquotas de solução de gentamicina, ou seja, as sondas para determinação do analito. Para tal, uma dispersão aquosa intermediária, denominada de dispersão-mãe, foi preparada usando 40% em volume de dispersão estoque completando-se o volume total com água ultrapura. Deste modo ao se preparar a dispersão de trabalho a partir de quatro partes de dispersão-mãe e uma parte de complemento (água ou solução aquosa padrão de gentamicina) tinha-se 32% em volume da dispersão estoque, o que equivalia à concentração de $4,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹AuNPs-E. Tal protocolo foi proposto para que o sinal da dispersão-branco (aquela dispersão de

trabalho preparada com dispersão mãe e água ultrapura apenas) tivesse sinal, em termos de $\log(I_0/I)$, de 0,35, que está na faixa onde se tem a menor incerteza nas medições espectrofotométricas por razão entre de I_0 e I (JR, INGLE; CROUCH, 1988)

Deste modo, preparou-se três conjuntos de quatro dispersões de trabalho, sendo a primeira triplicata a da dispersão branco (onde não se adicionou o analito) e nas outras três triplicatas foram adicionadas quantidades crescentes de analito (a partir de volumes crescentes de solução aquosa padrão de sulfato de gentamicina $8,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) de modo a se obter concentrações finais (ou quantidades finais em mol) de analito de $2,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; $7,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 12A são mostrados os espectros obtidos de cada conjunto de réplicas das dispersões de trabalho contendo as diferentes quantidades de gentamicina. Pode-se notar que na medida em que a concentração de gentamicina aumentou na sonda aquosa, a intensidades de sinal, medido em 526 nm, decresceu. Tal decréscimo mostrou uma tendência linear ($R^2 = 0,996$) como mostrado na Figura 12B. Como esperado para AuNPs-E que se aglomeram, houve o aparecimento de uma banda espectral na faixa espectral entre 600 e 800 nm. A intensidade de tal banda aumentou (valor medido em 681 nm) na medida em que a concentração de gentamicina cresceu. Tal crescimento teve um perfil linear ($R^2 = 0,994$) como mostrado na Figura 12C. Ambas as variações de sinal são decorrentes da agregação do nanomaterial, ou seja, da perda das propriedades que geram o efeito de SPR das nanopartículas.

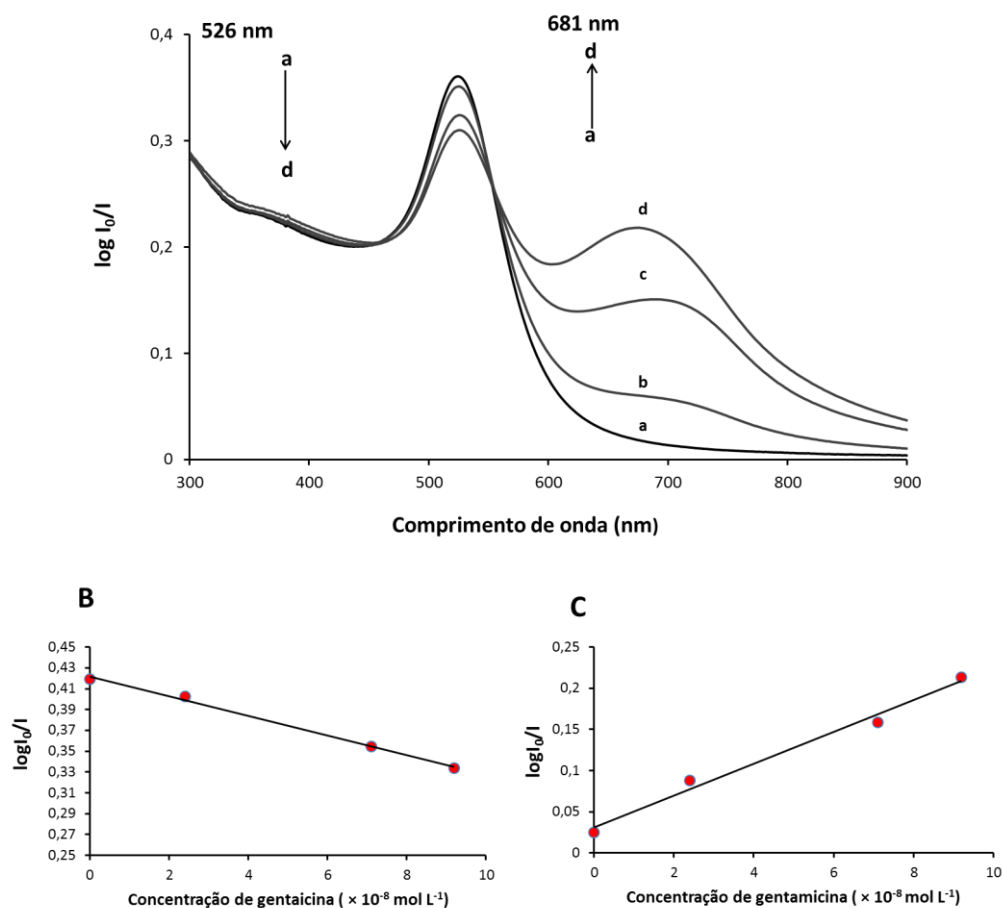


Figura 12: Espectros médios das dispersões de AuNPs-E na ausência e na presença de diferentes concentrações de sulfato de gentamicina [0,0; 2,4; 7,1; 9,2 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)] Linhas de a-d (A). (B) Monitoramento do sinal da sonda de AuNPs em 526 nm. (C) Monitoramento do sinal em 681 nm.

Macroscopicamente, como já indicado na literatura (WANG *et al.*, 2013), a coloração da dispersão após a adição de gentamicina passa de vermelho-tinto para uma cor mais arroxeada, como mostrado na Figura 13. Nessa mesma figura as microscopias obtidas da dispersão branco de AuNPs-E e da dispersão de trabalho de AuNPs-E (contendo $7,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de gentamicina) podem ser vistas. Como pode ser notado existe uma diferença significativa no aspecto de organização das AuNPs-E nas dispersões antes e depois da adição do AMG. Pode-se perceber que as nanopartículas estão mais aglomeradas quando a gentamicina está presente no sistema. Como relatado por Wang *et al.*(2013), este tipo de aglomeração decorre da interação entre a carga positiva dos grupos amino da gentamicina em pH ácido (lembrando que a forma original adicionada de gentamicina já seria carregada positivamente por ter sido adicionada como sal

sulfato) com a carga negativa da superfície das AuNPs-E capeados com citrato. Tal interação tende a anular a carga elétrica superficial das nanopartículas e que as mantém afastadas umas das outras por causa da repulsão eletrostática. Sem essa carga líquida, as nanopartículas naturalmente tendem a coalescer por meio de forças de Van der Waals. Ademais, as cargas positivas da gentamicina podem servir de mediador para a atração eletrostática de nanopartículas carregadas negativamente. Nos dois casos, os processos resultam na formação de aglomerados de AuNPs-E que eventualmente formarão um material na escala macroscópica.

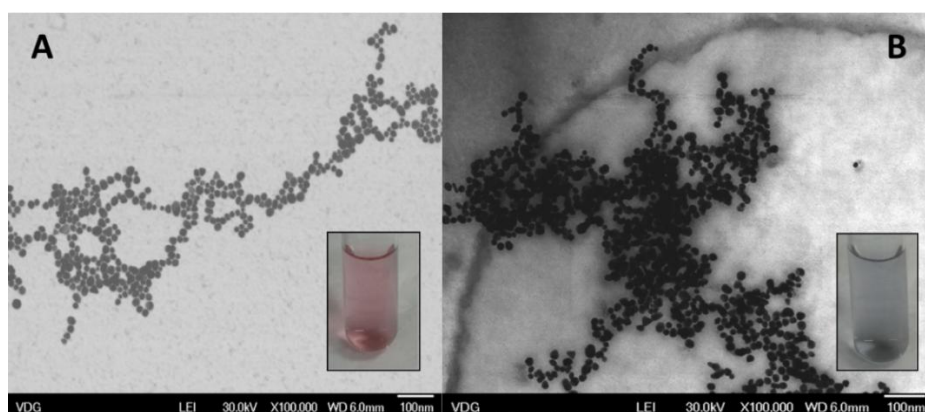


Figura 13: Imagens por STEM: (A) dispersão de trabalho na ausência de sulfato de gentamicina (dispersão-branco); (B) dispersão de trabalho na presença de sulfato de gentamicina ($7,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

3.2.2. Resposta óptica e sua estabilidade

Com relação à estabilidade da resposta óptica em função do tempo da dispersão branco ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ de AuNPs) e também em uma dispersão de trabalho contendo gentamicina (concentração final de $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), um estudo específico foi realizado. No caso, 13 dispersões-branco independentes foram preparadas de acordo com o protocolo descrito, e deixadas em repouso por 5 min após agitação vigorosa. Em seguida foi feita a aquisição do espectro da primeira dispersão (tempo zero do experimento). A partir daí, a cada 10 min o espectro de uma das dispersões era obtido até que o espectro da décima terceira dispersão fosse adquirido a partir do minuto 120. Na Figura 14 pode-se perceber a pequena

variação de sinal, medido em tanto no pico máximo da banda em 526 nm quanto em 681 nm da linha base. Esse resultado indicou tanto a estabilidade da resposta óptica da dispersão branco ao longo do período de tempo estudado quanto à boa repetibilidade na preparação desta dispersão, já que em 526 nm o sinal medido foi de $0,3479 \pm 0,0021$, ou seja, com CV de 0,6%. Por outro lado, o sinal baixo e constante medido em 681 nm indicou que as AuNPs-E não se aglomeram ao longo do período de tempo estudado (sinal igual a $0,0175 \pm 0,0002$, ou seja, com CV de 1,3 %).

O experimento foi repetido da mesma maneira na dispersão de trabalho contendo sulfato de gentamicina e o resultado também, indicou que a resposta óptica era estável tanto em 526 nm quanto no comprimento de onda de 681 nm da banda espectral decorrente da aglomeração de AuNPs-E. O resultado mostra que o efeito causado pela presença de gentamicina não se modificou ao longo do período de tempo, ou seja, a modificação morfológica das AuNPs-E, (aglomeração com perda de propriedades de ressonância plasmônica) ocorreu num momento específico não se alterando a partir de então. Os valores de sinal medidos em 526 nm foi $0,3144 \pm 0,0008$ (CV de 0,3%) e de $0,0980 \pm 0,0003$ (CV de 0,40%) no comprimento de onda de 681 nm.

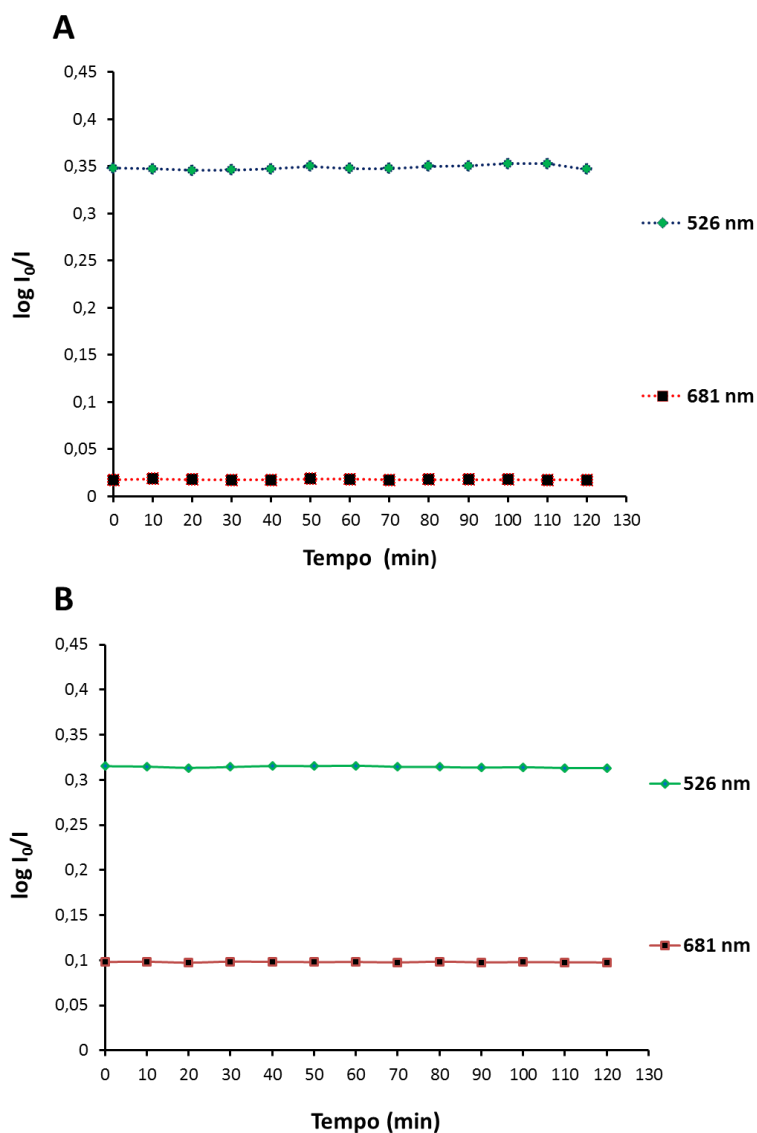


Figura 14: Estabilidade do sinal da sonda em função do tempo: em 526 nm e 681 nm (A) dispersão branco; (B) Estabilidade do sinal da sonda com $(4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1})$ de sulfato de gentamicina) em função do tempo monitorado em 526 e 681 nm.

3.2.3.

Efeito da variação do pH da dispersão na resposta óptica da sonda

A próxima etapa do estudo foi a de avaliar o efeito da variação do pH da dispersão de AuNPs-E ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na resposta óptica medida considerando tanto a dispersão branco quanto uma dispersão de trabalho contendo concentração final de sulfato de gentamicina de $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Para tal, procedeu-se o ajuste

do pH da dispersão branco e da de trabalho, antes da adição de analito, com a adição de pequenos volumes de soluções aquosas de HCl (1 mol L⁻¹) ou de NaOH (1 mol L⁻¹). Na faixa abaixo de 3,7 (pH original da dispersão) até pH 2,5, ajustou-se o valor de pH com adição de ácido, enquanto a faixa de pH até 9,0 o ajuste foi feito com adição da base. Vale salientar que para cada pH preparou-se uma triplicata de dispersões.

O espectro de cada dispersão foi adquirido em um tempo de aproximadamente de 7 min após a sua preparação. Para a dispersão branco, estabilidade no perfil espectral, e consequentemente dos sinais, medidos em 526 e em 681 nm, foi observada em toda a faixa de pH estudada, como pode-se observar na Figura 15A. No caso, os valores de CV foram 0,8% em 526 nm e de 2,0% em 681 nm.

Para a dispersão contendo sulfato de gentamicina, houve uma tendência de os sinais da sonda permanecer estável até o pH 5,5 (em ambos comprimentos de onda monitorados), com CV insignificantes de 0,63% em 526 nm e de 0,65 em 681. Porém, na medida em que os valores de pH aumentaram até 8,0 houve queda do sinal medido em 681 nm (ou seja, a menor aglomeração de AuNPs induzida pela gentamicina) com a contrapartida do aumento do sinal medido em 526 nm (em ambos os casos, uma variação de 37% em intensidade de pH (5,5 a 8.0) Figura 15B. Esse comportamento é um indício importante de que a interação do sulfato de gentamicina com as AuNPs-E, e que provoca a aglomeração das AuNPs-E, é de caráter eletrostático, já que nas regiões de pH mais ácidos a gentamicina possui carga elétrica positiva, por conta de seus grupos amino estarem protonados (valores de K_a da gentamicina iguais a $6,3 \times 10^{-9}$ e 7×10^{-14}), podendo assim interagir com as AuNPs-E, que por sua vez, na mesma faixa de pH). Na faixa perto da neutralidade e na faixa básica, a gentamicina não se encontra mais protonada e o efeito de variação de sinal óptico não ocorre Figura 16.

Por conta dos resultados, decidiu-se que o pH da sonda aquosa de AuNPs-E seria aquele original da dispersão (pH 3,7) por conta da robustez e da estabilidade da resposta óptica num sistema que não requer nenhum ajuste adicional de composição, o que facilita o seu emprego como sonda analítica.

Finalmente, fez-se a avaliação da estabilidade do valor de pH original da sonda aquosa de AuNPs-E em função do aumento da quantidade de sulfato de

gentamicina adicionada no sistema. Esse estudo foi realizado para se verificar a necessidade de uso de tamponamento do sistema com tampão acetato de modo garantir que o pH da sonda não variasse para valores mais altos onde a mudança de sinal óptico seria dependente de mais de uma fonte (a quantidade de gentamicina e a concentração hidrogeniônica do meio). Para tal, preparou-se um conjunto de dispersões com concentrações crescentes de gentamicina, que variou de $8,5 \times 10^{-9}$ a $1,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (estudo feito em triplicata). Os resultados mostrados no gráfico da Figura 17 claramente mostram que o valor de pH se mantém em torno de 3,7 (valor médio de pH 3,72) com CV de 0,2%. Esse comportamento mostrou que a sonda analítica de AuNPs-E não precisa ser tamponada por conta da presença de gentamicina, no entanto, mais estudos devem ser feitos por conta das matrizes das amostras que serão analisadas na dissertação.

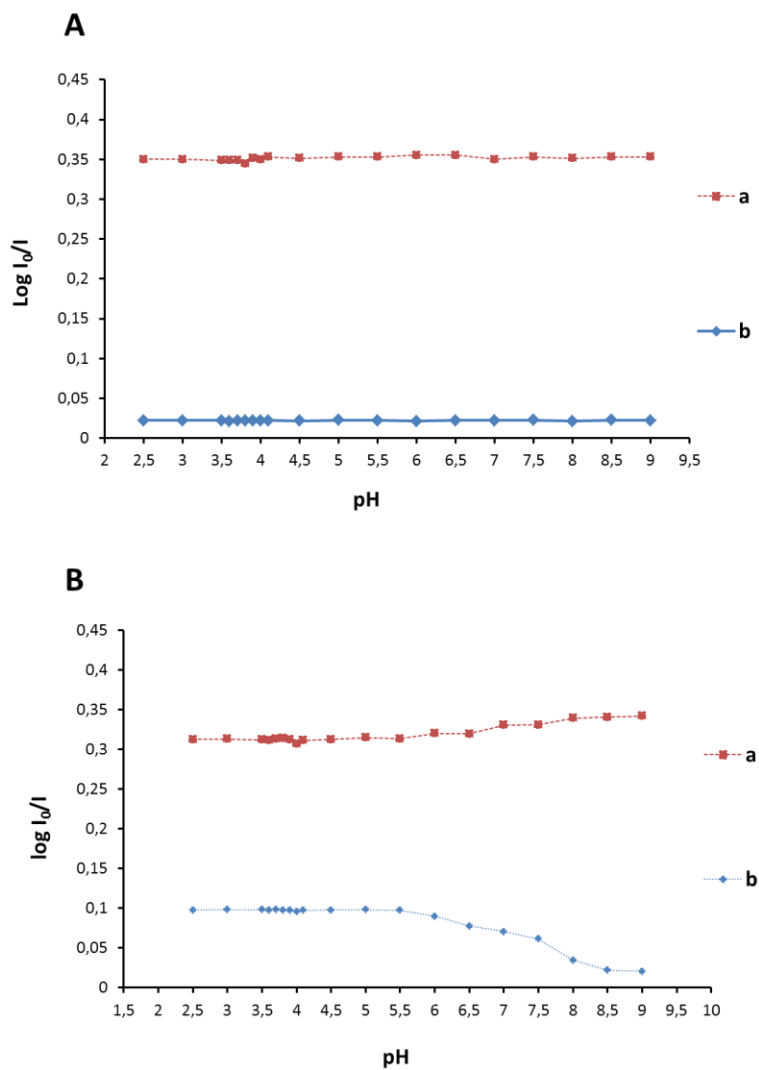


Figura 15: Intensidade de sinais medidos em, (a) 526 nm; e (b) em 681 nm: (A) dispersões-branco e (B) dispersões de trabalho na presença de sulfato de gentamicina ($4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) na faixa de pH entre 2,5 e 9,0.

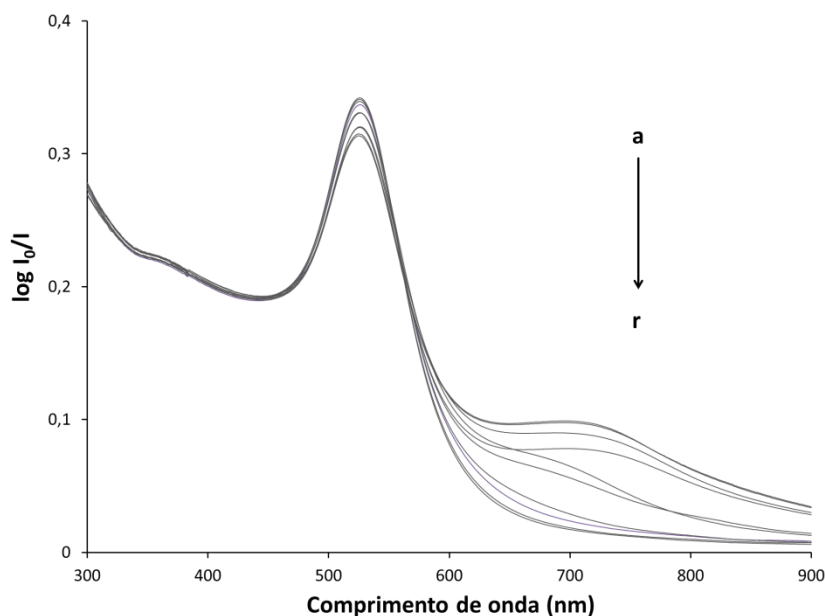


Figura 16: Espectros das dispersões de trabalho de AuNPs-E ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de gentamicina ($4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) com ajustes de pH nos valores: 2,5 (a); 3,0 (b); 3,5 (c); 3,6 (d); 3,7 (e); 3,8 (f); 3,9 (g); 4,1 (h); 4,5 (i); 5,5 (j); 6,0 (K); 6,5 (m); 7,0 (n); 7,5 (o); 8,0 (p); 8,5 (q) e 9,0 (r).

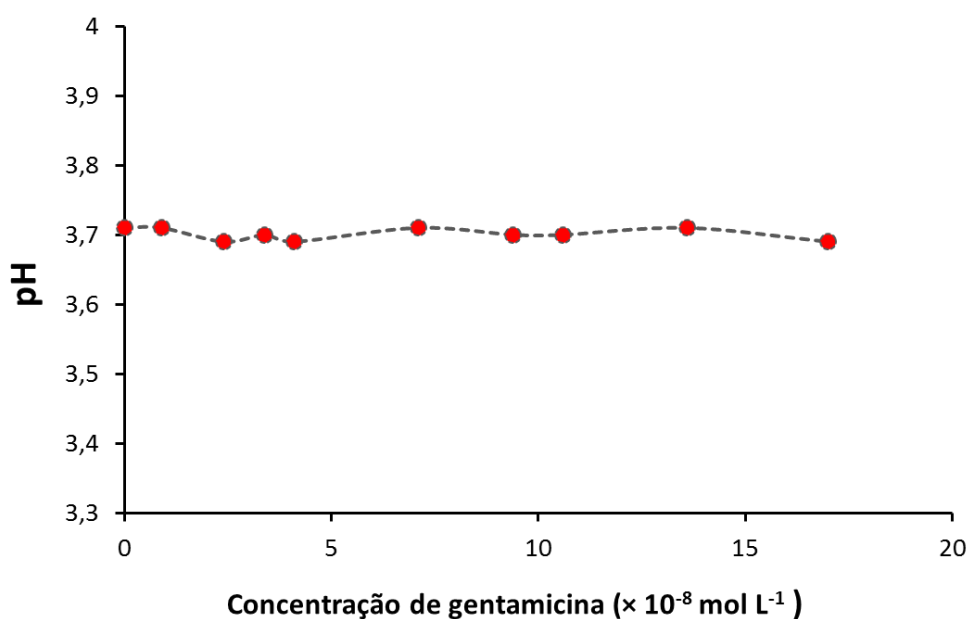


Figura 17: Monitoramento do valor do pH em dispersões de trabalho de AuNPs-E ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) em função do aumento da concentração de gentamicina: 0,0; 0,9; 2,4; 3,4; 4,1; 7,1; 9,4; 9,6; 13,6 e 17,0 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

3.3. Estudo com surfactantes

Um estudo adicional da influência da organização do meio aquoso, por meio da adição de surfactantes, na interação entre as AuNPs-E com a gentamicina foi realizado. Para isso, foram usados três tipos de surfactantes (um catiônico, um aniônico e um não iônico) em concentrações superiores e inferiores às concentrações micelares críticas (CMC) correspondentes (tomando como base os valores de CMC em meio aquoso a 25°C obtidos da literatura. Os surfactantes usados foram o surfactante catiônico CTAB (brometo de cetiltrimetil amônio) ($CMC = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) o surfactante aniônico SDS (dodecil sulfato de sódio), ($CMC = 8,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e o surfactante não iônico Tween-20 (polioxietilen(20)sorbitanmonolaurato) ($CMC = 6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Deste modo, avaliou-se o perfil espectral das AuNPs-E nos comprimentos de onda 526 e 681nm.

3.3.1. Estudo da interação das AuNPs-E com gentamicina em meio contendo surfactante catiônico

Para avaliar o comportamento da interação das AuNPs-E com a gentamicina em meio contendo surfactante catiônico CTAB, as dispersões de trabalho de AuNPs-E foram preparadas em meio contendo três concentrações diferentes do surfactante: $6,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (abaixo da CMC), $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (próximo da CMC) e $3,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (acima da CMC). Na Figura 18 são apresentados os espectros médios obtidos de cada conjunto de réplicas das dispersões de trabalho de AuNPs-E nos meios contendo CTAB contendo quantidades crescentes de sulfato de gentamicina (de $2,4 \times 10^{-8}$ a $7,1 \times 10^{-8}$).

Pode-se notar na Figura 18A que os espectros das AuNPs-E, em presença de CTAB em concentração superior à CMC, não apresentam modificações no perfil espectral, independentemente da presença de gentamicina. Desta forma constatou-se que nessas condições o contato entre as AuNPs-E com gentamicina foi minimizada em relação ao observado em meio sem surfactante (Figura 18D). Por

outro lado, os sinais espectrais, medidos em 526 nm, das dispersões de AuNPs-E em meio contendo CTAB na concentração próxima da CMC (Figura 18B) diminuiu já na ausência de analito, ou seja, o CTAB com cabeça positiva já interage com a superfície das nanopartículas, afetando levemente a SPR das AuNPs-E. Quando na presença de $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de analito, o sinal diminui um pouco mais e, ao se incrementar essa concentração de analito para $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ houve uma diminuição adicional de sinal, que permaneceu constante com o aumento adicional de sulfato de gentamicina. Isso indica que o analito, de algum modo, ainda alcança a superfície das AuNPs-E, afetando a ressonância plasmônica característica das nanopartículas, mas de forma limitada por conta da cobertura da superfície das AuNPs-E, com monômeros, provavelmente pareados. Ademais, não foi observado o sinal decorrente da agregação das AuNPs-E (banda de aglomeração característica na faixa acima de 650 nm), pois a camada de surfactantes ao redor das AuNPs-E impede a aglomeração das nanopartículas. Em contraponto, quando a concentração de surfactante foi inferior à CMC (Figura 18C) todos os valores medidos em 526 nm, inclusive na ausência de analito, são similares aos observados com a maior concentração de analito no experimento com surfactante próximo à CMC. Isso pode indicar que o recobrimento mais precário da superfície de AuNPs-E permite a aproximação de analito, que complementado com o efeito causado pelo recobrimento de surfactante, causando decréscimo de sinal igual em qualquer concentração de analito adicionado (Figura 18D).

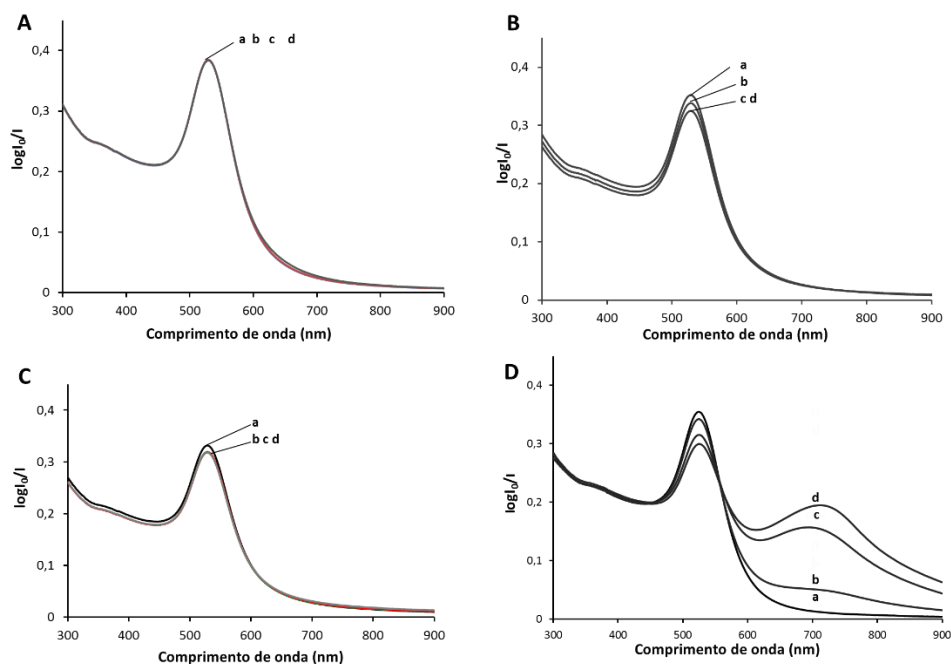


Figura 18: Perfis espectrais das AuNPs-E em meio contendo CTAB e na presença de concentrações crescentes de gentamicina (a) 0,0; (b) $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (c) $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (d) $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Concentrações de CTAB: (A); superior à CMC (B); na CMC (C) inferior à CMC (D) na ausência de CTAB.

3.3.2.

Estudo da interação das AuNPs-E com gentamicina em meio contendo surfactante aniônico

Similarmente ao estudo com CTAB, os experimentos feitos para avaliar a interação entre as AuNPs-E com gentamicina em meio contendo o surfactante aniônico SDS foram realizados em três concentrações diferentes de SDS: $1,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (abaixo da CMC), $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (próximo à CMC) e $1,3 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (acima da CMC). Na Figura 19A-C são apresentados os espectros médios obtidos de cada conjunto de réplicas das dispersões de trabalho de AuNPs-E nos meios contendo SDS em função do aumento da concentração de gentamicina.

Observou-se que os perfis espectrais das dispersões de trabalho são muito parecidos ao perfil espectral da dispersão branco (sem gentamicina), o que indica que, em presença de SDS, a interação das AuNPs-E com o AMG é fortemente suprimida. Esse resultado deve estar relacionado com a forte interação eletrostática

que ocorre entre a gentamicina protonada (com carga positiva) e a cabeça aniônica do surfactante, que está presente em concentrações ordens de grandeza maiores do que a de AuNPs-E. Isso diminui a possibilidade da interação da gentamicina com as AuNPs. Na Figura 19D são apresentados os resultados da interação das AuNPs-E com gentamicina em meio aquoso, como comparação.

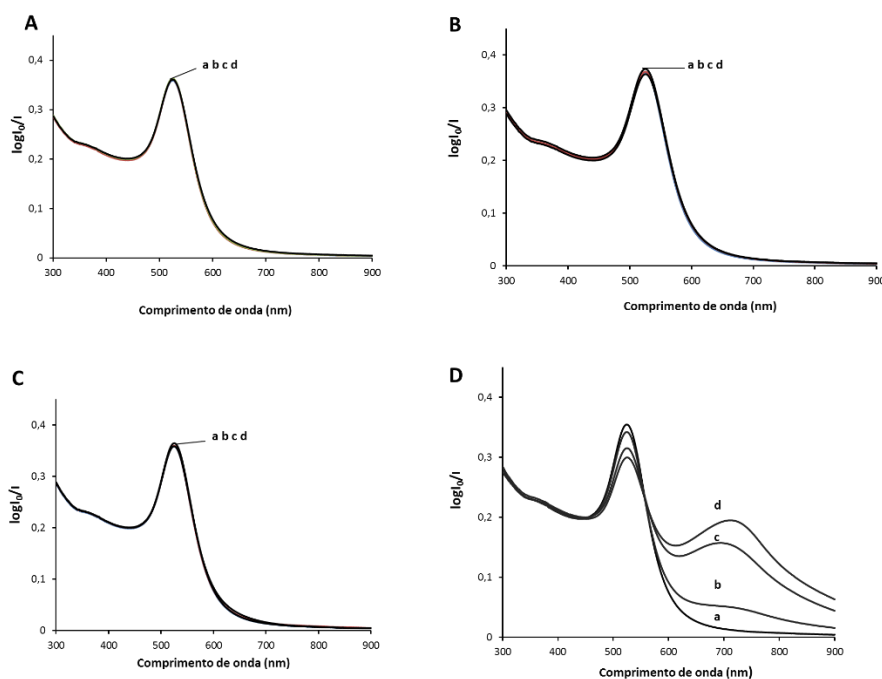


Figura 19: Perfis espectrais das AuNPs-E em meio contendo SDS e na presença de concentrações crescentes de gentamicina (a) 0,0; (b) $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (c) $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e (d) $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Concentrações de SDS: (A); superior à CMC (B); na CMC (C) inferior à CMC (D) na ausência de SDS.

3.3.3.

Estudo da interação das AuNPs-E com gentamicina em meio contendo surfactante não iônico

No caso do estudo da interação das AuNPs-E com gentamicina meio aquoso contendo surfactante não iônico (Tween-20) preparou-se as dispersões de trabalho empregando-se três concentrações de surfactante: $7,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (próximo da CMC), $7,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (acima da CMC) e $1,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (abaixo da CMC).

Na Figura 20A pode-se perceber que os perfis espectrais das AuNPs-E nas dispersões de trabalho em meio contendo Tween 20 acima da CMC permanecem iguais ao da dispersão branco (sem surfactante e indicado no espectro “a” da (Figura 20D) não importando a quantidade de gentamicina adicionada. Este resultado indica que a interação entre as AuNPs-E com gentamicina é prejudicada pelo surfactante quando este se encontra em concentração superior à da CMC.

Provavelmente tal bloqueio da interação da sonda com o analito acontece devido à interação entre os grupos etoxilados e hidroxila do surfactante e os grupos citrato na superfície das nanopartículas de ouro, através de pontes de hidrogênio e interações íon-dipolo. Por outro lado, os grupos etoxilados e hidroxilas do Tween-20 também podem interagir com os grupos nitrogenados e hidroxilas da gentamicina, limitando a interação deste com a sonda. Em ambos os casos, a formação de agregados micelares ao redor das AuNPs-E e da gentamicina tem um efeito de repulsão estérica que impede a interação e, portanto, a agregação das nanopartículas. Porém, é interessante observar que à medida que a concentração de Tween-20 diminuiu no meio (no caso dos estudos com Tween 20 nas proximidades e abaixo da CMC), o efeito da interação da gentamicina com as AuNPs-E começa a ser mais evidente (Figura 20B e 20C). De fato, na presença de menor quantidade de surfactante, a banda característica de aglomeração das AuNPs-E começa a ser visualizada quando a maior concentração de gentamicina está presente. Na Figura 20D, é apresentada a interação das nanopartículas em meio aquoso, a modo de comparação.

Um estudo adicional foi realizado com meio aquoso contendo concentrações de Tween-20 de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, muito abaixo da CMC, porém ainda duas ordens de magnitude acima da concentração das AuNPs-E. Os espectros médios obtidos são mostrados na Figura 21A, onde é possível observar resposta linear da diminuição do sinal a 526 nm ($R^2 = 0,9953$) e do aumento do sinal medido em 681 nm ($R^2 = 0,9969$) em presença de quantidades crescentes de gentamicina. Esse comportamento da sonda no meio contendo quantidades-traço do surfactante aniônico apresentou uma banda de aglomeração um pouco mais definida e cuja

sensibilidade de incremento foi 19% maior do que a do crescimento de sinal da banda formada na ausência de surfactante (Figura 21B).

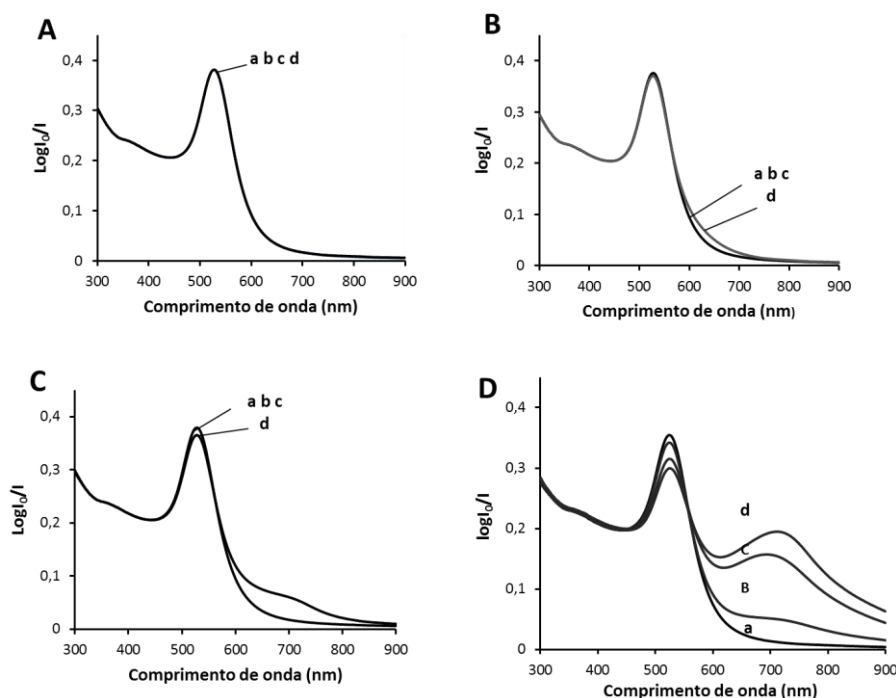


Figura 20: Perfis espectrais das AuNPs-E em meio contendo Tween 20 e na presença de concentrações crescentes de gentamicina (a) 0,0; (b) $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹; (c) $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e (d) $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Concentrações de Tween-20: (A); superior à CMC (B); na CMC (C) inferior à CMC (D) na ausência de Tween-20.

Esse comportamento observado a baixas concentrações de surfactante no meio sugere que, nessas condições não existem agregados significativos do Tween-20 e as moléculas anfifílicas começam a atuar como ligantes, através da formação de pontes de hidrogênio intermoleculares, promovendo dessa forma a agregação das nanopartículas em presença da gentamicina. Essas estruturas ainda são mais estáveis do que aquelas em meio aquoso sem surfactante devido à estabilidade conferida pela presença do surfactante na superfície em contato com o meio.

Muito embora uma melhora na variação de sinal da sonda em relação à presença de gentamicina tenha sido observada em meio contendo quantidades-traço de Tween 20, esse aditivo não foi incorporado na composição das sondas de AuNPs-E usadas para a determinação de gentamicina por conta da manutenção da simplicidade do método. Porém, esses resultados suscitam a possibilidade futura de

se estudar o efeito de surfactantes não iônicos na melhoria metrológica da resposta analítica do método, como a realizada recentemente pelo grupo de pesquisa em dois artigos que avaliam a interação de pontos quânticos de CdTe com naftoquinonas, um em meio aquoso (AUCÉLIO et al., 2013) sem de surfactante e outro mostrando a melhora da resposta analítica e estabilidade da sonda quando se incorporou CTAB (LIMA et al., 2013).

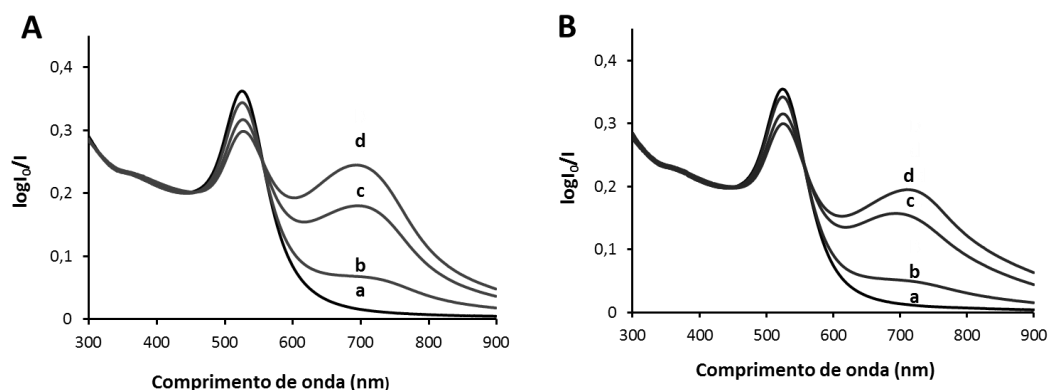


Figura 21: Perfis espectrais das AuNPs-E em meio contendo (A) Tween 20 ($1,0 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}) e (B) na ausência de Tween 20 em função do aumento de concentração de gentamicina (a) 0,0; (b) $2,4 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} ; (c) $3,4 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} e (d) $7,1 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} . Concentrações de Tween 20: (A); superior à CMC (B); na CMC (C) inferior à CMC (D) na ausência de Tween 20.

3.4.

Características das dispersões de AuNPs-E como sondas analíticas para gentamicina

Como descrito na seção anterior, os estudos mostraram que a resposta espectral das dispersões de AuNPs-E variam de forma proporcional em relação à quantidade de sulfato de gentamicina, corroborando os resultados reportados por (WANG *et al.*, 2013; RADHAKUMARY; SREENIVASAN, 2014; SANTOS, 2014). Deste modo partiu-se para uma avaliação da qualidade da variação da resposta óptica (tanto em 526 nm quanto em 681 nm) de modo a verificar o

potencial dessas dispersões para serem utilizadas como sondas analíticas para a quantificação efetiva de gentamicina.

Assim, um novo experimento foi realizado com 13 dispersões de AuNPs-E ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$), sendo uma delas usadas como branco (ou seja, sem a adição de gentamicina) e as outras 12 dispersões de trabalho contendo quantidades crescentes de gentamicina na faixa de concentração entre $2,4 \times 10^{-8}$ e $17,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados mostraram perfis ópticos que variaram em função da concentração de gentamicina até $10,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, não se notando mais mudanças espectrais significativas em concentrações de $11,9 \times 10^{-8}$ a $17,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 22). Fazendo uma relação de quantidades (razão entre a quantidade de gentamicina e a quantidade de nanopartículas), a saturação de sinal foi obtida com uma proporção de aproximadamente 250 moléculas de gentamicina por nanopartículas. Em termos de concentração massa/volume a saturação ocorreu quando a concentração de sulfato de gentamicina foi 57 ng mL^{-1} , ou seja, $0,28 \text{ } \mu\text{g}$ de sulfato de gentamicina (considerando $60 \text{ } \mu\text{L}$ de solução $8,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ adicionada na sonda).

Como esperado, as mudanças espectrais foram: i) a redução da intensidade da banda espectral com máximo em 526 nm (sem deslocamento do máximo espectral) por conta da diminuição da ressonância plasmônica transversal e ii) o aparecimento, seguido do aumento da magnitude da banda espectral na faixa entre 600 e 800 nm (com uma variação no comprimento máximo da banda na ordem de alguns nanômetros) que é decorrente da aglomeração das AuNPs. Para efeitos quantitativos, a intensidade medida nesse processo foi no comprimento de onda fixo de 681 nm.

Ao se plotar os valores das intensidades medidas em 526 e em 681 nm se observou claramente que os perfis de crescimento e de decréscimo de sinais tendem à linearidade até a concentração de $10,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Figura 23).

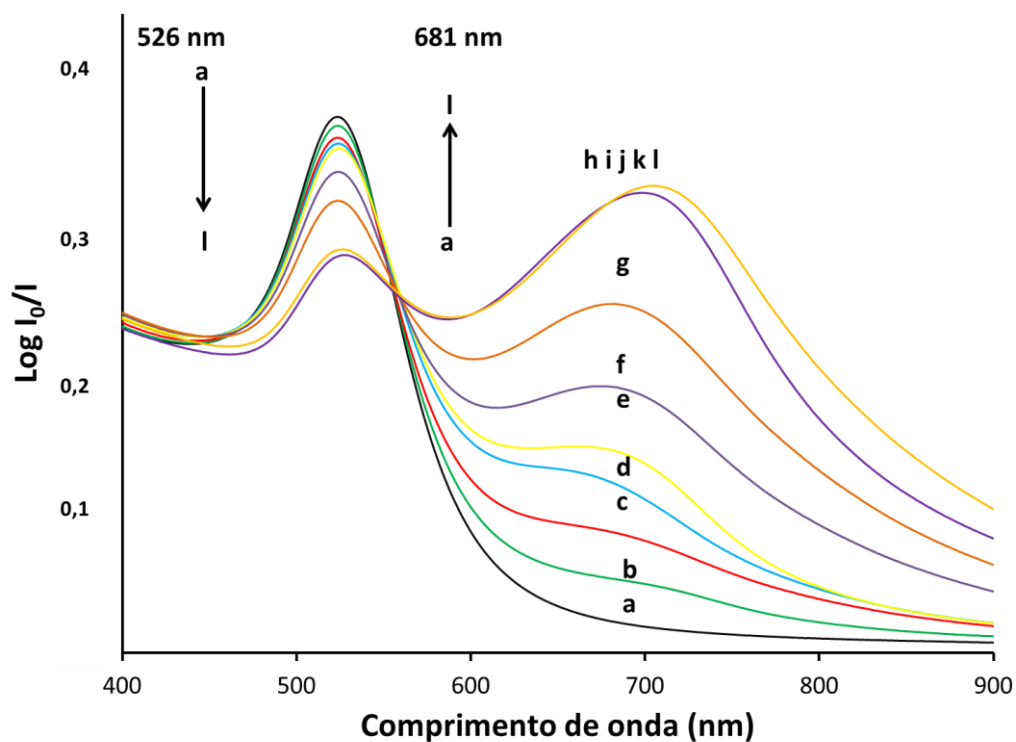


Figura 22: Espectros das dispersões de AuNPs ($4,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) na presença de gentamicina nas concentrações (a-l): 2,4; 4,3; 6,8; 7,7; 8,5; 9,4; 10,1; 11,9 e 13,6; 15,3 e 17,0 ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹).

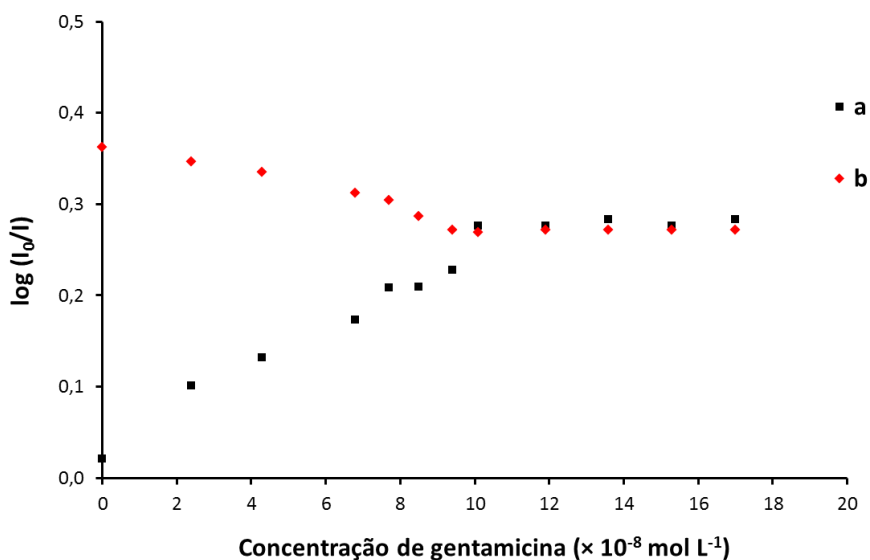


Figura 23: Avaliação das mudanças espectrais da dispersão de AuNPs ($4,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) em função do aumento da concentração de gentamicina com medição de sinal em comprimentos de onda fixos de 681 nm (a) e 526 nm (b).

A qualidade da resposta linear da sonda foi avaliada a partir da construção de dez curvas analíticas na faixa de concentração do analito entre $0,7 \times 10^{-8}$ e $10,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, cobrindo duas ordens de magnitude de concentração de sulfato de gentamicina. Esse experimento foi realizado com três réplicas autênticas. Duas curvas analíticas típicas são mostradas na Figura 24 e Figura 25.

Para o monitoramento do decréscimo de sinal no comprimento de onda de 526 nm, observou-se que o valor de coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9867 e a sensibilidade encontrada foi de $-8,43 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ (como mostrado na Figura 24A). O gráfico de resíduos da curva analítica mostrou uma dispersão de valores homogêneos, com o mostrado na Figura 24B (magnitude de dispersão similar) e sem tendência (pontos aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo das concentrações). Tal comportamento homocedástico das variâncias provou que a regressão linear simples foi adequada para o tratamento dos dados, e que de fato, o perfil de resposta é linear.

No caso da curva construída com os valores medidos em 681 nm, o coeficiente de determinação (R^2) foi 0,9945 com sensibilidade de $1,94 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ (como mostrado na Figura 25A). Como esperado, a sensibilidade da curva medida em 681 nm foi melhor que a da que foi construída com as medidas feitas em 526 nm. Porém, surpreendentemente, o perfil linear (avaliado pelo R^2) dessa segunda curva analítica foi melhor do que a da obtida com medições feitas em 526 nm muito embora exista o deslocamento do comprimento de onda máximo característico da banda de agregação. O perfil linear obtido comprovou que a escolhas pelas medições em comprimentos de onda fixos (mesmo não sendo o valor máximo da banda em função do aumento da concentração de gentamicina) foram adequadas em relação ao feito por outros autores que usaram razões entre valores medidos em ambas as bandas espectrais (a de ressonância transversal e a decorrente da aglomeração de AuNPs). Por exemplo, Wang *et al.* usou a razão de valores medidos em 635 nm e em 518 nm para estabelecer sua curva analítica com R^2 de 0,998.

O gráfico de resíduos da curva analítica construída com medições em 681 nm mostrou comportamento homocedástico das variâncias e confirmou que o perfil de resposta é linear (Figura 25B). As equações das curvas analíticas, incluindo os valores de desvios padrões, estão indicadas na Tabela 4.

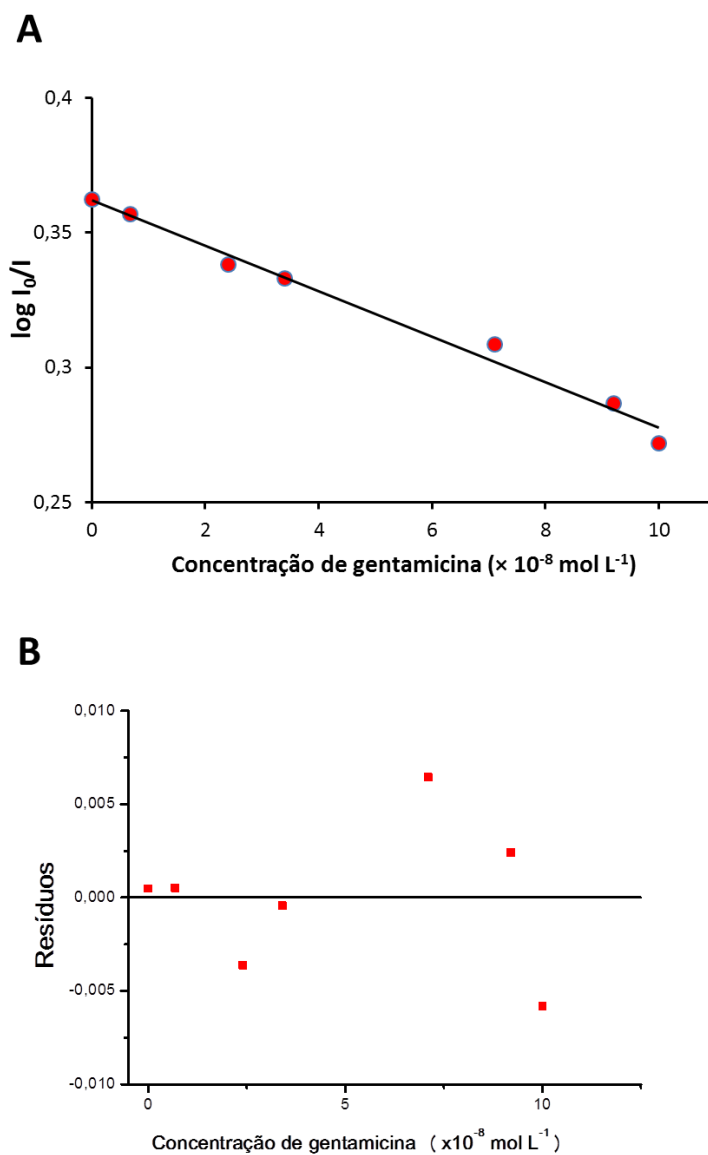


Figura 24: (A) curva analítica construída em função da concentração de sulfato de gentamicina na sonda aquosa de AuNPs ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) monitoradas em 526 nm e (B) gráfico de resíduos em 526 nm.

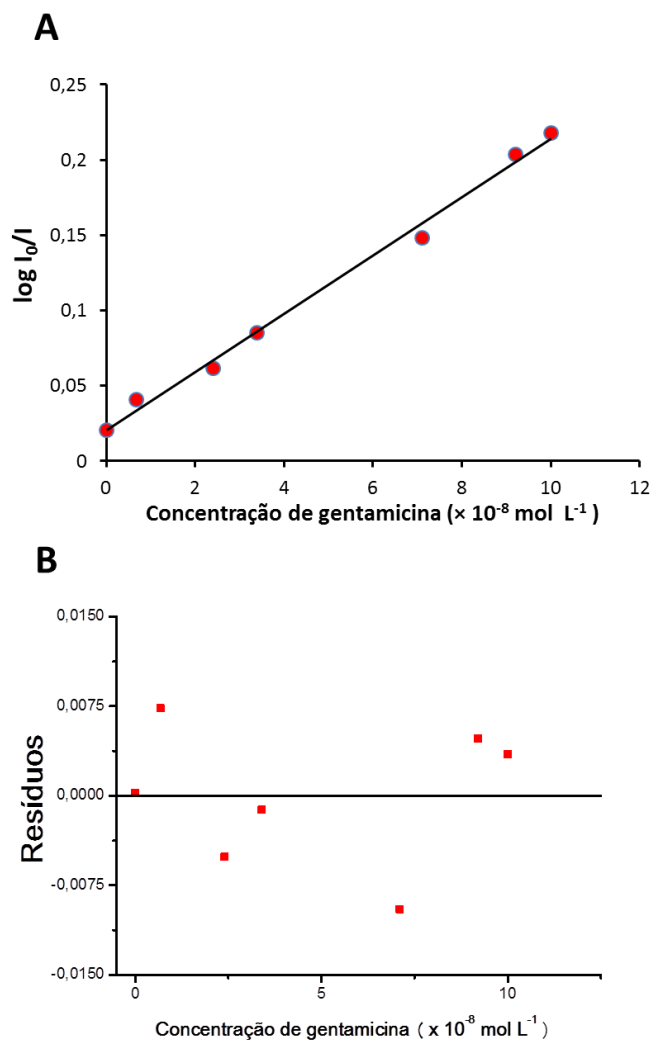


Figura 25: (A) curva analítica construída em função da concentração de sulfato de gentamicina na sonda aquosa de AuNPs ($4,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) monitorada em 681 nm e (B) gráfico de resíduos em 681 nm.

Tabela 4: Equações das curvas analíticas de gentamicina medida com a sonda de AuNPs-E.

λ (nm)	Equação da curva analítica	R^2
526	$Y = -(8,43 \pm 0,01) \times 10^5 X + (1,5 \times 10^{-3} \pm 2,2 \times 10^{-5})$	0,9867
681	$Y = (1,94 \pm 0,03) \times 10^6 X + (3,62 \times 10^{-1} \pm 1,10 \times 10^{-3})$	0,9945

A partir dos parâmetros da curva analítica calculou-se os valores de concentração equivalentes ao limite de detecção e ao limite de quantificação. Segundo os critérios usados, no comprimento de onda de 681 nm (sinal crescente) o cálculo foi realizado usando $x_b + ks_b$, onde x_b é a média do valor de sinal medido em 681 nm na dispersão branco, s_b é o desvio padrão das 10 medições da dispersão branco e k é um fator que indica um valor para o grau de confiabilidade para estabelecer o LOD ($k = 3$) e do LOQ ($k = 10$). Para o sinal decrescente, medido em 526 nm, o critério foi apenas $3s_b$ para o LOD e $10s_b$ para o LOQ, ou seja, é a concentração que produziu sinal ks_b menor do que o sinal do branco. Os valores de $0,3625 \pm 0,0010$ (CV de 0,7%) e de $0,0205 \pm 0,0010$ (CV de 5,8%) foram obtidos para os sinais medidos na dispersão branco em respectivamente 526 nm e 681 nm. Lembrando que o valor de CV significativamente maior em 681 nm é por conta do sinal analítico baixo medido quando comparado aos valores medidos em 526 nm (no máximo da banda plasmônica transversal) e por conta da maior variabilidade relativa de sinal medido na linha base do espectro em relação ao medido no máximo espectral. Os valores calculados de LOD e LOQ de sulfato de gentamicina, em mol L⁻¹, em ng mL⁻¹ ou em termos absolutos (em pg considerando 25 µL de amostra) são os mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Limites de detecção e de quantificação para o sinal monitorado em 529 e 681 nm.

λ (nm)	LOD (mol L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	ALOD (pg)*
	LOQ (mol L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)	ALOQ (pg)*
526	$4,2 \times 10^{-9}$	2,4	60
	$1,2 \times 10^{-8}$	6,8	170
681	$1,7 \times 10^{-9}$	1,0	25
	$5,3 \times 10^{-9}$	3,0	75

*Calculado para 25 µL de amostra

3.4.1. Precisão instrumental e intermediária

Estudou-se a precisão instrumental estimando-se os valores de CV que foram obtidos por meio de dez medições sucessivas de dispersões de trabalho com dois níveis de concentração de sulfato de gentamicina ($2,4 \times 10^{-8}$ e $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) monitoradas em 526 e 681 nm. Já a precisão intermediária foi obtida pelas medições do sinal de pares de cinco dispersões de trabalho contendo o analito ($2,4 \times 10^{-8}$ e $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹), também medidas tanto em 526 quanto em 681 nm. Na Tabela 6 são mostrados os resultados obtidos onde se percebe que as variações percentuais são menores que 2%, o que é adequado para medições analíticas no nível de concentração em questão.

Tabela 6: Precisão instrumental e precisão intermediária da sonda de AuNPs-E em relação á medida de sinal produzido por duas concentrações diferentes de sulfato de gentamicina.

$\lambda(\text{nm})$	Precisão	Precisão	Precisão	Precisão
	intermediária (%) ($2,4 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)	intermediária (%) ($7,1 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)	instrumental (%) ($2,4 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)	instrumental (%) ($7,1 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)
526	1,2	1,6	0,6	0,8
681	1,5	1,8	0,6	0,8

3.4.2. Robustez

A robustez do método foi avaliada com base no comportamento do sinal das dispersões-branco e das dispersões de trabalho (com $4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de analito) em relação à variação do pH do meio (faixa entre 2,5 e 9,0) sendo que todas as medições foram feitas dentro de um período de 2 h após a preparação das dispersões. De acordo com os resultados, o pH é um parâmetro robusto, pois o sinal da dispersão-branco foi constante em toda a faixa de pH testada (ver Figura 15A) apresentando um CV do valor do log (I₀/I) de 0,8% e 2,0% respectivamente para os comprimentos de onda de 526 nm e 681nm. No entanto, para as dispersões de trabalho contendo $4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de analito, robustez foi encontrada numa faixa mais estreita de pH (entre 2,5 e 5,5) em que se observou CV de 0,7% em ambos os comprimentos de onda (ver Figura 15B). Como se trabalhou na faixa ácida (pH 3,7), o parâmetro foi robusto para o método analítico.

No que se refere à estabilidade do sinal da sonda de AuNPs-E (em pH 3,7) em função do tempo após o preparo das dispersões, verificou-se que estas permanecem estáveis por 120 minutos (CV de 0,2%) como mostrado na Figura 14. Ao se estender as medições por até 240 min, o CV dos resultados aumentou para 0,6%, o que indicam uma estabilidade muito boa dentro das faixas de tempo estudadas.

Na (Figura 14B) pode se observar a estabilidade da dispersão de trabalho de AuNPs-E contendo $4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de sulfato de gentamicina com respeito ao tempo. Verifica-se que a intensidade do sinal da dispersão de trabalho é estável no tempo estudado (120 min) com valores de CV iguais a 0,3% e 0,4% nos comprimentos de onda 526 e 681 nm respectivamente. Estes resultados indicaram que o método considerou-se robusto na faixa do pH da sonda, no transcurso do tempo de análise.

3.5.

Estudos da seletividade da sonda em relação aos componentes das matrizes de medicamentos comerciais de gentamicina

Antes de se avaliar a aplicabilidade da sonda analítica de AuNPs na determinação de sulfato de gentamicina em amostras de formulações farmacêuticas comerciais injetáveis, testes de seletividade foram realizados. Assim, avaliou-se a resposta da sonda na presença de substâncias químicas que podem compor uma matriz de tal tipo de medicamento. A lista de substâncias que podem constituir a matriz de medicamentos injetáveis e as quantidades esperadas para estas se encontram na Tabela 7. No caso do ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, os valores foram estimados em função do pH original de amostras de medicamentos adquiridos para o teste (pH entre 3,4 e 3,6).

A seletividade foi avaliada em função da comparação do perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-E que continham concentrações fixas de analito ($4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência de componentes adicionais e na presença de quantidades variadas de cada um dos componentes esperados para a matriz (excipientes) do medicamento. Deste modo obteve-se a razão porcentual de $[\log (I_0/I)_{\text{analito}} / \log (I_0/I)_{\text{analito} + \text{excipiente}}] \times 100$, onde $\log (I_0/I)_{\text{analito}}$ é o valor do sinal medido da sonda na presença do analito e $\log (I_0/I)_{\text{analito} + \text{excipiente}}$ é o valor do sinal medido da sonda nas presenças do analito e do excipiente. As faixas de proporções molares analito:excipiente avaliadas variaram de acordo com o excipiente e foram aproximadamente de 1:0,01 a 1:1 na sonda. Os resultados dos testes são exibidos na Tabela 8 e na Tabela 9, onde são mostradas as variações percentuais de sinal nos comprimentos de onda de 526 e 681 nm respectivamente.

Pode-se constatar que a presença de excipientes orgânicos e inorgânicos, em geral, não provocaram uma variação de sinal maior do que 2% (quase sempre uma variação negativa) independentemente do comprimento de onda monitorado. A exceção foi o cloridrato de bromexina que promoveu uma variação negativa de -5,5% (na proporção gentamicina:bromexina de 1:0,1) a 2,3% (proporção gentamicina:bromexina de 1:0,01) quando o sinal foi medido em 526 nm e entre 25,8% (na proporção gentamicina:bromexina de 1:0,1) e 12,1% (na proporção gentamicina:bromexina de 1:0,01) quando o sinal foi medido em 681 nm, o que

indica que esta substância é um interferente do método. Possivelmente a interferência provocada pela bromexina no sinal da sonda se deve à interação da carga positiva do grupo amino do composto (contra íon do cloreto no cloridrato de bromexina) com a carga negativa típicas das AuNPs-E em meio ácido. Essa interação contribui com a agregação das nanopartículas, e por consequência, induziu a variação no sinal da sonda.

Cabe ressaltar que para a maioria dos excipientes, as proporções molares gentamicina:excipiente iguais a 1:1 ou mesmo 1:0,1 são muito acima da proporção esperada nos medicamentos, ou seja, a seletividade da sonda em relação á presença da maioria dos excipientes orgânicos e inorgânicos é elevada.

Tabela 7: Quantidades esperadas dos componentes (excipientes) por 1 mL de solução injetável de sulfato de gentamicina (por 100 mg do princípio ativo).

Substancia	Quantidade	Teor por 1 mL de solução (densidade de 1 g mL⁻¹)
Ácido etilenodiamino tetra-acético EDTA	0,1 mg	0,01%
Metabissulfito de sódio	3,2 mg	0,32%
Acetato de sódio anidro	4,5 mg	0,45%
Ácido acético glacial	3 mg	0,30%
Metilparabeno	0,8 mg	0,08%
Propilparabeno	0,1 mg	0,01%
Cloridrato de bromexina	0,1 mg	0,01%
Ácido sulfúrico e ou / hidróxido de sódio	Quantidades adicionadas para ajustar o pH da solução de analito (pH x) para pH 3,0 (H ₂ SO ₄) e pH 5.5 (NaOH). ^a	Não calculado

^aFaixa de pH indicada na instrução do medicamento injetável (medicamento A)

Tabela 8: Monitoramento em 526 nm, referente a percentagem de variação do sinal da dispersão de trabalho da sonda de AuNPs-E contendo $4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de sulfato de gentamicina, em presença de proporções crescentes dos excipientes orgânicos e inorgânico contidos na patentes das soluções injetável de gentamicina.

Excipientes	% Variação de Sinal						
	Proporção						
	1,0 : 0,001	1,0 : 0,005	1,0 : 0,01	1,0 : 0,05	1,0 : 0,1	1,0 : 0,5	1,0 : 1,0
EDTA	-0,49	-0,97	-1,0				
Acetato de sódio anidro					-0,31	-0,59	-0,86
Ácido acético glacial					-0,19	-0,37	-0,54
Bromexina			-2,30	-4,50	-5,55		
Metabissulfito de sódio					-0,20	-0,37	-0,47
Metilparabeno			-0,17	-0,66	-0,94		
Propilparabeno	0,01	-0,08	-0,51				

Tabela 9: Monitoramento em 681 nm, referente a porcentagem de variação do sinal da dispersão de trabalho da sonda de AuNPs-E contendo $4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de sulfato de gentamicina, em presença de proporções crescentes excipientes orgânicos e inorgânico contidos na patentes das soluções injetável de gentamicina.

Excipientes	%Variação de Sinal						
	Proporção						
	1,0 : 0,001	1,0:0,005	1,0 : 0,01	1,0 : 0,05	1,0: 0,1	1,0: 0,5	1,0 : 1,0
EDTA	-0,52	-0,56	-1,5				
Acetato de sódio anidro					-0,39	-1,44	-1,65
Ácido acético glacial					-0,27	-1,45	-1,70
Bromexina			12,0	15,6	25,5		
Metabissulfito de sódio					-0,52	-1,31	-1,56
Metilparabeno			-0,12	-0,37	-0,57		
Propilparabeno	-0,11	0,15	-1,50				

3.5.1. Ensaio de recuperação

Levando em conta a interferência promovida pela bromexina procurou-se avaliar a viabilidade do método frente a utilização de amostras de formulações farmacêuticas injetáveis de gentamicina que não possuíam cloridrato de bromexina em sua composição. Tais medicamentos foram encontrados no comércio e denominados de medicamento A (contendo 44 mg de sulfato de gentamicina por mL de solução e densidade entre 1,10 a 1,04 g mL⁻¹) e medicamento B (contendo 40 mg de gentamicina por mL de solução e densidade entre 1,10 a 1,04 g mL⁻¹), ambos de uso veterinário e dentro da validade de uso. A composição exata de excipientes não foi indicada. Além disso, uma solução simulada de gentamicina, denominada de controle (C), cuja concentração foi ajustada em 38,5 mg de padrão de gentamicina por mL de solução também foi usada. O objetivo desse controle foi referente à obtenção de um valor recuperado com base na composição de gentamicinas do padrão analítico disponível, já que a composição de gentamicinas nos medicamentos não é conhecida (não indicada nas instruções da formulação).

Esses ensaios de recuperação foram feitos em três réplicas (para assegurar um intervalo de confiança para o resultado). Vale salientar que as análises foram feitas com o monitoramento nos dois comprimentos de onda (526 e 681 nm) com ajuste da quantidade de gentamicina adicionada na sonda da ordem teórica de $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (concentração na faixa central da curva analítica). Os resultados destes estudos (Tabela 10) mostraram percentagem de recuperação percentual da amostra controle (C) de $96,7 \pm 0,04$ para $n = 3$.

As recuperações obtidas para o medicamento A e para o medicamento B foram, respectivamente, $95,88 \pm 0,42$ e $95,85 \pm 0,02$ ($n = 3$), tais valores se encontram próximos dos valores nominais das bulas. De fato, para o medicamento A, em que se tem uma faixa esperada de sulfato de gentamicina para que este tenha potência de ação (39,6 a 55,0 mg mL⁻¹), o valor recuperado indica que o medicamento estaria adequado para uso.

Para efeito de comparação, aos medicamentos foram também analisados usando o método colorimétrico com derivatização do sulfato de gentamicina com ninidrina reagente. Este estudo comparativo foi realizado com base no método proposto por Frutos P.*et al.* (2000). Vale salientar que como a derivatização com ninidrina se baseia na reação do agente cromofórico com os grupos amino da gentamicina, o cloreto de bromexina também seria um interferente do método.

Como o método colorimétrico é duas vezes menos sensível que o método proposto nessa dissertação (LOD de $0,39 \text{ mg L}^{-1}$ ou $7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ usando massa molar média de $563,5 \text{ g mol}^{-1}$), a concentração esperada (ajustada) de sulfato de gentamicina nas soluções a serem analisadas foi $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Essas análises foram também realizadas em três réplicas e os resultados, mostrados na Tabela 11, corroboram os resultados obtidos com o método proposto com uso de sonda de AuNPs-E.

Tabela 10: Recuperação das amostras simuladas e das amostras reais de soluções injetáveis de gentamicina utilizando a sonda de AuNPs-E, com monitoramento dos sinais em 526 nm e 681 nm.

Amostra	Sinal em 526 nm				
	Concentração prevista ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Teor encontrado (mg mL^{-1})	Teor referenciado pelo fabricante (mg mL^{-1})
C	19	18,3	$96,1 \pm 0,5$	37,0	38,5
A	19	18,1	$95,4 \pm 0,2$	42,0	44,0
B	19	18,1	$95,2 \pm 0,3$	38,1	40,0

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1322109/CA

Amostra	Sinal em 681 nm				
	Concentração prevista ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Teor encontrado (mg mL^{-1})	Teor referenciado pelo fabricante (mg mL^{-1})
C	19	18,5	$97,2 \pm 0,3$	37,4	38,5
A	19	18,3	$96,4 \pm 0,6$	42,4	44,0
B	19	18,3	$96,5 \pm 0,2$	38,6	40,0

Tabela 11: Recuperação das amostras controle e das amostras reais de soluções injetáveis utilizando o método colorimétrico.

Amostra	Concentração prevista ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Teor encontrado (mg mL^{-1})	Teor referenciado pelo fabricante (mg mL^{-1})
C	75	72,4	$96,53 \pm 1,2$	37,2	38,5
A	75	73,8	$98,37 \pm 1,3$	43,3	44,0
B	75	70,7	$94,36 \pm 1,2$	37,7	40,0

Por fim realizou-se testes estatísticos comparativos. Primeiramente, o teste de Fisher-Snedocor (Teste F) foi realizado para comparar se variâncias dos resultados obtidos é similar. Os resultados são mostrados na Tabela 12. O teste de comparação de médias para comparar os resultados recuperados com os dois métodos o teste-t de Student para comparar os valores médios obtidos com os dois métodos. Os resultados são mostrados na Tabela 12 e indicam que os resultados obtidos, nos três casos (medicamentos e amostra controle) foram iguais considerando o intervalo de confiança de 95% (g.l. = 2).

O resultado do teste t calculado a partir dos valores alcançados no comprimento de onda 526 nm foram 2,0; 2,0; 1,7; para os percentuais de recuperação das amostras A, das amostras B e das amostras controle C, no devido ordem. Da mesma maneira atingiu-se valores dos testes t-student no comprimento de onda 681nm de 1,5; 1,6; e 3,2 para os percentuais de recuperação da amostra A, da amostra B e das amostras controle C, no devido ordem.

Tabela 12: Resultado do teste-F e do teste t-student aplicados aos valores alcançados nos determinação de gentamicina utilizando o método da literatura (colorimétrico) e o método da sonda de AuNPs-E.

Método	Teste ^aF	AuNPs-E	AuNPs-E
		(526 nm)	(681 nm)
De	A	31	4,3
	B	17	29
	C	8,0	15
Referencia	Teste ^bt-student		
	A	2,0	1,5
	B	2,0	1,6
	C	1,7	3,2

a *F-Crítico* = 39

b *t-Crítico* = 4,303

4 Resultados e discussão-Parte II

4.1. Síntese de nanobastões de ouro

Nanopartículas de ouro em forma de bastão (AuNPs-B) foram empregadas no desenvolvimento do método analítico para a determinação de gentamicina (na forma de sulfato). Esses AuNPs-B foram sintetizados com base no “método de semente” relatado por Babak & Mostafa e que tem duas etapas (NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003). A primeira etapa da síntese consiste na preparação da “dispersão semente”, que são nanopartículas de ouro pequenas e esféricas (segundo El Sayed em torno 4 nm), à temperatura ambiente e com agitação muito lenta durante 15 min. Na segunda etapa, a “dispersão semente” é adicionada à outra solução contendo precursor de ouro, em ambiente contendo CTAB muito acima da CMC, onde as pequenas nanopartículas servem como pontos de partida para o crescimento, a princípio isotrópico, entre 27 e 30°C, até o ponto em que sofre restrição direcional de crescimento, imposto pela estrutura organizada de surfactante. Nessa solução, AgNO_3 é incluído como aditivo diminuir a repulsão entre as cargas positivas da cabeça do CTAB, ajudando na organização do surfactante no meio (PARK *et al.*, 2013).

Partindo desse procedimento, preparou-se diferentes partidas de dispersões de AuNPs-B usando a abordagem de “dispersão semente. Com relação à segunda etapa, alterou-se as proporções de reagentes e suas concentrações, com base em conhecimento previamente obtido e cujos resultados não foram reportados(PANDOLI; FONTANA, [s.d.]) , variando em 5°C a temperatura, a partir de 30°C e mantendo a agitação branda em 400 rpm. Desta maneira foram realizadas cinco diferentes partidas de síntese de AuNPs-B, a primeira a 30°C e última com 50°C. Na Figura 26 pode-se observar os perfis espectrais das dispersões

obtidas de AuNPs-B, que apresentaram as bandas características de SPR transversal (com máximo em torno de 520 nm) e de SPR longitudinal (com máximos na faixa entre 662 e 761 nm). Esta última é característica das nanopartículas de ouro em forma de bastão. O estudo mostrou que existe uma tendência de deslocamento batocrômico da banda com polarização longitudinal na medida em que a temperatura de reação é aumentada como relatada na literatura, (Gonzalez *et al.* 2013) sendo esse fato relacionado com o aumento da razão de aspectos da nanoestrutura. Além disso, pôde-se observar que a dispersão de síntese de AuNPs-B feita 30°C apresentou um perfil espectral da banda de polarização longitudinal mais fino ($\Delta\lambda$ de 98 nm) em relação aos valores de $\Delta\lambda$ das bandas obtidas nas outras sínteses (105 nm a 35°C e 158 nm acima de 40°C). Além disso, com a síntese feita à 30°C, a intensidade da banda de polarização transversal foi mais intensa. Outra vantagem da síntese em 30°C foi a facilidade com que se conseguiu a manutenção da estabilidade de temperatura ao longo dos 120 min do processo, já que esta era mais próximo da temperatura ambiente do laboratório. Após 120 min o leve aquecimento foi interrompido juntamente com a agitação, para ser estocado na geladeira. Assim, nas condições escolhidas para a síntese das AuNPs-B (temperatura de reação de 30°C por 120 min e com 400 rpm de agitação) obteve-se o perfil espectral da Figura 27. Cada dispersão de síntese foi usada por um período máximo de 30 dias em que tais características eram mantidas. Vale salientar que as dispersões mantidas por um período mais longo de geladeira acarretou no deslocamento hipsocrômico da banda de polarização longitudinal com a tendência a coalescer com a banda de polarização transversal.

É válido ressaltar que Park *et al.* (2013) realizaram um estudo detalhado do crescimento de nanobastões em função do tempo e das condições de síntese avaliando-se o impacto na morfologia do nanomaterial.

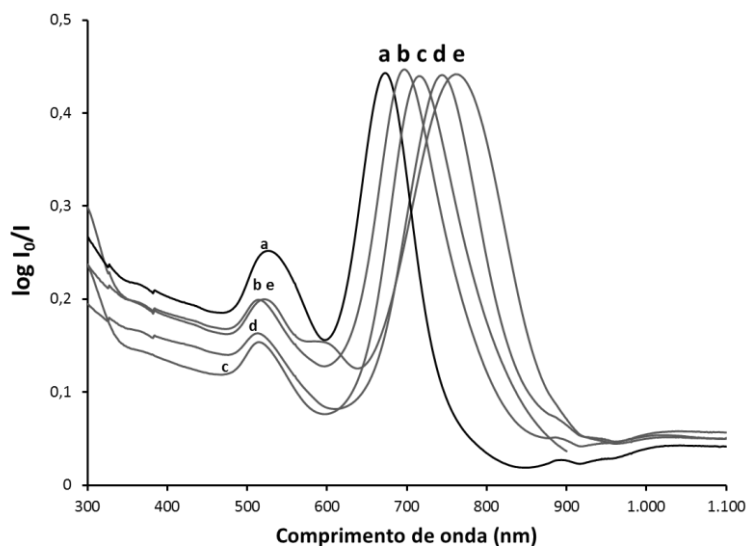


Figura 26: Perfis espectrais de SPR longitudinal e transversal medidos das dispersões de AuNPs-B sintetizadas com diferentes temperaturas: (a) 30°C; (b) 35°C; (c) 40°C; (d) 45°C e (e) 50°C; As dispersões sintetizadas foram diluídas com água na proporção de 1/6 v/v.

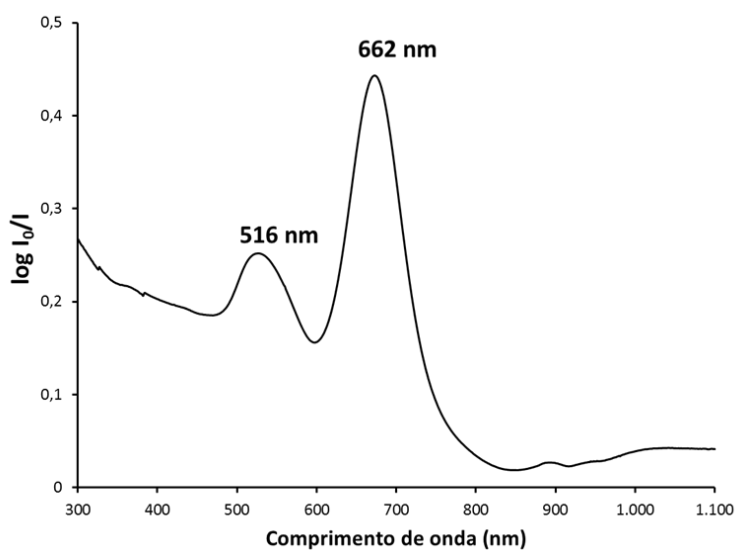


Figura 27: Perfil espectral de SPR da dispersão de AuNPs-B sintetizada na temperatura de reação 30°C sob agitação de 400 rpm por 120 min. Espectro obtido com dispersão de síntese diluída com água na proporção de 16/84% v/v.

Zhu Yingyue *et al.* (2011), quando trabalharam com uma sonda de analítica de AuNPs-B modificadas com anticorpos de gentamicina (moléculas-alvo do referido estudo), percebeu que o CTAB no meio aquoso (presente por conta da

síntese dos AuNPs-B) impedia a reação antígeno-anticorpo, e por sua vez a liberação de nanobastões da estrutura associada destes (ZHU et al., 2011). Tal impedimento foi atribuído à interação eletrostática entre monômetros de CTAB, carregados positivamente, com a superfície da montagem de nanobastões. De igual maneira, na presente dissertação, fez-se uma avaliação do efeito provocado pela presença da gentamicina nas características espectrais da dispersão de AuNPs-B com diferentes quantidades de CTAB, ou seja, a quantidade original proveniente da fração de dispersão de síntese e a quantidade remanescente de CTAB proveniente da dispersão de síntese submetida a duas centrifugações para limpeza dos nanobastões.

Para tal estudo, quatro alíquotas da dispersão estoque de AuNPs-B foram diluídas com água (na proporção 16/84% v/v), tomando-se a primeira das alíquotas diluídas como dispersão branco, ou seja, aquela em que não se adicionou sulfato de gentamicina. Nas quatro alíquotas diluídas restantes (dispersões de trabalho) volumes crescentes de sulfato de gentamicina em três níveis de concentração final ($1,7$; $3,4$; e $6,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). O fator de diluição da dispersão de síntese foi escolhido para que a resposta espectral da banda de SPR transversal da dispersão branco tivesse intensidade máxima entre de 0,40 e 0,50. Os perfis espectrais das quatro dispersões são mostrados na Figura 28 onde se pode observar que não houve variação de intensidade em função da presença de gentamicina, o que indicou que a interação entre o AMG e a superfície dos nanobastões foi bloqueada, provavelmente pelo CTAB que se encontrava em elevada concentração no meio.

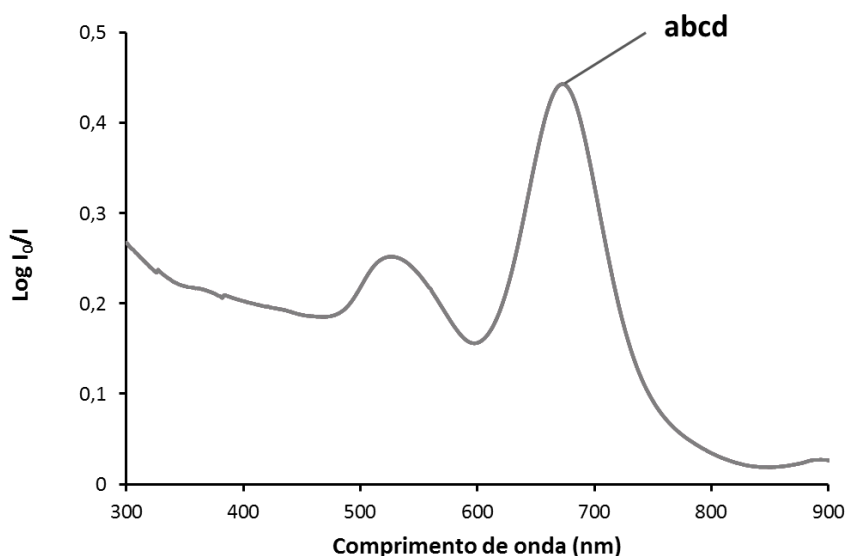


Figura 28: Perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-B na ausência e na presença de gentamicina nas concentrações finais de (a) 0,0; (b) 1,7; (c) 3,4 e (d) 6,8 ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹). Espectro obtido com dispersão de síntese diluída com água na proporção de 16/84% v/v.

Por conta desse resultado, procedeu-se a limpeza da dispersão de modo a reduzir a quantidade de CTAB presente na dispersão estoque de AuNPs-B. Tal limpeza consistiu em tomar 10 mL da dispersão de síntese e submetê-la a uma etapa de centrifugação (a 8000 rpm durante 30 min) para concentrar as AuNPs-B num pellet no fundo do tubo de centrifugação. Em seguida, 9 mL do sobrenadante foram retirados e descartados. O material restante no fundo do tubo foi disperso novamente usando água ultrapura reconstituindo o volume inicial de 10 mL. Ao se comparar os perfis espectrais de dispersões-branco preparadas com a dispersão de síntese original e com a dispersão de síntese limpa (após uma etapa de centrifugação) verificou-se uma redução de 25% da intensidade (medida em 662 nm) da banda de SPR transversal, o que indica que houve perda de uma fração de AuNPs-B ao longo do processo de limpeza (Figura 29). No entanto, como a intensidade da banda se encontrava em torno de 0,35, essa dispersão de trabalho preparada a partir da dispersão mais limpa, foi usada tal qual para a avaliação do efeito da presença de gentamicina.

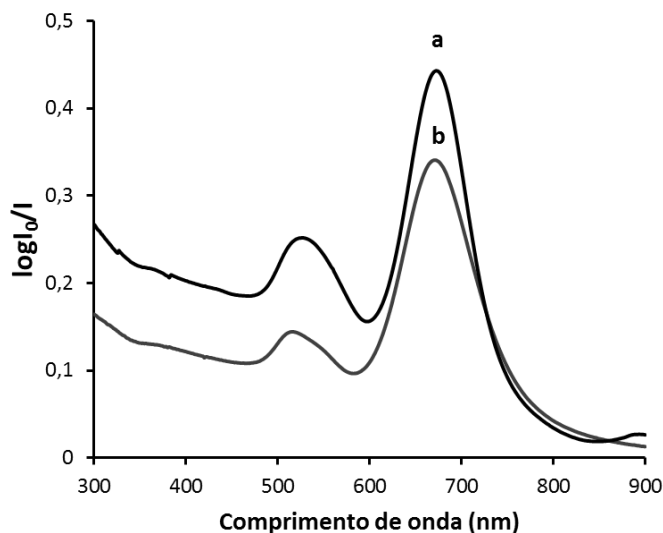


Figura 29: Comparação dos perfis espectrais obtidos de dispersões-branco preparadas com: (a) dispersão de síntese original e (b) dispersão de síntese submetida ao processo de limpeza (uma etapa de centrifugação). Espectro obtido com dispersão de síntese diluída com água na proporção de 16/84% v/v.

Ao se comparar os perfis espectrais da dispersão-branco e das dispersões de trabalho (contendo três diferentes concentrações de sulfato de gentamicina: 1,7; 3,4; e $6,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas a partir da dispersão de síntese limpa (após uma etapa de centrifugação) não se observou praticamente nenhum efeito que demonstrasse a interação entre a gentamicina e a superfície das AuNPs-B, já que a variação de sinal medido nos máximos das bandas de SPR foi imperceptível (Figura 30).

Portanto, complementou-se o procedimento de limpeza com uma segunda etapa, a centrifugação da dispersão aquosa do pellet de AuNPs-B obtido após a primeira centrifugação. Esse procedimento teve o objetivo de limpar ainda mais a dispersão, reduzindo a quantidade de CTAB. O material obtido após o descarte de 9 mL do sobrenadante (pellet e sobrenadante remanescente) dessa segunda etapa foi disperso em água (complementando o volume de 10 mL) e uma alíquota, preparada como dispersão branco, foi avaliada por espectrofotometria no UV-vis. O perfil espectral das dispersões-branco de AuNPs-B antes e depois da segunda etapa de limpeza foram similares, o que indicou que na segunda

centrifugação, não se perdeu quantidades relevantes de AuNPs-B na solução que foi descartada.

Finalmente, quando se comparou o perfil espectral da dispersão branco, preparada com o perfil da dispersão de síntese submetida às duas etapas de centrifugação, com as dispersões de trabalho contendo concentrações crescentes de sulfato de gentamicina (1,7; 3,4; e $6,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) observou-se (Figura 31) que ambas as bandas de SPR das AuNPs-B sofrem um decréscimo inversamente proporcional à quantidade de gentamicina presente, ou seja, após as etapas de limpeza há possibilidade de se estabelecer interação entre a gentamicina e as AuNPs-B. Desta maneira, confirmou-se que existia a necessidade de se minimizar a quantidade de CTAB na dispersão de síntese das AuNPs-B antes de se preparar as dispersões de trabalho.

Por conta desse resultado, as dispersões de trabalho usadas para fins analíticos foram preparadas a partir dessa dispersão estoque. O pH da dispersão de AuNPs-B submetida às etapas de limpeza (denominada agora de dispersão estoque) foi 5,2, igual ao valor de pH da dispersão de síntese.

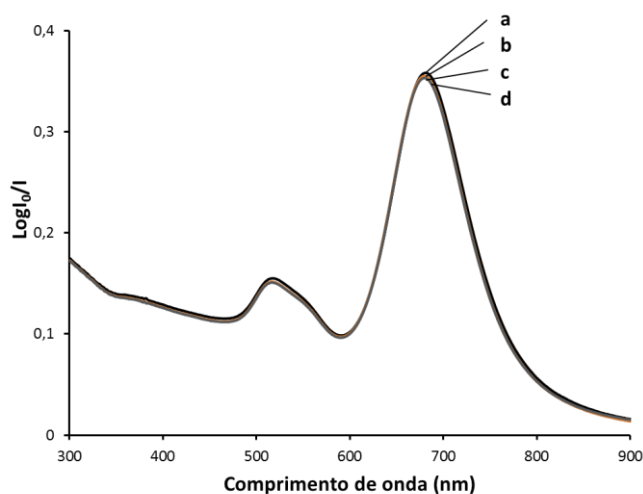


Figura 30: Perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-B: na ausência de gentamicina e na presença de gentamicina nas concentrações finais de (a) 0,0; (b) 1,7; (c) 3,4; e (d) $6,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Espectro obtido com dispersão de síntese (após limpeza com uma etapa de centrifugação) diluída com água na proporção de 16/84% v/v.

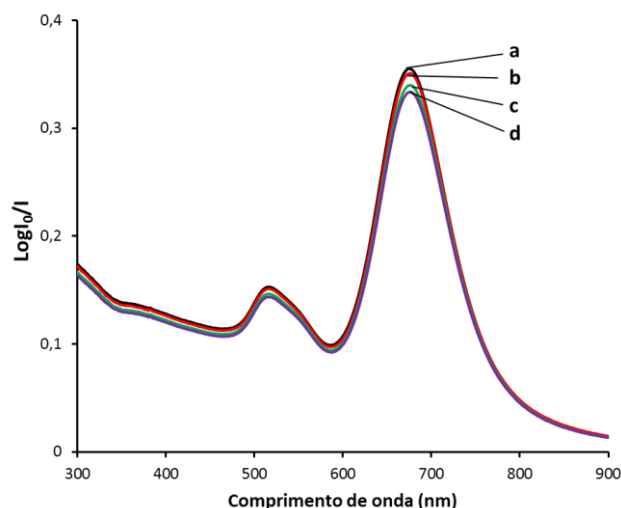


Figura 31: Perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-B: na ausência de gentamicina e na presença de gentamicina nas concentrações finais de (a) 0,0; (b) 1,7; (c) 3,4; e (d) $6,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Espectro obtido com dispersão de síntese (após limpeza com duas etapas de centrifugação) diluída com água na proporção de 16/84% v/v.

Vale salientar que um procedimento de limpeza, com uma terceira etapa de centrifugação, não foi tentado, pois a remoção excessiva de CTAB da dispersão causaria a aglomeração das nanopartículas tornando a sonda óptica instável. Vale ressaltar ainda que a dispersão-branco, preparada da dispersão estoque (armazenada em geladeira), manteve o perfil espectral mostrado na Figura 6 (espectro a) por um período de três dias. Dispersões estoque armazenadas por períodos maiores apresentaram queda de intensidade das bandas de SPR, provavelmente ocasionada pela aglomeração natural dos nanobastões no meio contendo baixa concentração de surfactante. Assim, a cada três dias, uma nova dispersão estoque foi preparada a partir da dispersão de síntese, essa sim estável por longo período.

4.2.

Morfologia das nanopartículas e cálculo da concentração

Na imagem das AuNPs-B da dispersão estoque (Figura 32), nota-se que a maior parte das nanopartículas presentes tem formato de bastão. No entanto, também visualizou-se uma menor proporção de nanopartículas em forma quadrada,

e em formato esférico. As nanopartículas em forma quadrada são o resultado de um estado de transição na formação de partículas em forma de bastão.

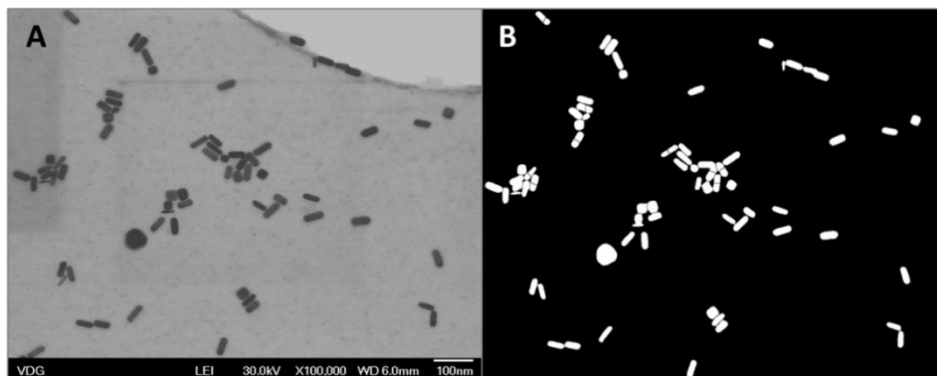


Figura 32: Imagens por STEM das AuNPs-B da dispersão estoque. (A) imagem original; (B) imagem depois do processamento através do programa Image J (FIJI).

A análise morfológica das AuNPs-B da dispersão de estoque foi feita (empregando o programa Image J(FIJI)), gerando os histogramas da Figura 33 para a estimativa dos parâmetros (circularidade, diâmetro dos eixos, razão de aspectos e área) das nanopartículas em forma de bastão encontrado em uma área amostral específica que idealmente representa a dispersão como um todo.

A partir dos histogramas pode-se observar que as dimensões do eixo maior variaram de 35 a 45 nm (Figura 33A), e as do eixo menor variaram de 16 a 20 nm (Figura 33B). Desta forma o diâmetro médio das AuNPs-B foi de 28,5 nm. A circularidade destas nanopartículas ficou na faixa de 0,65 a 0,70 nm (Figura 33C), o que se desvia da forma esférica (circularidade próxima da unidade), tais valores estão de acordo com o esperado para uma síntese que visou à obtenção de nanobastões.

No histograma da razão de aspectos tem-se duas regiões bem definidas (Figura 33D). Uma delas está centrada em valores próximos de 1, que são da pequena fração de nanopartículas esféricas e quadradas no sistema. A outra região mostra nanopartículas com razão de aspecto médio de 2,4, indicando que, na maioria dos nanobastões um dos eixos é um pouco mais do que duas vezes maior que o eixo menor. Por último, a maior parte das nanopartículas em forma de bastão mostraram áreas que oscilam entre 450 a 650 nm² (Figura 33E) com área média de 563 nm². Os dados da morfologia encontram-se resumidos na Tabela 13.

A concentração de AuNPs-B na dispersão estoque foi calculada com base no valor do diâmetro médio (28,5 nm) das nanopartículas e dos parâmetros experimentais e físicos já mencionados. Desta forma a concentração estimada de AuNPs-B na dispersão estoque foi de $2,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

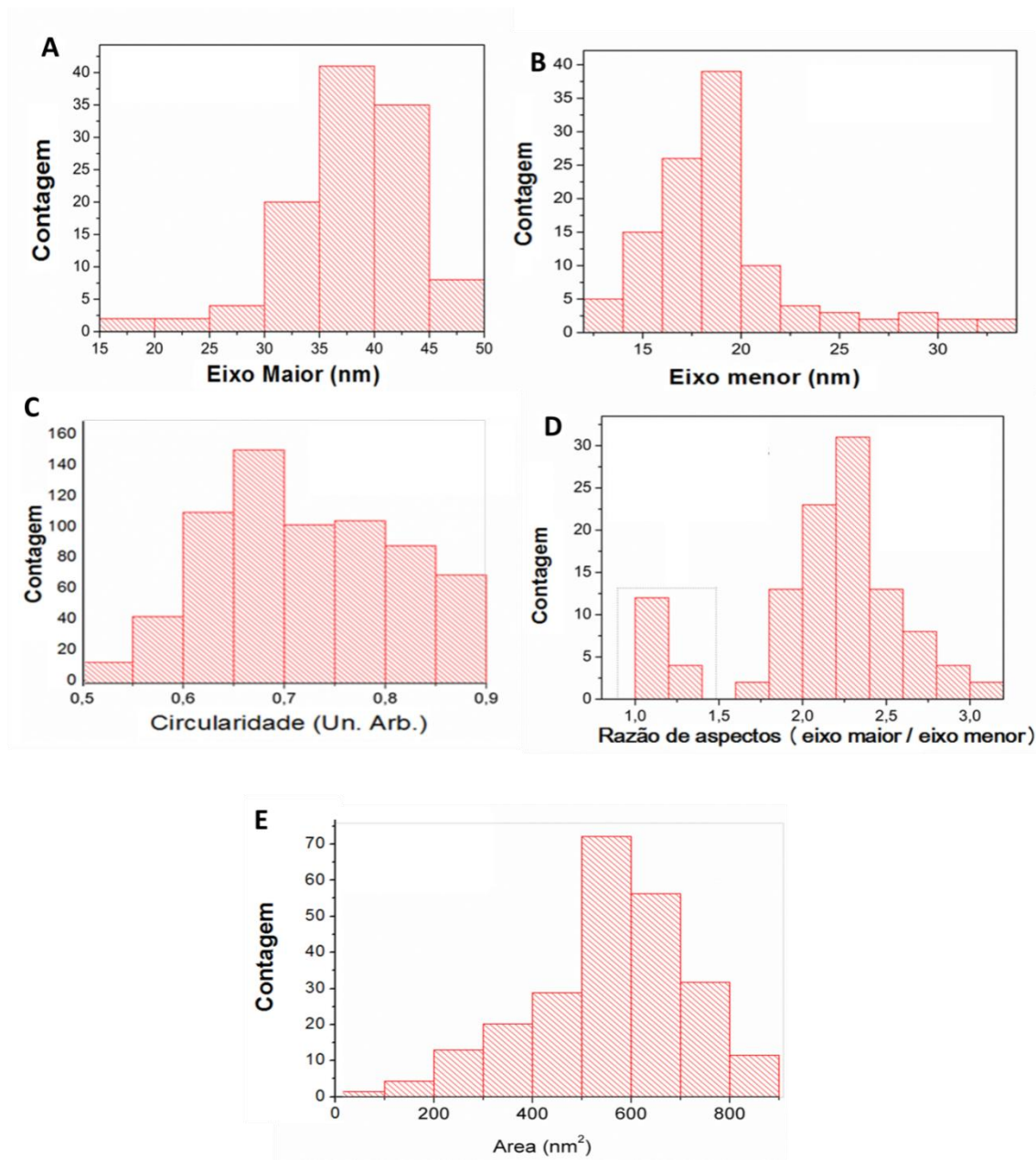


Figura 33: Histogramas resultantes do processamento das imagens da AuNPs-B (imagem da Figura 7) indicando: (A) diâmetro do eixo maior, (B) diâmetro do eixo menor, (C) circularidade; (D) razão de aspectos (eixo maior/eixo menor); (E) área superficial.

Tabela 13: Estimativa das características morfológicas das AuNPs-B da dispersão estoque.

Medias das dimensões da AuNPs-B					
Eixo maior (nm)	Eixo menor (nm)	Diâmetro médio (nm)	Razão de aspectos	Circularidade Média	Área (nm²)
37,8 ± 5,6	19,2 ± 4,0	28,5 ± 4,8	2,4 ± 0,6	0,7 ± 0,1	563 ± 133

4.3.

Estudos da sonda de AuNPs-B em função da presença de gentamicina

4.3.1.

Magnitude da resposta

Com o propósito de estudar a resposta óptica da dispersão de AuNPs-B (sonda) em função da presença de gentamicina, aplicou-se o protocolo do preparo das dispersões-branco, que foi constituída por 16% v/v da dispersão estoque (a que passou pelo processo de limpeza) completando-se o volume total com água ultrapura. Ao final a concentração de AuNPs-B foi de $3,8 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ com sinal, em termos de log (I₀/I), em torno de 0,35. Nas dispersões de trabalho, um volume específico (da ordem de microlitros) de solução padrão de sulfato de gentamicina foi incorporado à dispersão antes de se avolumar com água ultrapura.

Desta forma, preparou-se três réplicas de dispersões-branco e três conjuntos de três réplicas de dispersões de trabalho de AuNPs-B, cada conjunto contendo quantidades diferentes de gentamicina (adicionada a partir de volumes crescentes de solução aquosa padrão de sulfato de gentamicina $8,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ da maneira a se obter concentrações finais de analito de $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (0,12 nmol); $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (0,36 nmol) e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (0,51 nmol). Os espectros médios

conseguidos de cada conjunto de réplicas das dispersões são mostrados na Figura 34.

Os resultados indicaram que na medida em que a concentração de gentamicina aumentava na sonda, os sinais medidos tanto em 516 nm quanto em 662 nm decresciam, com diminuição do sinal mais destacada em 662 nm (Figura 34A). Tais decréscimos apresentaram tendências lineares, sendo o valor de R^2 igual a 0,9716 em 516 nm e de 0,9943 em 662 nm, como é indicado na Figura 34B e Figura 34C. A sensibilidade do decréscimo do sinal em 662 nm ($-4,2 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$) foi mais de quatro vezes maior do que a observada para o comprimento de onda de 526 nm ($-9,8 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$).

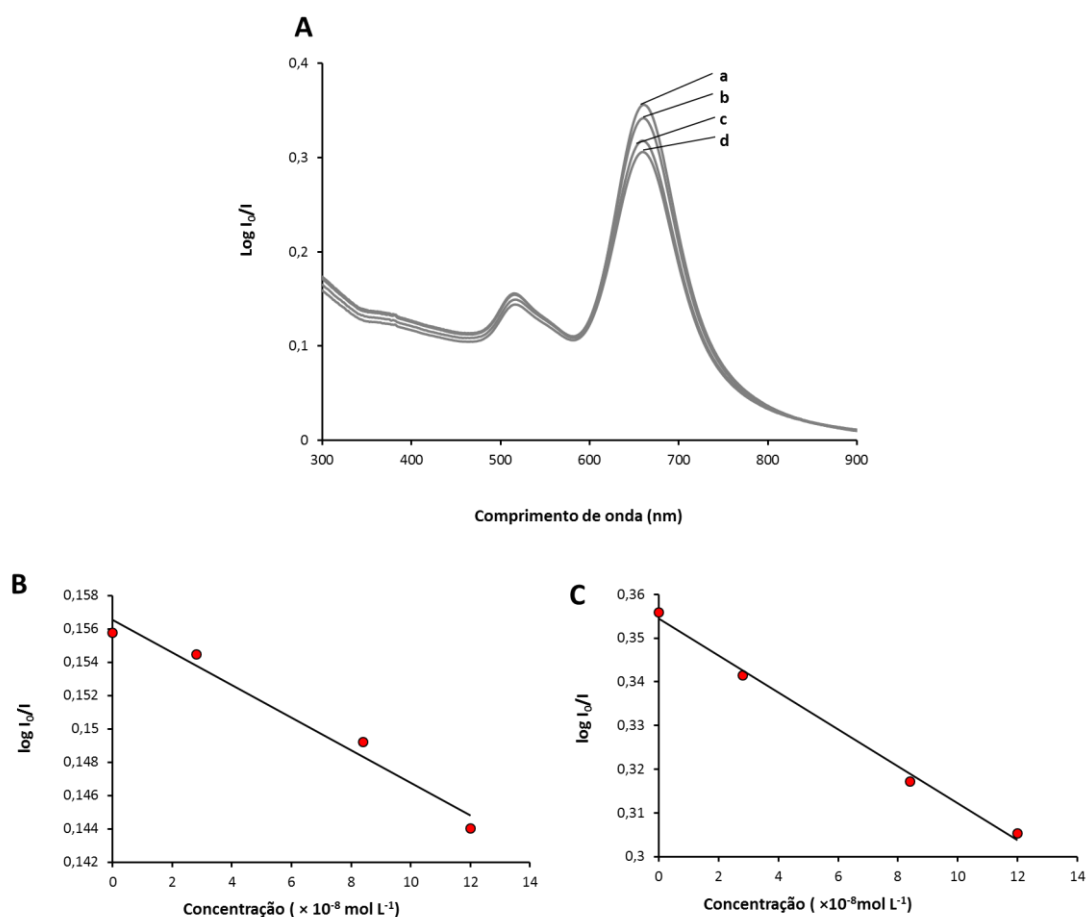


Figura 34: Resposta óptica da sonda de AuNPs-B na presença de concentrações crescentes de sulfato de gentamicina (a) 0,0; (b) 2,4; (c) 7,1; e (d) 11 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) (A); Monitoramento do sinal em 516 nm, (B); e monitoramento do sinal em 662 nm (C).

4.3.2. Estabilidade da resposta

Com relação à estabilidade da resposta óptica da sonda de AuNPs-B em função do tempo, um estudo foi realizado com a dispersão-branco e com uma dispersão de trabalho contendo sulfato de gentamicina na concentração final de $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. No caso, 13 dispersões-branco e o mesmo número de dispersões de trabalho (réplicas autênticas) foram preparadas. As dispersões foram agitadas levemente e deixadas em repouso por 5 min, quando os espectros das primeiras dispersões (uma do branco e uma de trabalho) foram adquiridos. Em seguida, a cada 10 min foi realizada a varredura de espectro de uma dispersão branco e uma de trabalho até o tempo de 120 min, quando se mediu o último par de dispersões. O resultado do estudo, em termos de sinais monitorados em 516 e em 662 nm, é mostrado Figura 35, onde se pode constatar que existe uma variação mínima de sinal.

Esses resultados mostraram uma boa estabilidade óptica da dispersão branca no período estudado, além de apresentar uma boa repetibilidade na preparação dessa dispersão (Figura 35A). O sinal medido em 662 nm foi de $0,3543 \pm 0,0007$ (CV de 0,20%) e em 526 nm foi de $0,1548 \pm 0,0003$ (CV de 0,20%). Desta forma, no período de 120 min, pode-se constatar que as AuNPs-B na dispersão-branco não se aglomeraram, o que produziria a diminuição gradativa das bandas de SPR. A estabilidade da resposta óptica também foi constatada na dispersão de trabalho em ambos os comprimentos de onda monitorados (Figura 35B). Isso significou que após a interação com a gentamicina, as AuNPs-B atingem um certo grau de aglomeração, que é reprodutível e não se modifica dentro do tempo monitorado. A presença de gentamicina nas dispersões de trabalho reduziu o sinal da banda de SPR longitudinal, medida em 516 nm, para $0,1527 \pm 0,0001$ (CV de 0,1%) e também a banda de SPR transversal, medida em 662 nm, que teve um valor de $0,3277 \pm 0,0007$ (CV de 0,22%).

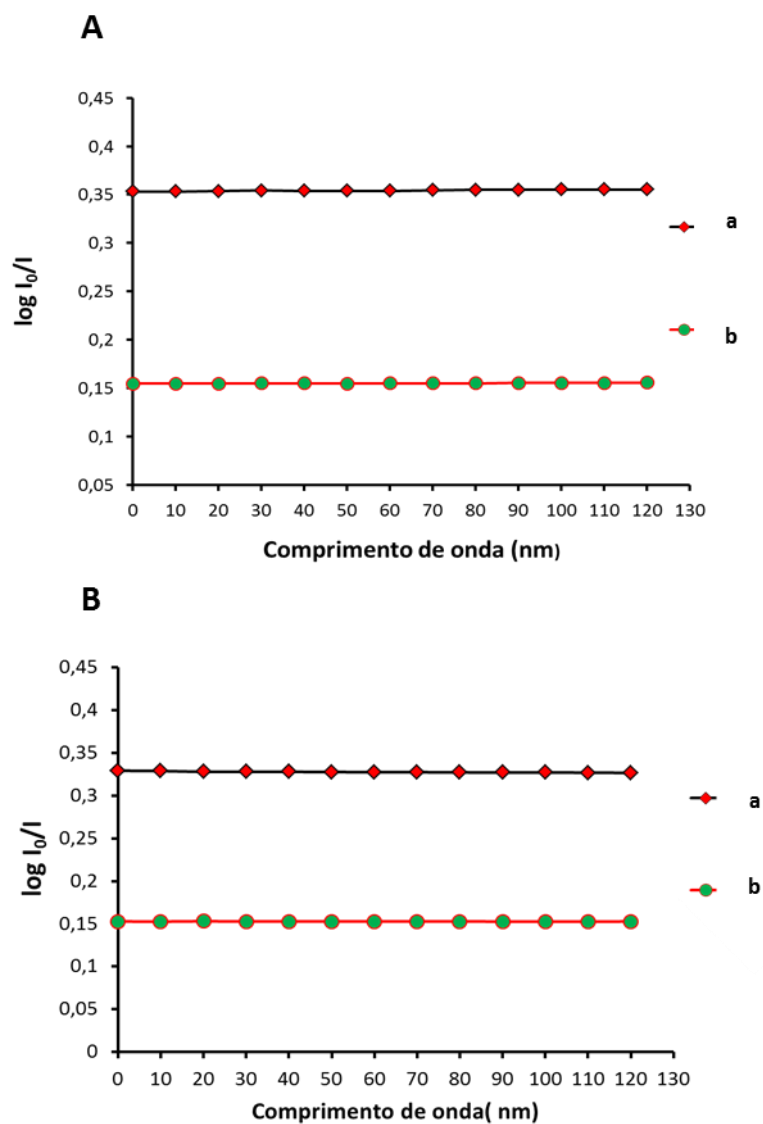


Figura 35: Estabilidade do sinal da resposta da dispersão-branco da sonda de AuNPs-B ($3,8 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo (A): em 516 nm (a) e 662 nm (b). (B) Estabilidade do sinal da sonda de AuNPs-B ($3,8 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de gentamicina, em função do tempo: Monitorando-se o sinal da resposta da sonda nos comprimentos de onda em 516 nm (a) e 662 nm (b).

4.3.3. Efeito da variação do pH da dispersão de AuNPs-B na resposta óptica da sonda

Tendo em vista a estabilidade da resposta óptica da dispersão (branco e de trabalho), durante o período de 120 minutos, procedeu-se a avaliação da

estabilidade de sinal da sonda em função da variação do valor de pH no meio. Como foi mencionado, o pH original da dispersão estoque é 5,2, mantendo-se no mesmo valor após diluição para preparação da dispersão-branco. Adições de sulfato de gentamicina (até a concentração final de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) não alteraram o valor do pH.

Para avaliar a robustez desse parâmetro em relação à resposta óptica, o estudo consistiu na avaliação da magnitude de sinal em dispersões preparadas na faixa de pH entre 3,9 e 6,5 (em triplicata), com variação de 0,5 unidades (ajustando-se o pH das dispersões por meio da incorporação de soluções de HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) ou NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Todas as medições foram realizadas dentro do tempo máximo de 120 min da preparação das mesmas. A partir do gráfico mostrado na Figura 36A, verifica-se que o sinal da dispersão-branco se mantém constante ao longo de toda a faixa de pH estudada com sinais monitorados em 516 e 662 nm, onde as variações (em termos de CV) foram respectivamente de 0,08 e 0,11%.

De igual forma foi avaliada a estabilidade da dispersão de trabalho na presença de $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de gentamicina em função da variação do pH entre 3,9 e 6,5 (Figura 36B). Constatou-se que a magnitude do efeito da interação entre a gentamicina e as AuNPs-B não foi afetada, com os sinais medidos similares, não importando a concentração hidrogeniônica do meio, como pode se verificar pelos valores de CV de 0,08% para o sinal medido em 516 nm e de 0,22% para o sinal medido em 662 nm.

Gentamicinas apresentam três aminas primárias e duas aminas secundárias em suas estruturas químicas, estes grupos estão, na maioria, protonados no intervalo de pH avaliado (3,9-6,5), de acordo com valores de pKa (DAGIL *et al.*, 2013) Tais grupos amino ligam-se mais fortemente a superfície de ouro, em comparação com o grupo amino quaternário do CTAB, uma vez que eles podem atuar como ligantes multidentados. Embora ainda haja CTAB nas dispersões de trabalho após a limpeza, a gentamicina é quem interage preferencialmente com a sonda, produzindo agregação e variação no sinal das AuNPs-B independentemente da variação de pH (3,9-6,5). Considerando que a variação de pH na faixa estudada não modificou a intensidade do sinal das AuNPs-B na ausência (dispersões-branco) e na presença de gentamicina (dispersões de trabalho), escolheu-se trabalhar com pH original da sonda para fins analíticos (5,2).

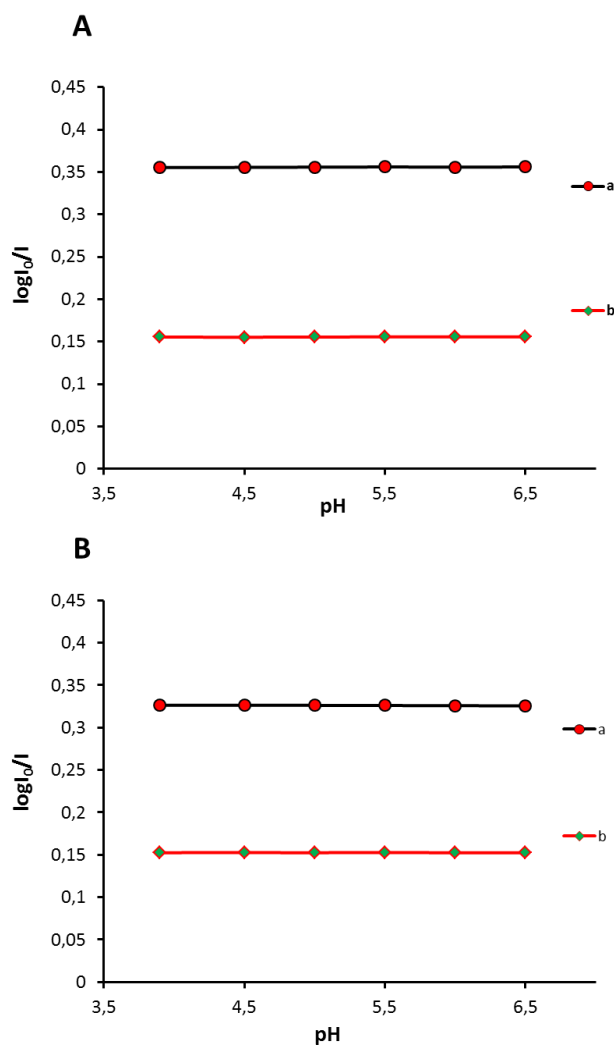


Figura 36: Estabilidade do sinal das dispersões-branco ($3,8 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) (A), e Estabilidade do sinal da sonda de AuNPs-B ($3,8 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de gentamicina (B). Ambas em diferentes valores de pH no meio (3,9; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,5). Monitorando-se o sinal da resposta da sonda nos comprimentos de onda em 662 nm (a) e 516 nm (b);

4.4.

Características das dispersões de AuNPs-B como sondas analíticas para gentamicina

Nesse ponto do trabalho decidiu-se não prosseguir com o monitoramento do sinal da na banda de SPR longitudinal (516 nm) por conta da sua menor sensibilidade frente à gentamicina, em relação à resposta da banda de SPR

transversal (monitorada em 662 nm), que seria a mais vantajosa para fins quantitativos.

As avaliações feitas até aqui mostraram que a gentamicina provoca mudança no perfil espectral das bandas de SPR das AuNPs-B, induzindo seu decréscimo na medida em que a concentração de sulfato de gentamicina aumenta na dispersão de trabalho (Figura 37). Vale salientar que nos espectros destas dispersões de trabalho na presença de gentamicina não foi observada a banda de agregação das nanopartículas, como no caso das AuNPs-E. Essa banda deveria aparecer na forma de uma barriga na faixa espectral acima de 700 nm. A partir das imagens obtidas por STEM (Figura 38) observou-se uma discreta aglomeração destas nanopartículas (assinaladas em vermelho) com um aspecto de montagem (empilhamento) um pouco mais destacado na dispersão contendo gentamicina ($7,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) como pode ser observado comparando a Figura 38B com a Figura 38A. De igual forma não se percebeu uma alteração de cor das dispersões de trabalho de AuNPs-B na presença de analito (como acontece nas dispersões de AuNPs-E).

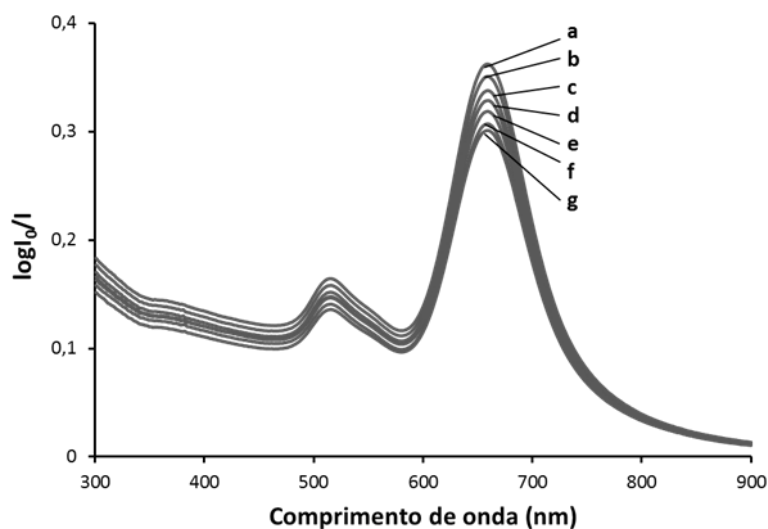


Figura 37: Perfil espectral das dispersões de trabalho de AuNPs-B na presença de concentrações crescentes de sulfato de gentamicina: (a) 0,0; (b) $6,8 \times 10^{-9}$; (c) $2,4 \times 10^{-8}$; (d) $3,4 \times 10^{-8}$; (e) $7,1 \times 10^{-8}$; (f) $9,4 \times 10^{-8}$; (g) $10 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

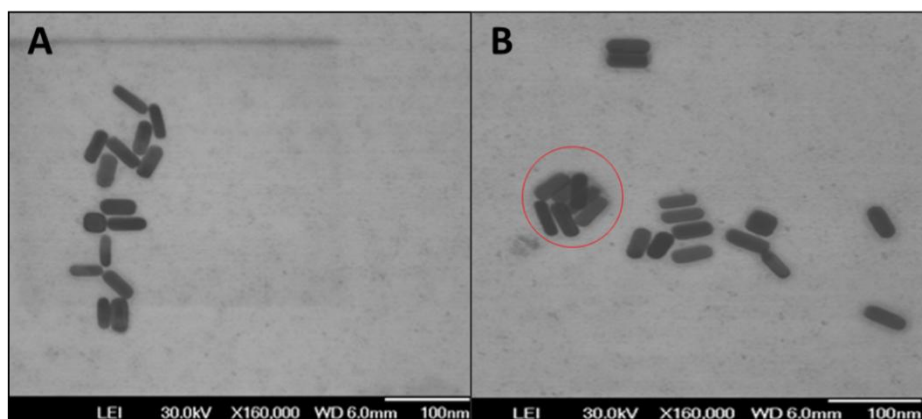


Figura 38: Imagens por STEM: (A) dispersão-branco de AuNPs-B na ausência de sulfato de gentamicina e (B) dispersão de trabalho de AuNPs-B na presença de sulfato de gentamicina ($7,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

De acordo com os dados da literatura (ZHU *et al.*, 2011), uma sonda constituída por nanobastões de ouro modificados com anticorpos de gentamicina interage com gentamicina, através do capeamento (antígeno). Tal interação promoveu o desagregamento das nanopartículas e causou o aumento da banda de SPR transversal (monitorado em 690 nm), o que permitiu a determinação de gentamicina. Este dado contrasta com os resultados obtidos com as AuNPs-B na presente dissertação, uma vez que na abordagem aqui proposta tem-se o monitoramento do sinal referente ao efeito causado pela gentamicina na ressonância plasmônica, o que provoca a diminuição do sinal espectral em 662 nm no caso da banda de SPR transversal. No caso, não foi necessário fazer a modificação da superfície das nanopartículas com anticorpos o que faz o método seja mais simples, porém perdendo-se uma dimensão de seletividade.

Para avaliar a faixa de resposta analítica, uma faixa de trabalho foi escolhida para monitoramento (em 662 nm). A linearidade da resposta analítica, em função da concentração de sulfato gentamicina, alcançada ficou entre $6,8 \times 10^{-9}$ e $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (cobrindo três ordens de magnitude, uma a mais do que a observada com as AuNPs-E) e o valor do coeficiente de determinação foi 0,9921. Na Figura 39A, é apresentada a curva analítica com equação igual a $y = -(3,37 \times \pm 0,02) \times 10^5 x + 3,52 \times 10^{-1} \pm 1,2 \times 10^{-3}$. O gráfico de resíduos, baseado na medição de três réplicas de cada concentração, é mostrado na Figura 39B, de onde se pode constatar

comportamento homocedástico e distribuição aleatória dos resíduos (garantindo que o modelo é linear e que a regressão linear simples é adequada para se obter os parâmetros da curva).

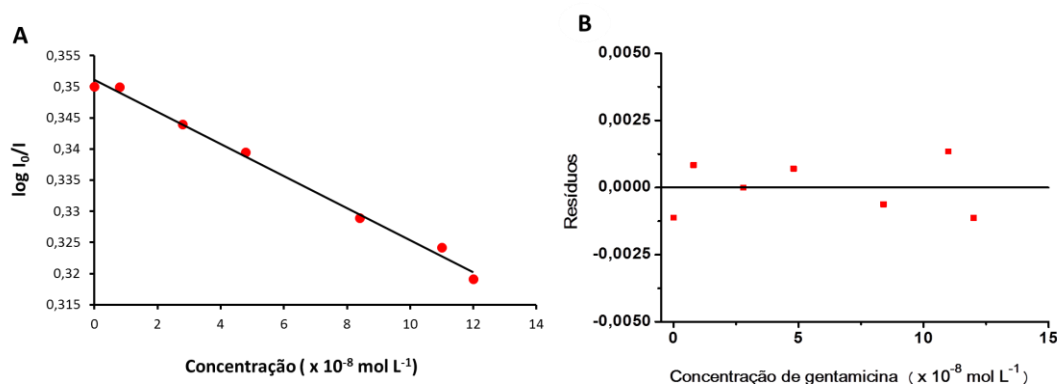


Figura 39: (A) curva analítica para concentrações de gentamicina na faixa de $6,8 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com monitoramento em 662 nm, e (B) gráfico de resíduos em 662 nm.

A partir do valor do desvio padrão calculado da medição de sinal, em 662 nm, de dez dispersões-branco ($0,3530 \pm 0,0002$) foram calculados os valores de LOD e LOQ, que foram os valores de concentração que produziram uma variação de decréscimo de sinal três (para LOD) e dez (para LOQ) vezes o desvio padrão da dispersão-branco. Os valores se encontram na Tabela 14.

Tabela 14: Limites de detecção e de quantificação para o sinal da sonda de AuNPs-B monitorado em 662 nm.

LOD (nmol L ⁻¹)	LOQ (nmol L ⁻¹)	ALOD (pg)*
5,3	9,5	75

*Valor calculado para 25 µL de solução.

A robustez do método já foi avaliada nos estudos de estabilidade da sonda em função do comportamento do sinal da dispersão-branco e da dispersão trabalho ($4,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de gentamicina) de AuNPs-B em função das variações de pH do meio (na faixa de 3,9 a 6,5) e em função do tempo de preparo das dispersões. Com base nos resultados obtidos nos estudos de estabilidade, tanto a dispersão branco

assim como a dispersão de trabalho mostram-se reprodutivas em toda a faixa de pH, apresentando um CV de 0,11% para a dispersão branco e de 0,16% para a dispersão de trabalho. O sinal medido se mostrou constante por 120 min após a preparação da dispersão de trabalho, porém estudos monitorando o sinal após 240 min de prepara mostraram também pouca variação de sinal (CV de 0,40%).

A precisão instrumental foi avaliada pelos valores de CV proveniente de dez medições sucessivas de dispersões de trabalho com dois níveis de concentração de sulfato de gentamicina ($2,4 \times 10^{-8}$ e $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) monitorado em 662 nm. Já a precisão intermediária foi obtida a partir dos valores de CV dos sinais medidos dois pares de cinco dispersões de trabalho, monitoradas no mesmo comprimento de onda 662 nm, tendo cada par de dispersões uma concentração diferente de analito ($2,4 \times 10^{-8}$ e $7,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). Os resultados são apresentados na Tabela 15, que indica variações percentuais inferiores a 2%, que assegura o sinal da sonda de AuNPs-B é adequada para fins analíticos.

Tabela 15: Precisão da sonda de AuNPs-B monitorada em 662 nm.

Precisão intermediária ($2,4 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)	Precisão intermediária ($7,1 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)	Precisão instrumental ($2,4 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)	Precisão instrumental ($7,1 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)
0,18 %	0,13 %	0,14 %	0,12 %

4.5.

Estudos da seletividade dos componentes das matrizes em relação das mostras reais

Como um dos objetivos deste trabalho foi a quantificação de sulfato de gentamicina em soluções injetáveis de uso veterinário, testes de seletividade da sonda de AuNPs-B foi realizado em relação à presença de substâncias que

tipicamente constituem as matrizes deste tipo de medicamento. Tais substâncias e seus valores típicos nas formulações foram indicados anteriormente na Tabela 7.

Da mesma forma que foi feito com a sonda de AuNPs-E, a seletividade da sonda de AuNPs-B foi estudada com respeito á modificação do perfil analítico das dispersões de trabalho contendo concentrações fixas de sulfato de gentamicina ($4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), quando na presença dos excipientes que podem constituir a matriz dos medicamentos. Desta maneira obteve-se a razão porcentual de $[\log (I_0/I)_{\text{analito}} / \log (I_0/I)_{\text{analito} + \text{excipiente}}] \times 100$, onde $\log (I_0/I)_{\text{analito}}$ é o valor do sinal medido da sonda na presença do analito e $\log (I_0/I)_{\text{analito} + \text{excipiente}}$ é o valor do sinal medido da sonda nas presenças do analito e do excipiente. As faixas de proporções molares analito:excipiente avaliadas variaram de acordo com o excipiente e foram aproximadamente de 1:0,01 a 1:1 na sonda, sendo a relação molar mais alta estudada para cada excipiente, muito elevada em relação as concentrações achadas nos medicamentos. Os resultados dos testes são exibidos na Tabela 16 onde são mostradas as variações percentuais de sinal no comprimento de onda 662 nm. Variações até 2% (um pouco mais elevada que a variação da precisão intermediária) foram consideradas adequadas, e indicaram que o excipiente, no nível testado, não impunha interferência.

De acordo aos resultados observados na Tabela 16, constatou-se que as presenças de excipientes orgânicos e inorgânicos, no geral, não promoveram uma variação de sinal maior do que 2% no comprimento de onda monitorado 662 nm. Ao igual que na sonda de AuNPs-E, a única exceção foi cloridrato de bromexina (gerou uma variação que oscilou de 7,5% (na proporção gentamicina:bromexina de 1:0,1) a 3,0% (proporção gentamicina:bromexina de 1:0,01) monitorando-se o sinal medido em 662 nm, o que demonstrou uma vez mais, que esta substância é um interferente do método. Provavelmente, esta interferência deve-se a presença dos dois grupamentos amino que constituem uma molécula de bromexina.

Cabe ressaltar que para a maioria dos excipientes, as proporções molares gentamicina:excipiente iguais a 1:1 ou mesmo 1:0,1 são muito acima da proporção esperada nos medicamentos, ou seja, a seletividade da sonda em relação á presença da maioria dos excipientes orgânicos e inorgânicos é elevada.

Tabela 7: Quantidades esperadas dos componentes (excipientes) por 1 mL de solução injetável de sulfato de gentamicina (por 100 mg do princípio ativo).

Substancia	Quantidade	Teor por 1 mL de solução (densidade de 1 g mL ⁻¹)
Ácido etilenodiamino tetra- acético EDTA	0,1 mg	0,01%
Metabissulfito de sódio	3,2 mg	0,32%
Acetato de sódio anidro	4,5 mg	0,45%
Ácido acético glacial	3 mg	0,30%
Metilparabeno	0,8 mg	0,08%
Propilparabeno	0,1 mg	0,01%
Cloridrato de bromexina	0,1 mg	0,01%
	Quantidades	
Ácido sulfúrico e ou / hidróxido de sódio	adicionadas para ajustar o pH da solução de analito (pH x) para pH 3,0 (H ₂ SO ₄) e pH 5.5 (NaOH). ^a	Não calculado

^aFaixa de pH indicada na instrução do medicamento injetável (medicamento A).

Tabela 16: Porcentagem de interferência $[\log (I_0/I)_{\text{analito}} / \log (I_0/I)_{\text{analito} + \text{excipiente}}] \times 100$ das substâncias químicas que faz parte das matrizes da patente de gentamicina monitorando-se a variação do sinal em 662 nm.

Excipientes monitorados	(%) Variação de Sinal						
	Proporção						
	1,0 : 0,001	1,0 : 0,005	1,0 : 0,01	1,0 : 0,05	1,0: 0,1	1,0: 0,5	1,0 : 1,0
EDTA	0,74	1,10	1,34				
Acetato de sódio anidro					0,42	0,48	0,62
Ácido acético glacial					0,97	1,24	1,26
Bromexina			3,0	4,1	7,5		
Metabissulfito de sódio					0,06	0,9	0,67
Metilparabeno			0,19	0,60	1,26		
Propilparabeno	0,19	0,60	1,26				

4.5.1. Ensaio de recuperação

Considerando que a bromexina também interfere no sinal analítica da sonda de AuNPs-B (ao igual que ocorria na sonda de AuNPs-E), utilizou-se as mesmas formulações farmacêuticas A (contendo 44 mg de sulfato de gentamicina por mL de solução e densidade entre 1,10 a 1,04 g mL⁻¹), e B (contendo 40 mg de gentamicina por mL de solução e densidade entre 1,10 a 1,04 g mL⁻¹), assim mesmo também foi usada a solução simulada, denominada de controle (C) (concentração ajustada em 38,5 mg de padrão de gentamicina por mL de solução). Da mesma maneira o estudo de recuperação foi feito em três replicas (para assegurar um intervalo de confiança para o resultado). Cabe ressaltar que as análises foram

realizados monitorando-se no comprimento de onda 662 nm com ajuste da quantidade de gentamicina adicionada na sonda da ordem teórica de $3,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (concentração na faixa central da curva analítica). Os resultados destes estudos (Tabela 17) apresentando percentagem de recuperação percentual da amostra controle (C) foi de $96,7 \pm 0,04$ para $n = 3$.

De igual forma, as recuperações obtidas para o medicamento A e para o medicamento B foram, respectivamente, $98,24 \pm 0,32$ e $98,12 \pm 0,65$ ($n = 3$), o que se encontram próximos dos valores nominais das bulas.

Para efeito de comparação, os medicamentos também foram analisados usando o método colorimétrico com derivatização do sulfato de gentamicina com ninidrina reagente. Deste modo, a concentração esperada (ajustada) de sulfato de gentamicina nas soluções a serem analisadas foi $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Essas análises foram também realizadas em três réplicas e os resultados, mostrados na Tabela 18, corroboram os resultados obtidos com o método proposto com uso de sonda de AuNPs-B.

Tabela 17: Recuperação das amostras controle e das amostras reais de soluções injetável de gentamicina utilizando a sonda de AuNPs-B monitorado em 662 nm.

Amostra	Concentração prevista ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Teor encontrado (mg mL^{-1})	Teor referenciado pelo fabricante (mg mL^{-1})
C	19	18,0	$94,5 \pm 0,5$	36,4	38,5
A	19	18,7	$98,2 \pm 0,3$	43,2	44,0
B	19	18,6	$98,1 \pm 0,7$	39,3	40,0

Tabela 18: Recuperações das amostras controles **C**, das amostras reais (soluções injetável **A** e **B** sulfato de gentamicina) utilizando o método colorimétrico.

Amostra	Concentração prevista ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Teor encontrado (mg mL^{-1})	Teor referenciado pelo fabricante (mg mL^{-1})
C	75	72,4	$96,5 \pm 1,2$	37,2	38,5
A	75	73,8	$98,4 \pm 6,8$	43,3	44,0
B	75	71,0	$94,4 \pm 1,2$	37,7	40,0

Foi feita uma avaliação estatística do tipo teste de Fisher-Snedocor (Teste F) para comparar se as variâncias dos resultados obtidos eram similares. Os resultados são mostrados na Tabela 19. Outra avaliação do tipo teste-t de Student bicaudal também foi realizada objetivando comparar as médias dos resultados recuperados nos dois métodos. Os resultados mostrados na Tabela 19 indicam que nos três casos (medicamentos e amostra controle) os mesmos foram iguais considerando o intervalo de confiança de 95% (g.l. = 2).

O resultado do teste t calculado a partir dos valores alcançados no comprimento de onda 662 nm foram 0,41; 0,55; 2,2; para os percentuais de recuperação das amostras A, das amostras B e das amostras controle C, respectivamente.

Tabela 19: Resultado do teste-F e do teste t-Student aplicados aos valores alcançados nos determinação de gentamicina utilizando o método da literatura (colorimétrico) e o método da sonda de AuNPs-B.

Método De Referencia	Teste F^a	AuNPs-B (662 nm)
		A
	B	4,0
	C	5,5
	Teste t-Student^b	
	A	0,41
	B	0,55
	C	2,2

a F -Crítico = 39

b t -Crítico = 4,303

5 Conclusões

O ajuste da síntese das AuNPs-E em relação ao tempo de aquecimento demonstrou que com 25 min (a 101 °C), a banda espectral SPR da dispersão de AuNPs-E apresentou um perfil intenso e afinado com máximo em 526 nm. A interação das AuNPs-E na dispersão aquosa (concentração estimada em $4,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) com gentamicina produziu uma mudança no perfil espectral (SPR) da sonda de AuNPs-E (com mudança na cor das dispersões de trabalho). Consequentemente ocorreu o decaimento do sinal no comprimento de onda 526 nm e um aparecimento de uma nova banda de acoplamento de plasmon (na faixa de 700 nm) decorrente da aglomeração das nanopartículas. A resposta óptica na presença de gentamicina foi robusta na faixa de pH compreendida entre 2,5 e 5,5, sendo estável pelo menos por durante 120 min. A avaliação da interação entre AuNPs-E e gentamicina em presença de surfactantes (CTAB, SDS, Tween-20), demonstrou que o surfactante não iônico Tween-20 (na concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) promoveu um leve incremento no perfil da banda de aglomeração quando comparado com o resultado de interação entre AuNPs-E e gentamicina em meio sem surfactante. A presença de CTAB diminuiu a interação entre a sonda e o AMG.

A quantificação da gentamicina utilizando a sonda AuNPs-E foi realizada monitorando-se o decréscimo e o aumento do sinal respectivamente nos comprimentos de onda de 526 e 681 nm. As equações das curvas analíticas monitoradas em tais comprimentos de onda foram $Y = -8,43 \times 10^5 X + 1,5 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0,989$) em 526 nm e $Y = 1,94 \times 10^6 X + 3,62 \times 10^{-1}$ ($R^2 = 0,995$) em 681 nm. A resposta monitorada em 681 nm foi duas vezes mais sensível e o LOD obtido foi da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹.

O ajuste da síntese de AuNPs-B indicou que em 30°C se obteve um melhor controle na temperatura de aquecimento, perfil espectral da banda SPR dos nanobastões mais intenso para a banda de SPR transversal, mais fino, e mais

deslocado para o azul para a banda de SPR longitudinal. Demonstrou-se que o excesso de CTAB na dispersão estoque de AuNPs-B impedia a interação da gentamicina com as partículas AuNPs-B. Estabeleceu-se que o método desenvolvido na determinação de gentamicina com AuNPs-B, foi robusto na faixa de pH entre 3,9 e 6,5. A interação das AuNPs-B na presença de gentamicina produziu uma variação no perfil espectral da sonda, com decaimento do sinal tanto na banda SPR transversal quanto na banda SPR longitudinal, como consequência da ação da gentamicina na ressonância plasmônica e não devido a aglomeração das nanopartículas, já que nenhuma banda de aglomeração foi observada. Do ponto de vista analítico, a interação da gentamicina com a sonda de AuNPs-B é melhor visualizada na banda SPR longitudinal (662 nm), que é onde se percebe um maior decréscimo do sinal. Desta forma a resposta analítica medida em 662 nm foi quatro vezes mais efetiva do que a observada para o comprimento de onda de 526 nm. Desta maneira, para fins de quantificação do analito se monitorou o sinal da sonda em 662 nm, assim se obteve equação da curva igual a $Y = -3,37 \times 10^5 X + 3,52 \times 10^{-1}$ ($R^2 = 0,9921$).

Ao se comparar os métodos analíticos na determinação indireta de sulfato de gentamicina demonstrou-se que a sonda analítica de AuNPs-E é duas vezes mais sensível que a sonda de AuNPs-B. Ademais, no preparo das dispersões de trabalho de AuNPs-B é requerido mais tempo que o necessário na preparação de dispersões de trabalho de AuNPs-E, o que torna mais conveniente trabalhar com as AuNPs-E.

Os métodos demonstraram uma boa precisão e seletividade em relação aos excipientes presentes nas amostras de formulações farmacêuticas analisadas. Fazendo-se uso de um método comparativo para estudar os resultados dos percentuais de recuperação, comprovou-se, por meio de testes estatísticos, que os percentuais de recuperação encontrados com as sondas de AuNPs e AuNPs-B foram similares ao do método comparativo.

A determinação de gentamicina por meio das sondas analíticas de AuNPs-E e AuNPs-B se mostraram simples e rápidos, além de serem de baixo custo, em relação aos métodos relatados na literatura que apresentam procedimentos complexos de derivatização química ou de uso de complexa instrumentação. Em

contrapartida, os métodos desenvolvidos não determinam as diferentes gentamicinas separadamente e provavelmente sofreriam interferência de outros AMG, caso estes estivessem na amostra. Em relação aos métodos reportados na literatura que empregam reagentes tóxicos para derivatização química, o método proposto não gera resíduos muito tóxicos e difíceis de tratar, o que está de acordo com os princípios da química verde.

Não foi necessária a modificação da superfície das AuNPs para se obter a interação de gentamicina na sondas, como por exemplo se reporta no método reportado na literatura por Zhu *et al.* (2011), que faz o uso de AuNPs-B capeadas com anticorpos. O contraponto da simplicidade de se obter a sonda proposta nesse trabalho é a sua menor seletividade. Adicionalmente, a sonda de AuNPs proposta emprega baixas concentrações de nanopartículas quando se compara com outros trabalhos reportados, como o de Wang *et al.* (2013), que utiliza quantidades ordens de grandeza maiores para fazer o análises quantitativas.

6 Trabalhos futuros

Uno de dos trabalhos futuros a realiza-se são:

- Determinar e quantificar Sulfato de gentamicina em amostras de leite, utilizando ambas nanopartículas AuNPs-E e AuNPs-B.
- Avaliar a interação das AuNPs-E-Gentamicina em presença de outros tipos de surfactantes.

7

Referências bibliográficas

ADAMS, E. et al. Analysis of gentamicin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 18, p. 689–698, 1998.

AL-MAJED, A. A. et al. Fluorimetric Determination of Gentamicin in Dosage Forms and Biological Fluids Through Derivatization with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole (NBD-Cl). **Microchim acta**, v. 141, n. 1-2, p. 1–6, jan. 2003.

ALMEIDA, F. H. S. et al. Miastenia gravis Análise de 90 casos tratados com timentomia com timentomia myasthenia gravis. **Acta Cir. Bras**, v. 15, p. 53–56, 2000.

APYARI, V. V. et al. Label-free gold nanoparticles for the determination of neomycin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 416–420, 2013.

ARCELLONI, C. et al. Quantification of gentamicin in Mueller – Hinton agar by high- performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 753, p. 151–156, 2001.

AUCÉLIO, R. Q. et al. Determination of lapachol in the presence of other naphthoquinones using 3MPA-CdTe quantum dots fluorescent probe. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 100, p. 155–160, 2013.

BAIETTO, L. et al. Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin , amikacin , gentamicin , and rifampicin in human plasma. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 791–798, 2010.

BIJLEVELD, Y. et al. A simple quantitative method analysing amikacin , gentamicin , and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography / tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study. **Journal of Chromatography B**, v. 951-952, p. 110–118, 2014.

CAGLAYAN, M. G.; ONUR, F. A metal-enhanced fluorescence study of primary amines: determination of aminoglycosides with europium and gold nanoparticles. **Anal. Methods**, v. 7, n. 4, p. 1407–1414, 2015.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese , caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis.** [s.l.] Universidade de São carlos, 2010.

CAUDRON, E. et al. Simultaneous Quantification of Gentamicin and Colistin Sulfate in Pharmaceuticals using Ion-Pairing and Polarity Gradient

Chromatography with Low-UV Detection. **Chromatographia**, v. 76, p. 747–755, 2013.

CHERLET, M.; BAERE, S. DE; BACKER, P. DE. Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 35, p. 1342–1350, 2000.

CURIEL, H. et al. Analysis of underivatized gentamicin by capillary electrophoresis with UV detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, p. 49–56, 2007.

DAGIL, R. et al. Gentamicin binds to the megalin receptor as a competitive inhibitor using the common ligand binding motif of complement type repeats insight from the nmr structure of the wth complement type repeat domain alone and in complex with gentamicin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4424–4435, 2013.

DERBYSHIRE, N. et al. Toggled RNA aptamers against aminoglycosides allowing facile detection of antibiotics using gold nanoparticle assays. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6595–602, 2012.

EL-DIDAMONY, A. et al. Indirect spectrophotometric determination of gentamicin and vancomycin antibiotics based on their oxidation by potassium permanganate. **Central European Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 708–722, 2006.

ES, R. M. VAN et al. Detection of gentamicin in milk by immunoassay and flow injection analysis with electrochemical measurement. **Analytica Chimica Acta**, v. 429, p. 37–47, 2001.

FERNANDEZ-RAMOS, J. et al. Determination of gentamicin in pharmaceutical formulations using peroxyoxalate chemiluminescent detection in flow-injection analysis. **Talanta**, v. 69, n. 3, p. 763–768, 2006.

FLUER, C. L. The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary electrophoresis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 13, p. 809–816, 1995.

FLURER, C. L.; WOLNIK, K. A. Quantitation of gentamicin sulfate in injectable solutions by capillary electrophoresis. **Journal of chromatography. A**, v. 663, n. 2, p. 259–63, mar. 1994.

FRUTOS, P. et al. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 21, p. 1149–1159, 2000a.

FRUTOS, P. et al. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 6, p. 1149–1159, 2000b.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman: Manual de Farmacologia e terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2010.

GUBERNATOR, J.; DRULIS-KAWA, Z.; KOZUBEK, A. A simply and sensitive fluorometric method for determination of gentamicin in liposomal suspensions. **International journal of pharmaceuticals**, v. 327, n. 1-2, p.

104–9, 2006.

HELLER, D. N. et al. LC / MS / MS measurement of gentamicin in bovine plasma , urine , milk , and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. v. 821, p. 22–30, 2005.

HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles : Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH**, v. 1, p. 13–28, 2010.

ISOHERRANEN, N.; SOBACK, S. Determination of Gentamicins C 1 , C 1a , and C 2 in Plasma and Urine by HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 837–842, 2000.

JAIN, P. K.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYD, M. A. Au nanoparticles target cancer. **nanotoday**, v. 2, n. 1, p. 18–29, 2007.

JR, INGLE, J. D.; CROUCH, S. R. **Spectrochemical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1988.

KAALE, E. et al. Capillary Electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1 , 2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 895, p. 67–79, 2000.

KHALDEEVA, E. V et al. Determination of Gentamicin with an Amperometric Enzyme Immunosensor. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 1284–1289, 2002.

KÜHN, K. et al. Evaluation of the stability of gentamicin in different antibiotic carriers using a validated MEKC method. **Journal of phar**, v. 48, p. 612–618, 2008.

LEHOTAY, S. J. et al. Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1313, p. 103–12, 2013.

LIMA, J. L. X. et al. Improved quantum dots fluorescence quenching using organized medium: A study of the effect of naphthoquinones aiming the analysis of plant extracts. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 775–782, 2013.

LIU, X. et al. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 58, n. 1, p. 3–7, jul. 2007.

LOFFLER, D.; TERNES, T. A. A nalytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography – electrospray-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1000, p. 583–588, 2003.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. **Chemical Review**, v. 105, p. 477–497, 2005.

MARTINS, T. et al. Persistence of gentamicin residues in cow milk after intramammary treatment. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 165, p. 62–

67, 2014.

MASSACHUSETTS, W. et al. Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*. **Journal of medicinal chemistry**, v. 1, n. 3, p. 463–464, 1963.

MUNOZ, M. G. F. **Nanopartículas de Au y Pd: Síntesis , funcionalización y aplicaciones catalíticas**. [s.l.] Unversitat de barcelona, 2013.

NIKOOBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 10, p. 1957–1962, 2003.

NIRMALA GRACE, A.; PANDIAN, K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles—A brief study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 297, n. 1-3, p. 63–70, 2007.

OLIVEIRA, F. P.; CIPULLO, P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal cardiovascular surgery**, v. 21, n. 4, p. 444–452, 2006.

OMAR, M. A et al. Highly sensitive spectrofluorimetric method for determination of certain aminoglycosides in pharmaceutical formulations and human plasma. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 828–37, 2013.

OTUBO, L. **Técnicas de caracterização de nanopartículas metálicas funcionalizadas**. [s.l.] UNICAMP, 1999.

PANDOLI, O.; FONTANA, J. Síntese nanopartículas de ouro em forma de bastão AuNPs-B. **Dados não publicados**, [s.d.].

PARK, K. et al. Growth Mechanism of Gold Nanorods. **Chemistry Materials**, v. 25, p. 555–563, 2013.

RADHAKUMARY, C.; SREENIVASAN, K. Gentamicin induced formation of gold nanoparticles as an assay protocol for its detection. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 443, p. 326–330, 2014.

RENAME. **Formulário Terapêutico Nacional 2010**. Brasília: [s.n.].

RIZK, M.; ZAKHARI, A.; CARREIRA, A. using lanthanide probe ion spectroscopy. **Talanta**, v. 42, p. 1849–1856, 1995.

ROCHA, TÚLIO COSTA RIZUTI. **Nanopartículas metálicas anisotrópicas: Mecanismos de formação e aplicações ópticas**. [s.l.] UNICAMP, 2008.

RYAN, J. A. Colorimetric determination of gentamicin, kanamycin, tobramycin, and amikacin aminoglycosides with 2,4-dinitrofluorobenzene. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 9, p. 1301–1302, 1984.

SANTOS, H. S. **Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas de ouro e o desenvolvimento de sonda para a determinação espectrofotométrica ultra traço de tobramicina**. [s.l.] Pontifícia Católica do Rio de Janeiro, 2014.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Development of a multicommutated flow system with chemiluminometric detection for quantification of gentamicin in pharmaceuticals. **Journal of automated methods & management in chemistry**, v. 2010, p. 913207, jan. 2010.

SAR, F.; LEROY, P.; NLCOLAS, A. Development and optimization of a liquid chromatographic method for the determination of gentamicin in calf tissues. **Analytica Chimica Acta**, v. 275, p. 285–293, 1993.

SIKARRA, D. et al. TECHNIQUES FOR SOLUBILITY ENHANCEMENT OF POORLY SOLUBLE DRUGS: AN OVERVIEW. **Journal of Medical Pharmaceutical and Allied Sciences**, v. 1, p. 1–22, 2012.

STEAD, D. A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 747, n. 1-2, p. 69–93, set. 2000.

STYPULKOWSKA, K. et al. Determination of Gentamicin Sulphate Composition and Related Substances in Pharmaceutical Preparations by LC with Charged Aerosol Detection. **Chromatographia**, v. 72, n. 11-12, p. 1225–1229, 2010.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. c, p. 55–75, 1951.

TURNIPSEED, S. B. et al. Analysis of aminoglycoside residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry after derivatization with phenyl isocyanate. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 14-15, p. 1487–93, 2009.

VUCICEVIC-PRCETIC, K.; CSERVENAK, R.; RADULOVIC, N. Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of gentamicin, lincomycin, and spectinomycin in the presence of their impurities in pharmaceutical formulations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, p. 736–742, 2011.

WANG, M.-T. et al. Silver-coated gold nanoparticles as concentrating probes and matrices for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of aminoglycosides. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 10, p. 1925–32, 2009.

WANG, R. et al. Determination of Aminoglycoside Antibiotics By a Colorimetric Method Based on the Aggregation of Gold Nanoparticles. **Nano: Brief Reports and Reviews**, v. 08, n. 04, p. 1350037, 2013.

ZAMARION, VITOR DE MORAES. **Estudos e Aplicações de Ressonância Plasmônica Superficial em Nanosondas SERS Estudos e Aplicações de Ressonância Plasmônica Superficial em Nanosondas SERS**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

ZARBIN, A. J. G. QUÍMICA DE (NANO)MATERIAIS. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.

ZEMBOWER, T. R. et al. The utility of aminoglycosides in an era of

emerging drug resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 10, n. 2, p. 95–105, maio 1998.

ZHU, Y. et al. Simple, rapid and sensitive detection of antibiotics based on the side-by-side assembly of gold nanorod probes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 11, p. 4387–4392, 2011.