



Hellen Silva Santos

**Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas
de ouro e o desenvolvimento de sonda para a
determinação espectrofotométrica ultra traço de
tobramicina**

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: Profa. Andrea Rosane da Silva

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2014



Hellen Silva Santos

**Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas
de ouro e o desenvolvimento de sonda para a
determinação espectrofotométrica ultra traço de
tobramicina**

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

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio
Orientador
PUC-Rio

Profa. Andrea Rosane da Silva
Co-Orientadora
CEFET-RJ

Profa. Maria das Graças Andrade Korn
UFBA

Prof. Fábio Grandis Lepri
UFF

Prof. Dunieskys Roberto González Larrudé
PUC-Rio

Prof. Wagner Felipe Pacheco
UFF

Jose Eugênio Leal
Coordenador(a) Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2014

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

Hellen Silva Santos

Possui graduação em bacharel em química, formada pela Universidade Federal da Bahia (2011). Também possui a formação pelo curso técnico em análises químicas pelo Instituto Federal da Bahia (2008). Trabalhou inicialmente na indústria alimentícia (J.Macêdo, 2006-2008), posteriormente, ingressou na iniciação científica (Protec, Engenharia Química, UFBA, 2009-2011) atuando em linhas de pesquisas relacionadas à seleção, purificação, modificação e caracterização de argilas bentoníticas para a obtenção de nanocompósitos poliméricos.

Ficha Catalográfica

Santos, Hellen Silva

Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas de ouro e o desenvolvimento de sonda para a determinação espectrofotométrica ultra traço de tobramicina / Hellen Silva Santos; orientadores: Ricardo Queiroz Aucélio, Andrea Rosane da Silva. – 2014.

219 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2014.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Aminoglicosídeos. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Tobramicina. 5. Estreptomycina. 6. Ressonância de plasmon. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Silva, Andrea Rosane da. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Aos meus pais e à minha irmã, Helma Santos.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a Deus, por todo o seu amor e cuidado para comigo durante toda a minha vida.

Ao Prof^o Dr^o Ricardo pela oportunidade, por toda a credibilidade conferida a mim para o desenvolvimento dos trabalhos ao longo desses dois anos, e pelo apoio nesta jornada.

À Prof^a Dr^a Andrea pelo imenso apoio em toda a pesquisa, por toda a paciência e compreensão e pelo amplo crescimento que esses anos de trabalho ao seu lado me proporcionou nos âmbitos pessoal e profissional.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa.

À FAPERJ pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa da aluna de iniciação científica Gabriela França.

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

Aos meus pais, pois são o suporte da minha vida. Por todas as orações, a preocupação, o cuidado, o amor... Por comemorarem comigo cada vitória, por serem sempre participantes e colaboradores das minhas escolhas e por todo o sacrifício feito ao longo desses anos em prol da finalização de mais uma etapa da minha vida acadêmica. Agradeço também pela herança dos atributos de cada um que me constituem como pessoa: todo o interesse pela vida acadêmica, o perfil de trabalho, a honestidade, a perseverança e a solidariedade são características que advêm dos meus professores de vida, os mentores da minha formação.

À minha irmã, Helma. A melhor amiga e irmã que alguém poderia ter. Continuamente presente em toda a minha trajetória profissional e pessoal, sou imensamente grata por sonhar os meus sonhos junto comigo, por sempre acreditar e incentivar os meus projetos, e principalmente por todo o sacrifício ao longo

desses dois anos. Muito Obrigada por tanto empenho em me ajudar! A defesa dessa dissertação de mestrado é fruto dessa parceria de companheirismo e amizade que extrapolam os laços fraternais.

Aos meus “pupilos”, Gabriela e Gustavo, pelo apoio na realização da pesquisa e a seriedade com a qual trataram o projeto e o carinho recíproco estabelecido durante o período de trabalho juntos, estendendo a relação de amizade mesmo após o término de suas atividades. Em especial, meus agradecimentos à Gabriela por todo o seu empenho, o esforço e a importância confiada ao projeto de pesquisa.

Ao Prof^o Dr^o Dunieskys e ao Prof^o Eric pela confiança conferida a nós, o apoio nas análises morfológicas das nanopartículas e pelos conhecimentos compartilhados que me permitiram uma melhor realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Alessandra por sua disponibilidade e apoio nas análises cromatográficas que permitiram a resolução do grande impasse com o método comparativo.

Aos fundamentais incentivadores para a realização deste mestrado: Gal, Sr. Zanini, Reinaldo (in memoriam) e Rodrigo. O apoio irrestrito de todos me permitiu chegar até aqui, embora os entraves desta vida tenham culminado em grandes modificações no projeto do mestrado, sou muito grata por toda a confiança que viabilizou as perspectivas obtidas ao longo desses dois anos.

Aos meus grandes amigos e colegas, Catalina e Jaime, que me apoiaram incondicionalmente, estando sempre presentes com imenso companheirismo e cumplicidade que caracterizam essa relação de fraternidade. Meus agradecimentos especiais pela companhia de Catalina nas madrugadas de trabalho e de ajuda mútua. A ambos, meus sinceros agradecimentos às entrelinhas desta amizade, vista nos mínimos detalhes que vão do apoio psicológico às garrafas de café para apoio do turno da madrugada no laboratório.

À Vanessa, vulgo “nova gestão”, pela amizade estabelecida ao longo desses anos de trabalho juntas. Meus agradecimentos por qualificar o laboratório com sua

presença: seu infinito humor deixa os dias de trabalho extremamente mais agradáveis! Muito obrigada por toda a preocupação e por me inserir como membro da família, me presenteando com meus dindos maravilhosos, primos, tios, avós e Mingau. Muito obrigada a toda esta minha nova família que me prestou imenso apoio durante esses anos no Rio de Janeiro.

À toda família do LEEA, por me receberem de braços abertos, sempre prestativos e atenciosos. Meus agradecimentos em especial: à Leila, por todo o aprendizado profissional e pela representação da figura materna do laboratório, exigindo ordem sempre que necessário, garantindo a fluidez das atividades; ao Paulo pela grande disponibilidade em ajudar com todos os materiais necessários e com o apoio técnico, sempre com grande alegria e satisfação em fazê-lo, sem jamais deixar se ausentar seu espírito de humanidade; ao Luís pelo grande sorriso com o qual me recepcionava em todas as manhãs, sempre muito prestativo, e sem nunca medir esforços para ajudar no menor espaço de tempo possível; à Anastácia pelo grande grau de profissionalismo dentro do laboratório e pela amizade incontestável; à Doylzinha, por toda a compreensão e ajuda prestada ao longo desses anos de trabalho; à Soninha pelo apoio administrativo e empenho em resolver todos os assuntos pertinentes ao trabalho; ao Júnior por sua amizade e companhia nas jornadas de trabalho.

Ao colega e amigo Rafael, por todo o apoio e pela relação de ajuda recíproca.

Ao departamento de pós-graduação em química da PUC-Rio, pelo apoio de pesquisa. Em especial, aos professores cujos ensinamentos me proporcionaram grande crescimento acadêmico e à Fátima por sua sempre disponibilidade, pessoal e profissional, no decorrer deste trabalho.

Ao meu Mingau, que passou muitas noites em claro comigo no processo de escrita desta dissertação, prestando muita atenção às minhas verbalizações do texto manifestando seu grau de concordância “miau!”.

Ao meu irmão, Helisson, e sua família, Fabiana e Lucas, por toda a compreensão e apoio, principalmente quanto ao déficit da minha atenção durante a sua estadia

no Rio, permitindo que eu focasse no término do texto da dissertação. Agradeço o incentivo em todas as etapas da minha vida, e pelas comemorações a cada conquista.

À minha família, por todo o apoio e carinho. Em especial, à minha avó Joana (in memoriam), às minhas tias Eline, Élia e Elza, aos meus tios Zé e Élio, meus sobrinhos Rhuan e Estela, meus primos Mardel, Luiza, Thiago, César e Paula, meus afilhados Bruna e Hudson, meus irmãos de coração Tchellos, Lí e Eduardo e à família Itaparica; cujo amor me faz carregar uma imensa alegria no olhar.

Ao meu benzinho, por todo amor, atenção, carinho e apoio nestes dois anos. Tal relação de cumplicidade me permitiu evoluir enquanto pessoa, sendo vital no processo de construção dessa dissertação. Porque um amor assim, tão singular, me fez entender que a felicidade carrega uma relação proporcional ao empenho de alcançá-la.

Aos meus amigos de longas datas por todo o apoio psicológico. Um destaque especial: à Nanda e Nathan, pelos ouvidos sempre disponíveis além do apoio nos âmbitos pessoal e acadêmico, sendo um grande suporte para perseverança nestes dois anos; à Juh, minha amiga-irmã, por toda a preocupação, atenção e apoio durante a realização desse mestrado; à Chaveirinho, vulgo Fabrício, pela amizade incondicional e pelo apoio tão amplo que implicou em sua mudança para o Rio de Janeiro; à Sá e Alex pelo grande amor que nos liga e que me manteve firme ao longo desses anos; à Paulete, vulgo Paulo, que passou uma noite inteira escutando repetições sequenciais da minha apresentação do ENQA; ao meu irmão Thiago pelo compartilhamento das conquistas durante esses anos; à Malu e toda a sua família pelo carinho e apoio.

À tia Jane, pelas orações e a toda a sua família por todo carinho.

À Mel e Sr. Antônio, pela amizade e disponibilidade em me apoiar durante as longas jornadas de trabalho.

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

Resumo

Santos, Hellen Silva; Aucélio, Ricardo Queiroz; Silva, Andrea Rosane da. **Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas de ouro e o desenvolvimento de sonda para a determinação espectrofotométrica ultra traço de tobramicina**. Rio de Janeiro, 2014. 219p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os aminoglicosídeos (AMG) pertencem a uma classe de antibióticos eficazes no tratamento de infecções provocadas por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos. Ototoxicidade, nefrotoxicidade e alterações musculares são efeitos colaterais provocados pelo uso dessas substâncias, implicando na importância do controle das medicações com uso de métodos analíticos práticos para a rotina, sensíveis e seletivos. As estruturas dos AMG não possuem grupos cromóforos que habilitem a medição de atividade óptica direta, dessa maneira, os métodos descritos na literatura para determinação dos mesmos, normalmente, fazem uso da derivatização química implicando em alta morosidade, elevados custos e toxicidade (dados os reagentes utilizados) em tais métodos. No presente trabalho, propõe-se a utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) como sondas analíticas para a determinação espectrofotométrica de AMG, tirando-se proveito do efeito de ressonância plasmônica na superfície de AuNPs. Investigou-se o potencial analítico do uso de dispersões aquosas de AuNPs como sondas para a determinação de tobramicina (TBR), neomina (NEO), gentamicina (GENTA), canamicina (CANA), estreptomicina (EST) e amicacina (AMIC), observando-se resultados promissores para todos os AMG citados, excerto para a EST. No caso da TBR, foi desenvolvido um método analítico para a sua determinação em soluções oftálmicas. As curvas analíticas foram construídas a partir do monitoramento da luz transmitida em 529 nm ou 681 nm. O monitoramento do sinal analítico em 529 nm apresentou uma faixa linear entre $6,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ a $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com boa linearidade ($R^2=0,9943$) e limite de detecção (LD) igual a $6,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. O monitoramento do sinal analítico em 681 nm apresentou uma faixa linear entre $4,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ a $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com boa linearidade ($R^2=0,9949$) e valor de LD igual a $3,8 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. O método mostrou-se robusto em uma faixa de pH entre 2,6 e 4,5, durante 120 min. O

método apresentou precisão satisfatória e demonstrou seletividade com relação a outro AMG, STP, e com relação aos excipientes presentes nas amostras analisadas. Obtiveram-se percentuais de recuperação para as amostras (simuladas e reais de soluções oftálmicas) de 104,0 a 123,1% e de 101,1 a 123,6%, para o monitoramento do sinal analítico em 529 nm e 681 nm, respectivamente. Utilizando-se um método comparativo para validar esses resultados, verificou-se através do teste t-student que os percentuais de recuperação encontrados através das sondas de AuNPs e através do método comparativo foram estatisticamente iguais. Estudos com saliva de pacientes em tratamento com TBR indicam o potencial da sonda para a análise de fluidos biológicos.

Palavras-chave

Aminoglicosídeos; Nanopartículas de ouro; Tobramicina; Estreptomicina; Ressonância de plasmon.

Abstract

Santos, Hellen Silva; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor); Silva, Andrea Rosane da (Co-advisor). **Interaction of aminoglycosides with gold nanoparticles and the spectrophotometric probe for the determination of tobramycin.** Rio de Janeiro, 2014. 219p. MSc. Dissertation-Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Aminoglycosides (AMG) belong to a class of antibiotics effective for the treatment of infections caused by Gram-negative and Gram-positive microorganisms. Ototoxicity, nephrotoxicity and muscle disorders are side effects of using these substances, implying the importance of controlling the use of pharmaceutical formulations based on AMG with practical analytical methods for routine, sensitive and selective. The molecular structures of the AMG does not present any relevant chromophores groups that enable direct measurement of their optical activity, thus, the methods described in the literature for determining it normally to use of chemical derivatization implying high delays, high costs and toxicity (dye reagents used) in such methods. The studies present in this dissertation, it is proposed to use of gold nanoparticles (AuNPs) as analytical probes for spectrophotometric determination of AMG, by exploration of the resonance Plasmon effect on the surface of AuNPs. Was investigated the analytical potential of aqueous dispersions of AuNPs as probes for the determination of tobramycin (TBR) neomina (NEO), gentamicin (GENTA), kanamycin (CANA), streptomycin (EST) and amikacin (AMIC). Promising results were found for all AMG cited except EST. In the case of TBR, an analytical method for its determination in ophthalmic solutions was proposed. The analytical curves were constructed by monitoring the transmitted light at 529 nm or 681 nm. The monitoring of the analytic signal in 529 nm yielding a linear range from $6.5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ to $1.6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ with good linearity ($R^2= 0.9943$) and the limit of detection (LOD) equal to $6.2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. The monitoring of the analytic signal in 681 nm yielding a linear range from $4.4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ to $1.6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ with good linearity ($R^2= 0.9949$) and the LOD equal to $3.8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. The method showed to be robust in a pH range between 2.6 and 4.5, for 120 min. The method showed satisfactory accuracy and demonstrated selectivity with

respect to other AMG, EST, and with respect to excipients present in the samples analyzed. Yielded percentage recoveries for samples (simulated and real ophthalmic solutions) from 104.0 to 123.1 % and from 101.1 to 123.6 %, for the monitoring of the analytical signal at 529 nm and 681 nm, respectively. Using a comparative method to validate these results, it was found through the t-student test that the percentage recovery found through the AuNPs probes and the comparative method were statistically equal. Studies in saliva from patients under TBR treatment indicated the potential of the probe for the analysis of biological fluids.

Keywords

Aminoglycosides; Gold nanoparticles; Tobramycin; Streptomycin; Plasmon resonance.

Sumário

1	Introdução	25
1.1.	Contextualização do trabalho	25
1.2.	Estrutura da Dissertação	27
1.3.	Objetivos	29
1.3.1.	Objetivo Geral	29
1.3.2.	Objetivos Específicos	29
2	Fundamentação Teórica	30
2.1.	Aminoglicosídeos	30
2.1.1.	Tobramicina	35
2.1.2.	Uma breve descrição de alguns AMG importantes	40
2.1.2.1.	Estreptomicina	40
2.1.2.2.	Neomicina	41
2.1.2.3.	Gentamicina	42
2.1.2.4.	Amicacina	42
2.1.2.5.	Canamicina	43
2.1.3.	Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de AMG	44
2.2.	Nanomateriais	46
2.2.1.	Nanopartículas	48
2.2.1.1.	Nanopartículas de ouro	49
2.2.1.2.	Características das dispersões coloidais	51
2.2.1.3.	Efeito dos plasmons de ressonância na superfície das nanopartículas de ouro	58
2.2.1.4.	Coeficiente de extinção em nanopartículas de ouro	62
2.2.1.5.	Tipos de sínteses de nanopartículas de ouro	64
2.2.1.6.	Aplicações de nanopartículas em Química Analítica	71
2.2.1.7.	Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas de ouro	74

3 Materiais, Instrumentação e procedimentos experimentais	79
3.1. Materiais e Reagentes	79
3.2. Instrumentação	80
3.3. Procedimentos para o preparo de soluções, dispersões e tratamento de amostras	81
3.3.1. Análises espectrofotométricas no UV-vis	81
3.3.2. Análises por Cromatografia Líquida de alta eficiência	82
3.3.3. Análises por microscopia eletrônica por varredura de transmissão (STEM)	83
3.4. Sínteses de nanopartículas de ouro	84
3.4.1. Síntese I: ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio monobásico	84
3.4.2. Síntese II: ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio tribásico	84
3.4.3. Síntese III: cloreto de ouro reduzido por citrato de sódio tribásico	84
3.4.4. Síntese IV: cloreto de ouro reduzido por citrato de sódio monobásico	85
3.5. Desenvolvimento e validação de métodos	86
3.5.1. Parâmetros analíticos de mérito	86
3.5.1.1. Faixa de Trabalho e Faixa Linear	87
3.5.1.2. Sensibilidade do método	89
3.5.1.2.1. Limite de detecção (LD)	89
3.5.1.2.2. Limite de quantificação (LQ)	90
3.5.1.2.3. Seletividade e especificidade	90
3.5.1.3. Robustez	91
3.5.1.4. Tendência/Recuperação	91
3.5.1.5. Precisão	91
4 Resultados e discussão: Avaliação do potencial analítico de nanopartículas de ouro sintetizadas por diferentes rotas	92
4.1. Síntese I: Ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio monobásico	94

4.2. Síntese II: ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio tribásico	104
4.3. Síntese III: cloreto de ouro reduzido por citrato de sódio tribásico	114
4.4. Síntese IV: cloreto de ouro reduzido por citrato de sódio monobásico	125
5 Resultados e discussão: determinação de tobramicina por espectrofotometria usando o efeito de ressonância plasmônica na superfície das AuNPs	140
5.1. Estudos preliminares	141
5.1.1. Condições de síntese e estabilidade das dispersões de AuNPs em função da diluição	141
5.1.2. Avaliação do pH das dispersões de trabalho	151
5.2. Parâmetros analíticos de mérito	158
5.2.1. Faixa de trabalho e faixa linear	158
5.2.2. Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)	164
5.2.3. Robustez	164
5.2.4. Precisão instrumental e intermediária	166
5.2.5. Seletividade da resposta analítica	166
5.2.5.1. Seletividade avaliada com relação aos componentes das matrizes das amostras reais	166
5.2.5.2. Seletividade com relação à presença de STP	172
5.2.5.3. Estudos da interação entre outros AMG e AuNPs	176
5.2.6. Aplicação do método	180
5.2.6.1. Soluções oftálmicas e misturas simuladas	180
5.2.6.2. Estudos em saliva	183
6 Conclusões	187
7 Referências Bibliográficas	190
Anexos	203

Lista de figuras

- Figura 1:** Estrutura geral dos AMG dissubstituídos nas posições 4 e 5 da 2-desoxi-estreptamina, possuindo até quatro grupos substituintes que diferenciam as moléculas. O anel II é a 2-desoxi-estreptamina. 32
- Figura 2:** Estruturas gerais dos AMG dissubstituídos nas posições 4 e 6 da 2-desoxi-estreptamina, sendo diferenciadas por oito grupos substituintes na molécula. O anel em rosa representa a 2-desoxi-estreptamina. 33
- Figura 3:** Estrutura molecular da tobramicina (livre de base). 37
- Figura 4:** Estrutura molecular da estreptomina (livre de base). 41
- Figura 5:** Estrutura molecular da neomicina (livre de base). 41
- Figura 6:** Estrutura molecular da amicacina (livre de base). 43
- Figura 7:** Estrutura molecular da canamicina (livre de base). 44
- Figura 8:** A) Representação esquemática da dupla camada elétrica e da vizinhança em interfaces sólido-líquido. B) Distribuição do potencial elétrico na região da dupla camada em torno de uma partícula carregada, mostrando o potencial zeta e o espaço recíproco de Debye (adaptado de Somasundaran et al., 2002). 56
- Figura 9:** Representação esquemática da origem de cargas em meios não aquosos, onde: B = molécula do solvente; AH = molécula do surfactante (Fonte: da própria autora). 57
- Figura 10:** Separação de cargas na superfície de AuNPs decorrentes da incidência de uma onda eletromagnética (Adaptado de Trügler, 2011). 60
- Figura 11:** Fluxograma esquemático do processo de formação de AuNPs por redução do citrato de sódio tribásico (Na₃Cit) (adaptado de Casanova, 2010). 67
- Figura 12:** Proposta de mecanismo para a redução de Au(III) e oxidação do citrato em meio ácido (pH: 3,1-4,8). (adaptado de Ojea-Jiménez e Campanera, 2012). 69
- Figura 13:** Estruturas moleculares relevantes formadas durante as etapas do mecanismo de reação de formação das AuNPs, considerando-se a influência do pH do meio. As representações seguem o modelo de bola e bastão (Ball and Stick models), as linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio intramoleculares e as ligações quebradas no estado de transição. As bolas verdes representam os átomos de cloro, as amarelas o átomo de ouro, em preto os átomos de carbono, em vermelho os átomos de oxigênio e em branco os átomos de hidrogênio (adaptado de Ojea-Jiménez e Campanera, 2012). 70
- Figura 14.** Imagens por STEM das AuNPs obtidos a partir da dispersão coloidal da síntese I: (A) imagem original; B) imagem após processamento através do programa Image J (FIJI). 95

- Figura 15.** Histogramas referentes ao processamento das imagens da AuNPs (obtidas a partir da síntese I) que relaciona as dimensões das nanopartículas: A) Eixo maior, B) Eixo menor, C) Razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), D) Circularidade; E) Área. 96
- Figura 16.** Espectros das dispersões de AuNPs da síntese I na ausência e na presença de diferentes concentrações de TBR. Linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 2,8; 6,0; 10; 16 [$\times 10^{-8}$ mol L⁻¹]). 98
- Figura 17.** Resposta óptica das dispersões de AuNPs (obtidas a partir da síntese I) em função do aumento da concentração de TBR: A) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm, em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = (0,1503 \pm 0,0047) - (3,8527 \times 10^5 \pm 6,1580 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,8641$); B) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = (0,0241 \pm 0,01219) + (8,1623 \times 10^5 \pm 1,6066 \times 10^5) X$; $R^2 = 0,80527$); C) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm, apenas na faixa linear (equação da curva: $Y = (0,1520 \pm 0,0027) - (5,2397 \times 10^5 \pm 4,8881 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9661$); D) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm apenas na faixa linear (equação da curva: $Y = (0,0210 \pm 0,0050) + (1,1605 \times 10^6 \pm 9,4878 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9738$). 100
- Figura 18.** Diagramas *Box plot* avaliando os desvios entre os sinais, $\log(I_0/I)$, da sonda de AuNPs (produzida através da síntese I) na presença de quantidades crescentes de TBR: A) 529 nm; B) 681 nm. C) Coeficientes de variação dos sinais da sonda na presença de concentrações crescentes de TBR levando em consideração três ensaios com monitoramento em 529 nm e 681 nm. 101
- Figura 19.** Variação do valor de pH nas dispersões de AuNPs (síntese I) em função do aumento de concentração de TBR. 104
- Figura 20.** Imagens por STEM das AuNPs obtidos a partir da síntese II: A) imagem original; B) imagem após processamento através do programa *Image J (FIJI)*. 105
- Figura 21.** Histogramas referentes ao processamento das imagens da AuNPs (obtidas a partir da síntese II) que relaciona as dimensões das nanopartículas: A) Eixo maior, B) Eixo menor, C) Razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), D) Circularidade; E) Área. 106
- Figura 22.** Espectros das dispersões de AuNPs da síntese II na ausência e na presença de diferentes concentrações de TBR. Linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 2,8; 6,0; 10; 16 [$\times 10^{-8}$ mol L⁻¹]). 108
- Figura 23.** Resposta óptica das dispersões de AuNPs (obtida a através da síntese II) em função do aumento da concentração de TBR: A) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm, em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = (0,1126 \pm 0,0013) - (9,7020 \times 10^4 \pm 1,7620 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,8301$); B) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = -(0,0025 \pm 0,0076) + (4,7216 \times 10^5 \pm 1,0007 \times 10^5) X$; $R^2 = 0,7799$); C) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm apenas na faixa linear (equação da curva: $Y = (0,0053 \pm 0,0004) + (1,6843 \times 10^5 \pm$

- 9,0507 x 10³) X; R² = 0,9857). 110
- Figura 24.** Diagramas *Box plot* avaliando os desvios entre os sinais, log (I₀/I), da sonda de AuNPs (produzida através da síntese II) na presença de quantidades crescentes de TBR: A) 529 nm; B) 681 nm. C) Coeficientes de variação dos sinais da sonda na presença de concentrações crescentes de TBR levando em consideração três ensaios com monitoramento em 529 nm e 681 nm. 111
- Figura 25.** Variação de pH das dispersões preparadas com a AuNPs (síntese II) em função do aumento de concentração de TBR. 114
- Figura 26.** Imagens por STEM das AuNPs obtidos pela síntese III: A) imagem original; B) imagem após processamento através do programa *Image J (FIJI)*. 116
- Figura 27.** Histogramas referentes ao processamento das imagens da AuNPs (obtidas a partir da síntese III) e que relaciona as dimensões das nanopartículas: A) Eixo maior, B) Eixo menor, C) Razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), D) Circularidade; E) Área. 118
- Figura 28.** Espectros das dispersões de AuNPs da síntese III na ausência e na presença de diferentes concentrações de TBR. Linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 2,8; 6,0; 10; 16 [x10⁻⁸ mol L⁻¹]) 120
- Figura 29.** Resposta óptica das dispersões de AuNPs (obtida a através da síntese III) em função do aumento da concentração de TBR: A) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm, em toda a faixa de trabalho (equação da curva: Y= (0,09329 ± 0,0010) - (7,2838 x 10⁴ ± 1,2824 x 10⁴) X; R² = 0,8390); B) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm em toda a faixa de trabalho (equação da curva: Y= (0,0094 ± 0,0028) + (2,2291 x 10⁵ ± 3,6980 x 10⁴) X; R² = 0,8549); C) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm apenas na faixa linear (equação da curva: Y= (0,0069 ± 0,0018) + (3,1856 x 10⁵ ± 3,6618 x 10⁴) X; R² = 0,9373). 121
- Figura 30.** Diagramas *Box-plot* avaliando os desvios entre os sinais analíticos da sonda obtida através da síntese III monitorando-se a intensidade de log (I₀/I) em: A) 529 nm; B) 681 nm. C) Coeficientes de Variação encontrados entre os sinais analíticos para os padrões dos três ensaios com monitoramento em 529 nm e 681 nm. 122
- Figura 31.** Variação do valor de pH nas dispersões de AuNPs (síntese III) em função do aumento de concentração de TBR. 125
- Figura 32.** Imagens por STEM das AuNPs obtidas a partir da síntese IV. 127
- Figura 33.** Histogramas referentes ao processamento das imagens da AuNPs (obtidas a partir da síntese IV) e que relaciona as dimensões das nanopartículas: A) Eixo maior, B) Eixo menor, C) Razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), D) Circularidade; E) Área. 128
- Figura 34.** Espectros para das dispersões de AuNPs da síntese IV na ausência e na presença de diferentes concentrações de TBR. Linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 2,8; 6,0; 10; 16 [x10⁻⁸ mol L⁻¹]). 131
- Figura 35.** Resposta óptica das dispersões de AuNPs (obtida a através da

síntese IV) em função do aumento da concentração de TBR: A) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm (equação da curva: $Y = (0,3510 \pm 0,0009) - (4,8753 \times 10^5 \pm 1,9209 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9929$); B) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm (equação da curva: $Y = (0,0282 \pm 0,0017) + (1,7153 \times 10^6 \pm 3,4060 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9980$). 132

Figura 36. Diagramas *Box plot* avaliando os desvios entre os sinais analíticos da sonda obtida através da síntese IV monitorando-se a intensidade de $\log(I_0/I)$ em: A) 529 nm; B) 681 nm. C) Coeficientes de Variação encontrados entre os sinais analíticos para os padrões dos três ensaios com monitoramento em 529 nm e 681 nm. 133

Figura 37. Variação de pH nas dispersões de AuNPs da síntese IV, em função do aumento de concentração de TBR. 136

Figura 38. Monitoramento do sinal da sonda (após diluição) em função do tempo das alíquotas provenientes das sínteses obtidas seguido o procedimento da síntese IV (sem banho-maria) sob diferentes temperaturas. Linhas a-c: condição 1, condição 2 e condição 3. 143

Figura 39. Monitoramento do sinal analítico em função do tempo de alíquotas provenientes da síntese IV feita em banho-maria, chamada de condição 4. 145

Figura 40. Perfis espectrais de três dispersões diluídas (40% v/v de AuNPs referente ao volume total da dispersão) obtidas a partir de três sínteses independentes na condição 4 (síntese IV). Conforme a legenda, a, b e c representam a primeira, segunda e terceira repetições, respectivamente. 146

Figura 41. Avaliação dos sinais das sondas em dispersões diluídas constituídas por 1 parte de dispersão estoque de AuNPs e 1,5 partes de água (40% v/v de AuNPs no volume total), a partir das três sínteses independentes 1, 2 e 3 (procedimento da síntese IV); (a) Dispersões de AuNPs na ausência de TBR, (b) dispersões de AuNPs na presença de TBR ($2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e (c) dispersões de AuNPs na presença de TBR ($5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). 148

Figura 42. A) Perfis espectrais das dispersões diluídas de AuNPs, linha a dispersão composta por 40% v/v de AuNPs, linha b dispersão composta por 20% v/v de AuNPs (B) Estabilidade do sinal em função da dispersão composta por 40% v/v de AuNPs (C) Estabilidade do sinal em função da dispersão composta por 20% v/v de AuNPs, ambas com monitoramento em 530 nm. 149

Figura 43. Estabilidade do sinal da sonda em função do tempo: (A) dispersão de trabalho (na ausência de AMG) contendo AuNPs na concentração estimada de $2,4 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e (B) dispersão-mãe de AuNPs na concentração estimada de $3,0 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹. Ambas com monitoramento do sinal em 529 nm. 150

Figura 44. Estudo de estabilidade das dispersões-branco em diferentes valores de pH. A) sinal das dispersões-branco em função do tempo (em diferentes valores de pH (linhas de a-g representando valores de

pH de 2,6 a 9,7, com incrementos de, aproximadamente, 1 unidade de pH), monitorados em 530 nm); B) Diagrama Box plot para a variação de sinal em um mesmo pH. 153

Figura 45. Intensidade de sinal analítico de dispersões de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) na faixa de pH de 2,6 a 9,7, com monitoramento em (a) 530 nm e (b) 681 nm. 155

Figura 46. Espectros das dispersões de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), com ajustes no pH do meio na faixa de 2,7 a 9,7; obtidos logo após o preparo das dispersões (tempo 0); pH das dispersões conforme as linhas de a-g: 2,62; 3,09; 3,68; 4,53; 5,53; 6,46 e 9,73. 155

Figura 47. Monitoramento do valor do pH em dispersões de trabalho de AuNPs em função do aumento da concentração de TBR (0,0; 0,4; 0,8; 1,3; 1,8; 2,2; 3,1; 4,0; 4,8; 5,8; 6,7; 7,5; 8,4; 9,3; 10,2; 10,4; 12,0; 12,9 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)). 156

Figura 48. Descoramento, em função do tempo, das dispersões de AuNPs devido à adsorção das mesmas em tubos Falcon®. 157

Figura 49. Espectros das dispersões de trabalho de AuNPs ($2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência e na presença de concentrações crescentes de TBR. Linhas de a-m: concentrações de TBR (0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 2,8; 5,2; 6,0; 8,4; 10; 11; 12; 14; 16 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)). 159

Figura 50. Alterações macroscópicas da coloração da sonda (concentração de AuNPs de $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) em decorrência do incremento de TBR. Concentrações de TBR nas dispersões de 1 a 13: (0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 2,8; 3,2; 5,2; 6,0; 8,4; 10; 11; 12; 14; 16 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)). 160

Figura 51. Avaliação qualitativa do comportamento da sonda com monitoramento do sinal em 529 nm (b) e em 681 nm (a), na presença de concentrações de TBR variando de 0,7 a $31,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. 163

Figura 52. Curvas analíticas construídas a partir de dispersões de AuNPs na presença de TBR (faixa de $4,0 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) nos seguintes comprimentos de onda: A) 529 nm; B) 681 nm. 163

Figura 53. Gráfico de resíduos para as curvas analíticas construídas a partir de dispersões de AuNPs na presença de TBR: A) com monitoramento de sinal em 529 nm; B) com monitoramento de sinal em 681 nm. 164

Figura 54. Intensidade do sinal de uma dispersão de trabalho de AuNPs na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo com medidas realizadas após 5 min do preparo da dispersão. Monitoramento do sinal em a) 529 nm e b) 681 nm. 165

Figura 55. Avaliação de interferência com relação ao sinal do padrão de TBR $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, em 529 nm separados de acordo com a natureza dos interferentes: A) inorgânicos; B) orgânicos. 169

Figura 56. Avaliação de interferência com relação ao sinal do padrão de TBR $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, em 681 nm separados de acordo com a natureza dos interferentes: A) inorgânicos; B) orgânicos. 170

- Figura 57.** Avaliação da interferência causada pela presença de diferentes concentrações de STP nas dispersões de trabalho contendo TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) nas proporções: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 e 1:7 com monitoramento do sinal em (a) 529 nm e (b) 681 nm. 173
- Figura 58.** Imagens por STEM: A) dispersão de trabalho na ausência de AMG (dispersão-branco); B) dispersão de trabalho na presença de STP ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e C) dispersão de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). 174
- Figura 59.** Espectros da (a) dispersão de trabalho na ausência de AMG (dispersão-branco), (b) dispersão de trabalho na presença de STP ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) (c) dispersão de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). 175
- Figura 60.** Espectros de dispersões de trabalho de AuNPs (obtidas na síntese IV), na presença de concentrações crescentes dos AMG. A) Concentrações crescentes de GENTA conforme as linhas de a-g: (0,0; 0,8; 2,8; 4,0; 8,4; 10,8; 12,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. B) Concentrações crescentes de NEO conforme as linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 3,2; 4,0; 6,0; 8,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. C) Concentrações crescentes de AMIC conforme as linhas de a-g: (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 16,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. D) Concentrações crescentes de CANA conforme as linhas de a-g: (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 20,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. 178
- Figura 61.** Curvas analíticas dos AMG obtidas através da sonda de AuNPs (produzidas nas condições da síntese IV), com monitoramento do sinal analítico em 529 nm. A) Concentrações crescentes de GENTA (0,0; 0,8; 2,8; 4,0; 8,4; 10,8; 12,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. B) Concentrações crescentes de NEO (0,0; 0,8; 1,6; 3,2; 4,0; 6,0; 8,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. C) Concentrações crescentes de AMIC (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 16,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. D) Concentrações crescentes de CANA (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 20,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. 180
- Figura 62.** Curvas analíticas dos AMG obtidas através da sonda de AuNPs (produzidas nas condições da síntese IV), com monitoramento do sinal analítico em 681 nm. A) Concentrações crescentes de GENTA (0,0; 0,8; 2,8; 4,0; 8,4; 10,8; 12,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. B) Concentrações crescentes de NEO (0,0; 0,8; 1,6; 3,2; 4,0; 6,0; 8,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. C) Concentrações crescentes de AMIC (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 16,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. D) Concentrações crescentes de CANA (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 20,0) $\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. 180
- Figura 63.** Espectros obtidos nos testes com as amostras de saliva M, tomando-se como perfil comparativo (a) dispersão de trabalho na ausência de TBR e saliva (dispersão-branco) e (g) dispersão de trabalho na presença de TBR ($1,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Os testes com as amostras de saliva nas dispersões de trabalho na presença de 20 μL da (b) saliva pura (antes do indivíduo fazer uso do colírio); (c) saliva coletada após 5 min de aplicação do medicamento; (d) saliva coletada após 30 min de aplicação do medicamento; (e) saliva coletada após 1 h de aplicação do medicamento; (f) saliva coletada após 2 h de aplicação do medicamento; (h) saliva pura, (antes do indivíduo fazer uso do colírio), enriquecidas com TBR na concentração de $1,62 \times 10^{-8}$

mol L⁻¹. 184

Figura 64. Gráfico referente aos resultados obtidos com as amostras de saliva F, monitorando-se o sinal da sonda em 529 nm e em 681 nm. 186

Figura 65. Espectros eletrônicos gerados para os padrões com concentrações de TBR conforme as linhas a-f: (0,0; 0,6; 1,3; 1,8; 2,5; 3,2 (x10⁻⁴ mol L⁻¹)). 205

Figura 66. Curva analítica para TBR, obtidas através da derivatização com RS, monitorando-se o sinal em 415 nm. Concentrações de TBR de (0,6 a 3,2 (x10⁻⁴ mol L⁻¹)). 205

Figura 67. Média dos percentuais de recuperação obtidos em triplicata para as amostras simuladas em dois níveis de concentração de TBR: a) 2,4 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; b) 6,3 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. 206

Figura 68. Curva analítica obtida para os padrões de TBR com concentrações entre 9,9 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ e 1,7 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. Equação da curva: $Y = (-1,0461 \pm 0,7836) + (1,1232 \times 10^7 \pm 7,9207 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9999$. 208

Figura 69. Cromatogramas obtidos através do método de Beulac *et al.* (A) branco, (B) padrão de TBR (1,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹), (C) amostra simulada (1,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹), (D) amostra com a solução oftálmica tobragan (1,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹), (E) amostra com a solução oftálmica tobrex (1,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹). 209

Lista de tabelas

Tabela 1: Resumo das forças entre duas partículas idênticas dispersas em dispersões coloidais (Fonte: Somasundaran et al., 2002).	53
Tabela 2: Métodos sintéticos avaliados por Turkevich et al.(1951)	66
Tabela 3: Composição das matrizes das soluções oftálmicas analisadas.	80
Tabela 4: Rotas sintéticas para o preparo das dispersões aquosas das AuNPs.	85
Tabela 5. Resultados das características morfológicas da AuNPs obtidas a partir da síntese I.	97
Tabela 6. Parâmetros das curvas obtidas com a sonda das AuNPs da síntese I na presença de TBR e com monitoramento do sinal em em 529 e 681 nm, considerando-se a faixa de resposta linear.	102
Tabela 7. Análise dos dados da interação entre a AuNPs (síntese I) e TBR na faixa de resposta linear da sonda usando dados da triplicata das curvas da Tabela 5.	103
Tabela 8. Resultados das características morfológicas da AuNPs obtidas a partir da síntese II.	107
Tabela 9. Parâmetros das curvas obtidas com a sonda das AuNPs da síntese II na presença de TBR e com monitoramento do sinal em em 529 e 681 nm, considerando-se a faixa de trabalho, e a faixa linear.	112
Tabela 10. Análise dos dados da interação entre a AuNPs (síntese II) e TBR na faixa de resposta linear da sonda usando dados da triplicata das curvas da Tabela 8.	113
Tabela 11. Resultados das características morfológicas da AuNPs obtidas a partir da síntese III.	119
Tabela 12. Parâmetros das curvas obtidas com a sonda das AuNPs da síntese III na presença de TBR e com monitoramento do sinal em 681 nm.	123
Tabela 13. Análise dos dados da interação entre a AuNPs (síntese III) e TBR na faixa de resposta linear da sonda usando dados da triplicata das curvas da Tabela 11.	124
Tabela 14. Resultados das características morfológicas da AuNPs obtidas a partir da síntese IV.	130
Tabela 15. Parâmetros das curvas obtidas com a sonda das AuNPs da síntese IV na presença de TBR e com monitoramento do sinal em em 529 e 681 nm.	134
Tabela 16. Análise da repetibilidade, por estatística simples, da sonda analítica com as AuNPs obtidas a partir da síntese IV para a determinação de TBR, a partir da avaliação dos desvios encontrados entre as variáveis.	135

Tabela 17. Concentração de dispersões-branco de AuNPs, diâmetros médios e coeficientes de extinção das AuNPs avaliadas.	137
Tabela 18. Rotas sintéticas para o preparo de dispersões aquosas de AuNPs.	139
Tabela 19. Condições estabelecidas para a sonda de AuNPs para determinação de AMG.	157
Tabela 20. Métodos reportados por ¹ Apyari <i>et al.</i> (2013) e ² Wang <i>et al.</i> (2013) para a determinação de NEO e KANA através de sondas de AuNPs, comparados com o método proposto do presente trabalho ³ para a determinação de TBR através de sondas de AuNPs.	161
Tabela 21. Parâmetros analíticos das curvas com monitoramento do sinal da sonda ($\log I_0/I$) em 529 nm ou 681 nm.	163
Tabela 22. Limites de detecção e de quantificação para o sinal monitorado em 529 e 681 nm.	164
Tabela 23. Precisão Intermediária e Instrumental da sonda de AuNPs.	166
Tabela 24. Composição das soluções oftálmicas com base nas informações de patente. (Cagle <i>et al.</i> , USA, Patente: 5149696, 1992).	167
Tabela 25. Avaliação de interferência de substâncias orgânicas no sinal da dispersão de trabalho contendo TBR ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹).	171
Tabela 26. Avaliação de interferência dos excipientes das soluções oftálmicas no sinal da dispersão de trabalho contendo TBR ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹), em proporções próximas às previstas nas patentes das mesmas.	172
Tabela 27. Análise morfológica dispersão de trabalho na presença de STP ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹).	175
Tabela 28. Resultados da avaliação do potencial analítico da sonda de AuNPs (obtidas através da síntese IV), na presença de NEO, AMIC, GENTA e CANA: faixa linear encontrada e média dos parâmetros analíticos das curvas, obtidos em duplicata por dois diferentes analistas, avaliando-se os desvios entre os resultados através do coeficiente de variação.	177
Tabela 29. Recuperação das amostras simuladas e das amostras reais de soluções oftálmicas utilizando a sonda de AuNPs ($2,38 \times 10^{-10}$ mol L ⁻¹).	182
Tabela 30. Recuperação nas amostras simuladas e das amostras de soluções oftálmicas através da reprodução do método cromatográfico descrito por Beulac <i>et al.</i> (1996).	182
Tabela 31. Comparativo entre o teor encontrado para as amostras através da utilização das sondas de dispersões de AuNPs, do método cromatográfico e dos laudos apresentados pelo fabricantes.	182

1 Introdução

1.1. Contextualização do trabalho

Os aminoglicosídeos (AMG) são uma classe de antibióticos cujo uso clínico se tornou intenso após a descoberta da estreptomicina (STP) e da confirmação de sua eficácia no tratamento da tuberculose. Desde então, muitos outros AMG foram produzidos para finalidades diversas, podendo-se citar entre estes, a tobramicina (TBR), a neomicina (NEO), a gentamicina (GENTA), a canamicina (CANA), a amicacina (AMIC).

O uso clínico desses AMG está associado, de maneira geral, ao combate de infecções provocadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas tanto em humanos quanto em animais (uso veterinário). Os principais efeitos colaterais associados ao uso dos AMG são: nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio muscular. Em função disso, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas que viabilizem monitorar a concentração desses AMG nos medicamentos disponíveis no mercado, em fluidos biológicos e em derivados alimentícios de origem animal, possibilitando maior controle dos níveis de concentrações que provocarão tais efeitos colaterais nos seres vivos.

Diversos métodos analíticos para determinação de AMG podem ser encontrados na literatura, entretanto, a estrutura molecular desses antibióticos dificulta essa tarefa, pois os AMG não possuem nenhum grupo cromóforo ou relevantes sítios eletroquímicos que produzam resposta analítica significativa e que permitam a sua determinação direta. Dessa maneira, os métodos espectrofotométricos disponíveis na literatura estão associados ao uso da derivatização química para produzir derivados que produzem resposta analítica relevante e com isso permitir a determinação indireta dos AMG. Tais agentes químicos são, em geral, muito tóxicos (por exemplo, o 2,4-dinitrofluorobenzeno) e os procedimentos de derivatização são morosos e de alto custo, contrariando a

tendência moderna para simplificação dos processos e diminuição de custos e risco (princípios da Química Verde).

No presente trabalho é proposta a determinação do AMG tobramicina (TBR) em amostras de soluções oftálmicas, fazendo-se uso do efeito de ressonância plasmônica que ocorre na superfície de nanopartículas de ouro (AuNPs). Desse modo, a amostra não é submetida a nenhuma etapa de pré-tratamento, sendo analisada diretamente por espectrofotometria com medição de alteração da intensidade da radiação transmitida pela dispersão de AuNPs na presença de TBR. Essa abordagem é simples, barata, de bom custo-benefício e gera resíduos de baixa toxicidade.

As AuNPs utilizadas nesta proposta foram sintetizadas na forma de dispersões aquosas, sendo simples a preparação tanto da dispersão estoque (obtida na síntese) quanto a dispersão de trabalho (sonda analítica). Porém, o processo de síntese das AuNPs deve ser criteriosamente controlado, pois, diferenças com relação ao agente precursor (a fonte de ouro), ao agente redutor, ao agente estabilizante e no procedimento implicam na formação de nanomaterias com propriedades distintas em relação a resposta óptica na presença dos AMG.

Especificamente, a síntese utilizada aqui se baseou na rota tradicional estabelecida por Turkevich (1951), que promove tanto a redução quanto a estabilização das dispersões através do uso de citrato de sódio. O citrato de sódio pode ser encontrado em diferentes formas, podendo ser monobásico ou tribásico. A escolha do tipo do citrato influenciou diretamente as propriedades das AuNPs, uma vez que o mecanismo de obtenção das mesmas é dependente do pH do meio, o que implica na obtenção de nanomateriais com diferenças nas geometrias e dimensões. A dimensão e a homogeneidade das AuNPs produzidas dependem também de diversas variáveis que influenciam nos fenômenos de nucleação e crescimento e que são dependentes da concentração e da taxa de incremento dos reagentes empregados na síntese e da temperatura do meio reacional (Turkevich et al., 1951).

A interação entre AuNPs e AMG foi descrita inicialmente na literatura em estudos estritamente biológicos, entretanto, artigos publicados recentemente tiraram vantagem desta interação para fins analíticos. Contudo, tais abordagens analíticas não estudam as potencialidades seletivas de determinação de um AMG na presença de outros da mesma classe nem apresenta as peculiaridades das

respostas analíticas em função da qualidade das nanopartículas dispersas na sonda de trabalho e suas consequências na aplicação da abordagem na análise de amostras reais de soluções oftálmicas e em fluidos biológicos (saliva de pacientes tratados com TBR), apresentados no escopo deste trabalho.

Desde 2009, o Laboratório de Espectroanalítica e Eletroanalítica Aplicada da PUC-Rio (LEEA-PUC-Rio) tem dedicado uma considerável parte de seu esforço científico (que envolve potencial humano e aportes financeiros) na aplicação de nanomateriais em Química Analítica. O objetivo é o de resolver problemas analíticos fazendo uso das vantagens promovidas pelos nanomateriais em termos de detecção analítica, preparação de amostra, separação de espécies, etc. Os principais projetos envolvem a aplicação de nanopartículas semicondutoras, nanopartículas metálicas e grafeno na obtenção de sondas ópticas ou eletroanalíticas. Em 2012 o primeiro artigo científico do LEEA-PUC-Rio nessa área foi publicado. Mais dois trabalhos foram publicados em 2013 e a primeira Tese do Grupo foi defendida, com o tema em sensores fotoluminescentes baseados em nanocristais semicondutores em dispersões aquosas. Nesse início de 2014, quatro artigos se encontram submetidos, três envolvendo sondas fotoluminescentes de nanocristais semicondutores e um envolvendo uso analítico de AuNPs, no caso o trabalho da presente dissertação. No tema da aplicação de nanomateriais em Química Analítica, ainda nesse ano, além da defesa da presente Dissertação, será defendida uma segunda Tese do Grupo. Vale também salientar que o presente trabalho é uma das contribuições do LEEA-PUC-Rio dentro do escopo de um projeto amplo de pós-doutorado, financiado pela CAPES no âmbito do Programa Nacional de Pós-Doutorado que visou o estabelecimento da área de nanociência no Departamento de Química da PUC-Rio.

1.2. Estrutura da Dissertação

A presente dissertação encontra-se estruturada em seis capítulos. No Capítulo 2, apresenta-se uma revisão bibliográfica para contextualização do trabalho. Inicialmente são apresentadas as principais características dos AMG, expondo as informações relevantes sobre essas substâncias, em especial para a tobramicina, alvo do método analítico desenvolvido no trabalho. Posteriormente,

traz-se uma fundamentação teórica sucinta sobre nanopartículas metálicas com foco nas características e propriedades das AuNPs, além de se indicar outras informações relevantes sobre esses nanomateriais. Nesse capítulo também, abordam-se informações da literatura a respeito da interação entre AuNPs e AMG.

O Capítulo 3 traz uma descrição de todo o procedimento experimental realizado. Listam-se os materiais, reagentes e instrumentações necessárias para execução do trabalho, apresentam-se todos os procedimentos experimentais realizados e descreve-se as equações matemáticas utilizadas para o cálculo dos parâmetros analíticos de mérito.

O Capítulo 4 tem como foco os resultados e a discussão a respeito dos diferentes tipos de sínteses estudadas para a obtenção das AuNPs. Neste capítulo, as diferentes partidas de AuNPs são avaliadas em termos de suas propriedades ópticas e morfológicas de modo a se escolher a que melhor responde à presença de TBR e logo a mais adequada para o desenvolvimento do método analítico.

No Capítulo 5 se apresentam os resultados do desenvolvimento do método analítico para determinação de tobramicina (TBR) por fotometria, tirando-se proveito do efeito de ressonância plasmônica na superfície de AuNPs, que altera a quantidade de radiação transmitida pela dispersão coloidal. Nesta etapa são apresentados todos os estudos preliminares, as otimizações dos parâmetros experimentais, a avaliação estabilidade das dispersões de trabalho em função da variação de tempo e de pH, os parâmetros analíticos de mérito, a comparação entre as recuperações de TBR em amostras reais de soluções oftálmicas através do método desenvolvido e por um método cromatográfico (previamente descrito na literatura). Por fim, apresentam-se os resultados investigativos sobre viabilidade de determinação de TBR em amostras de saliva. Nesse capítulo ainda são descritos os resultados dos estudos a respeito da interação entre a AuNPs e cinco AMG: neomicina (NEO), estreptomicina (EST), amicacina (AMIC), canamicina (CANA) e gentamicina (GENTA). Nesta etapa são indicadas as possibilidades de desenvolvimento de métodos analíticos para todos os AMG, exceto para a EST que não induziu atividade óptica relevante nas AuNPs na faixa de concentração escolhida para o estudo.

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

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo Geral

Estudar as propriedades de dispersões coloidais de nanopartículas de ouro almejando a aplicação analítica dessas como sondas para determinação de tobramicina através da técnica de espectrofotometria no visível, tirando-se proveito do efeito de ressonância plasmônica na superfície das AuNPs, além de fazer uma avaliação do potencial analítico da sonda para outros cinco diferentes AMG: STP, GENTA, AMIC, CANA e NEO.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Estudar as propriedades das AuNPs obtidas através da síntese de Turkevich e de uma adaptação dessa síntese clássica, estudando variações experimentais.
- Avaliar a resposta das sondas de AuNPs produzidas por diferentes rotas sintéticas frente presença de TBR.
- Avaliar a interação entre as AuNPs, que mostraram maior potencial analítico em termos de características ópticas e de interação com a TBR, e cinco diferentes AMG.
- Desenvolver e validar um método para determinação de TBR por espectrofotometria no visível, fazendo-se uso de AuNPs como sonda analítica.
- Estudar a potencialidade do uso da sonda para aplicações em saliva de pacientes tratados com TBR.

2 Fundamentação Teórica

2.1. Aminoglicosídeos

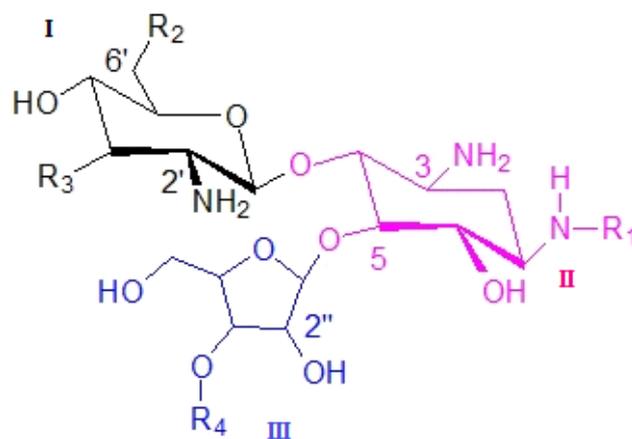
Os aminoglicosídeos (AMG) são antibióticos bacteriostáticos¹ que também podem ter efeito bactericida² em altas dosagens. Essas substâncias são eficazes no tratamento de infecções causadas por micro-organismos Gram-negativos e têm sensibilidade intermediária a outras bactérias Gram-positivas (Oliveira *et al.*, 2003). Esta classe de antibióticos começou a ser estudada em 1940 quando um grupo de pesquisa da universidade Rutgers (New Jersey, EUA) descobriu o potencial antibiótico de actinomicetos de solo (Waksman *et al.*, 1940). A partir da investigação destes actinomicetos, em 1943, Waksman *et al.* conseguiram isolar uma cepa de *Streptomyces griseus* associando-a à produção de uma substância que inibia o crescimento de diversos bacilos. A evolução deste estudo possibilitou isolar o primeiro AMG: a estreptomicina (EST), em 1944 (Oliveira *et al.*, 2006; Schatz *et al.*, 1944). Em 1952, Selman Waksman foi contemplado com o Prêmio Nobel de fisiologia/medicina, pela descoberta da EST, o primeiro antibiótico eficaz contra a tuberculose. Após este marco histórico, várias substâncias com potencial antibacteriano derivadas dos actinomicetos foram descobertas: neomicina (1949), canamicina (1957), paromomicina (1959), gentamicina (1963), tobramicina (1968), amiacina (1972), netilmicina (1975), spectinomicina (1962), sisomicina (1970), dibecacina (1971) e isepamicina (1978) (Oliveira *et al.*, 2006; Edson e Terrell, 1999).

Conforme pode ser visto na Figura 1 e na Figura 2, os AMG são moléculas hidrofílicas cuja estrutura geral é constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclital, que normalmente está na

¹ **Efeito bacteriostático:** inibe a reprodução das bactérias, mas, não provoca a morte celular, sendo as mesmas destruídas pelo sistema imunológico (Durante-Mangoni, et al., 2009)

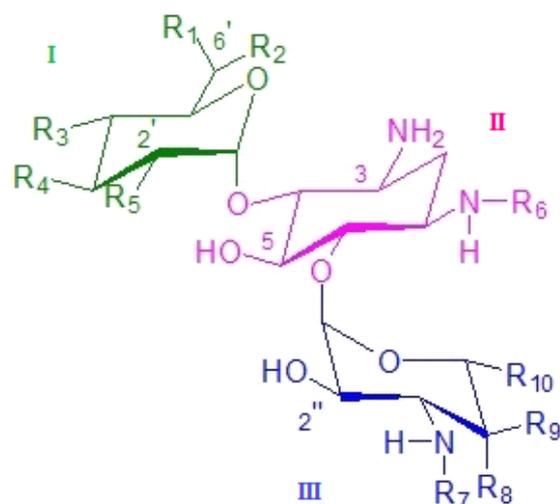
² **Efeito bactericida:** Provoca a morte das células das bactérias, mas, não há lise celular, sendo as mesmas excretadas pelo organismo (Durante-Mangoni, et al., 2009).

posição central (Oliveira *et al.*, 2006; Edson e Terrell, 1999). Geralmente, o grupo aminociclitol é a 2-desoxi-estreptamina, podendo encontrar-se dissubstituída nas posições 4 e 5, ou nas posições 4 e 6. Comumente, refere-se ao anel I como sendo o aminoaçúcar que se liga na posição 4 da 2-desoxi-estreptamina. O anel II é o grupo aminociclitol central (2-desoxi-estreptamina), o anel III é o aminoaçúcar que se liga à posição 5 ou 6 da desoxi-estreptamina. O anel IV corresponde a qualquer anel adicional ligado ao anel III. Entretanto, algumas estruturas dos AMG não se encaixam nessa regra geral, por exemplo, na estreptomicina o aminociclitol é a estreptidina e na espectinomicina, cuja estrutura possui três anéis fundidos, o anel aminociclitol é a espectinamina (Magnet e Blanchard, 2005).



Antibiótico	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ribostamicina	H	NH ₂	OH	H
Butirosina		NH ₂	OH	H
Paromomicina	H	OH	OH	
Neomicina B	H	NH ₂	OH	
Lividomicina A	H	OH	H	

Figura 1: Estrutura geral dos AMG dissubstituídos nas posições 4 e 5 da 2-desoxi-estreptamina, possuindo até quatro grupos substituintes que diferenciam as moléculas. O anel II é a 2-desoxi-estreptamina.



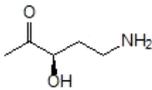
Antibiótico	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
Canamicina A	H	NH ₂	OH	OH	OH	H	H	H
Canamicina B	H	NH ₂	OH	OH	NH ₂	H	H	H
Tobramicina	H	NH ₂	OH	H	NH ₂	H	H	H
Dibecacina	H	NH ₂	H	H	NH ₂	H	H	H
Gentamicina B	H	NH ₂	OH	OH	OH	H	CH ₃	OH
Gentamicina C1	CH ₃	NHCH ₃	H	H	NH ₂	H	CH ₃	OH
Gentamicina C1A	H	NH ₂	H	H	NH ₂	H	CH ₃	OH
Gentamicina C2	CH ₃	NH ₂	H	H	NH ₂	H	CH ₃	OH
Amicacina	H	NH ₂	OH	OH	OH		H	H

Figura 2: Estruturas gerais dos AMG dissubstituídos nas posições 4 e 6 da 2-desoxi-estreptamina, sendo diferenciadas por oito grupos substituintes na molécula. O anel em rosa representa a 2-desoxi-estreptamina.

Pode-se perceber, através das estruturas apresentadas, que os AMG são substâncias básicas, catiônicas, fortemente polares por isso, possuem maior atividade antimicrobiana em meios alcalinos. Tal caráter polar implica em relativa insolubilidade em lipídios, desse modo, os AMG são pouco absorvidos a partir do intestino e tem penetração na barreira hemato-encefálica mesmo quando a inflamação está presente. A penetração dos AMG é limitada em secreções brônquicas, líquido prostático, saliva, bile e fluido vítreo, entretanto, concentrações elevadas são encontradas em fluidos sinoviais, ossos e fluidos

peritoneais. As concentrações encontradas na urina são, tipicamente, de 25 à 100 vezes maiores do que no soro sanguíneo (Zembower et al., 1998).

A natureza catiônica dos AMG contribui para sua atividade antimicrobiana, pois a carga positiva possibilita sua ligação com o lipopolissacarídeo aniônico da parede celular bacteriana bem como com uma variedade de moléculas aniônicas intracelulares e de membrana de células (tais como o ADN e fosfolipídeos). A grande desvantagem é que a carga positiva dos AMG, em pH fisiológico, também contribui para a sua toxicidade resultando em efeitos colaterais tais como nefrotoxicidade³ (principal efeito associado à mortalidade dos pacientes), ototoxicidade⁴ e bloqueio muscular (Zembower et al., 1998; Oliveira et al., 2006).

Os AMG são tidos como compostos metabolicamente estáveis, sendo excretados inalterados na urina. Com relação à toxicidade, sua janela terapêutica é considerada elevada após três dias de uso contínuo, sendo necessário o monitoramento das concentrações dos AMG principalmente em pacientes com disfunção renal ou em tratamentos prolongados (Zembower et al., 1998).

O mecanismo de ação destes antibióticos possui como alvo os ribossomos das bactérias. Sendo o ribossomo o responsável pela síntese das cadeias polipeptídicas, os AMG atuam interferindo no funcionamento destes grandes complexos de ribonucleoproteína (Setny e Trylska, 2009). O primeiro passo da ação dos AMG ocorre quando eles se ligam eletrostaticamente a resíduos carregados negativamente na membrana externa de bacilos Gram-negativos, em um processo passivo. A seguir, os AMG difundem-se através das proteínas que constituem a membrana externa e entram no espaço periplasmático (Zembower et al., 1998).

No interior do espaço periplasmático, o transporte dos AMG através da membrana citoplasmática requer energia metabólica através de reações de oxirredução, em um processo dependente do oxigênio (Zembower et al., 1998). Uma vez que o processo de transporte dos AMG através da membrana plasmática é altamente dependente do oxigênio, eles não exercem atividades em microorganismos anaeróbios (Mitscher, 2002). Essa etapa de transporte também

³ **Nefrotoxicidade:** Danos nos rins associados às alterações da filtração glomerular e disfunções tubulares, intersticial e vascular (Oliveira et al., 2006).

⁴ **Ototoxicidade:** Perturbação transitória ou definitiva da função auditiva e/ou vestibular induzida por substâncias de uso terapêutico (Durante-Mangoni, et al., 2009).

pode ser inibida por cátions bivalentes, em meio com pH reduzido e por hiperosmolaridade (Zembower et al., 1998).

A ação anti-inflamatória desta classe de antibióticos se deve ao fato de que, no citoplasma, os antibióticos ligam-se irreversivelmente ao sítio A da região decodificadora na porção 16S da subunidade 30S do ARN ribossômico bacteriano. Desse modo, essas drogas provocam falhas na tradução e seleção de aminoácidos, formando proteínas anormais que são utilizadas para compor a membrana bacteriana, que, por isso, acabam afetando a semipermeabilidade das mesmas com conseqüente morte do micro-organismo (Mitscher, 2002).

Na prática clínica, os AMG apresentam muitas propriedades desejáveis: (i) possuem uma atividade bactericida rápida contra uma gama de agentes patogênicos, (ii) têm custo relativamente baixo, (iii) boa estabilidade química e (iv) raramente estão associados à reações alérgicas. Outra característica importante é sua atividade antimicrobiana sinérgica quando combinados com -lactamas no tratamento de enterococos (provocados por *S. Aureus*) e de certos bacilos Gram-negativos, tais como, *P. aeruginosa* e *klebsiella* ssp. As principais limitações desta classe de antibióticos incluem (i) a elevada relação terapêutica com seus efeitos tóxicos após três dias de uso contínuo (nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio muscular), (ii) pouca penetração em certos fluidos corporais tais como o líquido cefalorraquidiano e bile, (iii) falta de absorção entérica (a natureza catiônica impede a absorção via oral, por isso devem ser administrados por via parenteral), (iv) distribuição biológica afetada pelas condições do hospedeiro e a (v) inatividade contra bactérias anaeróbias (Zembower et al., 1998).

As principais indicações clínicas dos AMG são septicemias, infecções do trato urinário, endocardites, infecções respiratórias, infecções intra-abdominais, meningites em recém-nascidos, infecções oculares, osteomielites e infecções de articulações (ANVISA, 2013).

2.1.1. Tobramicina

A tobramicina (TBR), analito alvo escolhido para desenvolvimento do método analítico apresentado neste trabalho, possui alta atividade antibacteriana

contra cepas de bactérias dos gêneros *Acinetobacter* e *P. aeruginosa*, mas, também possui menor atividade contra *S. marcescens* (Edson e Terrell, 1999). Essa substância é muito utilizada no tratamento de diversas infecções nos olhos e nos anexos oculares, por exemplo, a celulite pré-septal e orbital, tais como a blefarite, conjuntivites, ceratites e endoftalmite. Em 1981 o laboratório Alcon desenvolveu o primeiro colírio a base de TBR (princípio ativo), o Tobrex, a partir de então o uso da TBR em procedimentos oftálmicos tomou grandes proporções (Wilhelmus et al., 1987).

Os efeitos colaterais associados à administração da TBR são a ototoxicidade, a nefrotoxicidade, o bloqueio neuromuscular e a hipersensitividade. Há relatos de distúrbios irreversíveis provocados por tais efeitos, desse modo, o monitoramento de resíduos de TBR em amostras biológicas é de suma importância na investigação dos mecanismos que produzem estes transtornos (Wilhelmus et al., 1987).

A fórmula molecular da TBR na forma de sulfato é $C_{18}H_{37}N_5O_9 \cdot H_2SO_4$ com massa molecular de $467,51 \text{ g mol}^{-1}$, a toxicidade aguda pode ocorrer (ou ser adquirida, por exemplo, no caso das alergias) via a administração oral de quantidades superiores a $10,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, 2013). Os contra-íons dos fármacos com grupos iônicos são de grande importância porque as propriedades físico-químicas, a estabilidade e a biodisponibilidade dos medicamentos dependem das suas formas salinas, por isso, a TBR, bem como os demais AMG, é usualmente sintetizada na forma de sulfato para garantir a solubilidade em meio aquoso. A escolha do sulfato como contra-íon de estabilização se deve a pequena diferença entre o pK_a do sulfato e dos cátions dos AMG, que não ultrapassa três unidades, garantindo a estabilidade do sal comercializado (Sikarra et al., 2012; Carvalho e Heines, 2000; Suzuki et al., 1998).

A literatura reporta diferentes métodos para a determinação de TBR que usam técnicas espectrométricas, cromatográficas ou de imunoenensaio. Uma vez que a estrutura da TBR (Figura 3) não apresenta nenhum grupo cromóforo ou sítios eletroquímicos com atividade relevante que viabilizem a sua determinação direta, na maioria dos métodos descritos faz uso da derivatização química para possibilitar a determinação de TBR a partir de propriedades específicas de seus derivados. Um dos maiores problemas da derivatização química é a utilização de reagentes tóxicos, contrariando os princípios da química verde, além disso, tais

procedimentos demandam um grande tempo de análise e custo elevado por causa do elevado preço de agente derivatizantes.

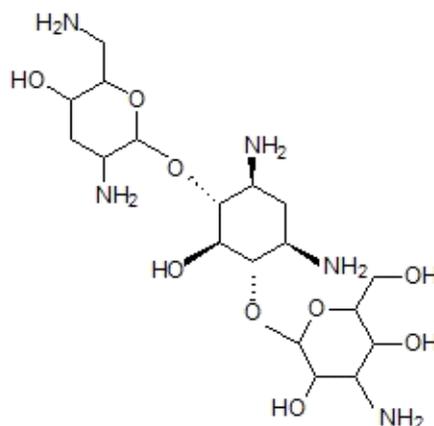


Figura 3: Estrutura molecular da tobramicina (livre de base).

Dentre os métodos espectrométricos descritos na literatura, podem-se destacar o método proposto por Gupta *et al.*, em 1982, no qual a reação de Hantzsh (que utiliza como reagentes a acetilacetona e o formaldeído) é proposta para promover a derivatização de TBR, viabilizando a determinação por comparação direta com uso de padrão único desse analito, uma vez que não se utilizou curva analítica para o método. O limite de detecção (LD) encontrado foi de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($8,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Posteriormente, em 1983, Fujita *et al.* propuseram a determinação indireta de AMG através da derivatização promovida pelo complexo *o*-Hydroxyhydroquinonephthalein-Uranio (VI) apresentando um valor de LD de $4,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Ainda em 1983, Ryan relatou o desenvolvimento de um método colorimétrico para a determinação de TBR fazendo-se uso do 2,4-dinitrofluorobenzeno como agente derivatizante, obtendo-se um valor de LD igual a $2 \mu\text{g por } 10 \text{ mL}$ ($1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Ainda em 1983, Ryan apresentou um método colorimétrico para determinação de TBR, fazendo-se a derivatização do AMG com 2,4-dinitrofluorobenzeno, e monitorando-se o sinal de absorvância do derivado em 415 nm. Um valor de LD de $250 \mu\text{g por } 5 \text{ mL}$ ($1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi reportado. Em todos estes métodos utilizaram-se apenas amostras simuladas no processo de validação.

Em 2013, Omar *et al.* desenvolveram um método espectrofluorimétrico baseado na formação de um complexo de transferência de carga entre o AMG e a safranina em solução tamponada em pH 8. O complexo foi extraído em clorofórmio e a determinação feita em comprimentos de onda de excitação e de emissão iguais a 519 e 557 nm respectivamente, apresentando uma faixa de resposta analítica linear de 5 a 50 pg mL⁻¹ ($1,1 \times 10^{-11}$ a $1,1 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) no caso de TBR. Outros AMG que também determinados por esse método foram: EST (com faixa linear de 4 a 40 pg mL⁻¹ ou de $6,9 \times 10^{-12}$ a $6,9 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹), AMIC (de 5 a 60 pg mL⁻¹ ou de $5,1 \times 10^{-12}$ a $7,7 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹), GENTA (de 4 a 50 pg mL⁻¹ ou de $5,7 \times 10^{-12}$ a $7,1 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹), NEO (de 4 a 50 pg mL⁻¹ ou de $4,4 \times 10^{-12}$ a $5,5 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹) e CANA (de 4 a 50 pg mL⁻¹ ou de $6,9 \times 10^{-12}$ a $8,6 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹). O método foi aplicado em amostras de formulações farmacêuticas e de plasma humano, mas não há relatos a respeito da seletividade do método com relação aos excipientes das formulações e nem à presença de mais de um AMG na mesma amostra.

Em 1981, Barends *et al.*, apresentaram um dos primeiros trabalhos que relata o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de TBR. O agente derivatizante utilizado foi o 2,4-dinitrofluorobenzeno, a fase móvel utilizada foi constituída por água e acetonitrila em meio ácido e a fase estacionária foi uma coluna de C18 (fase reversa). Os autores relataram um valor de LD de 0,5 mg L⁻¹ ($1,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) utilizando amostras simuladas para validação do método. Em 1983, Kabra *et al.* propuseram um outro método utilizando a mesma técnica cuja aplicação foi feita em soro humano. O agente derivatizante utilizado foi o ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico, sendo reportado um valor para o LD de 0,2 mg L⁻¹ ($4,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e percentuais de recuperação de 94 à 99%. Posteriormente, em 1998, Russ *et al.* descreveram método cromatográfico para determinação de TBR em soluções oftálmicas. Esse método é o mesmo indicado pela farmacopeia brasileira para quantificação de TBR em colírios (salvo algumas adaptações no método de derivatização). O 2,4-dinitrofluorobenzeno é o agente derivatizante utilizado para a determinação indireta de TBR por HPLC com detecção por fotometria de absorção (365 nm), o que proporcionou valor de LD de 3 mg mL⁻¹ ($3,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), com recuperação reportada de 100% usando comparação pontual com apenas um padrão analítico, não sendo relatada os percentuais de recuperação em soluções

oftálmicas. Em 2002, Feng *et al.* desenvolveram um método por HPLC para aplicação em amostras de plasma humano usando a derivatização da TBR a partir de piridina e 1-naftilisocianato. A detecção de TBR foi feita por fotometria de absorção (em 230 nm) proporcionando um valor de LD de $0,23 \text{ mg L}^{-1}$ ($4,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e percentuais de recuperação maiores que 99%.

Em 2002, Kaale *et al.* determinaram TBR com eletroforese capilar utilizando o ácido *o*-ftalaldeído (OPA) como agente derivatizante para formação de produto capaz de absorver radiação no UV-vis. Obteve-se um LD de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Recentemente, em 2011, He *et al.* apresentaram um método para determinação de TBR em solo utilizando HPLC e extração do analito da amostra assistida por ultrassom. Eles utilizaram como agente derivatizante o 4-cloro-3,5-dinitrobenzenotrifluoro, relatando um valor de LD de $0,02 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ($4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e percentuais de recuperação de 78 a 91%.

Dentre os métodos propostos através de imunoenaios podem-se destacar o método desenvolvido por Gilbert *et al.*, em 1986, no qual determina-se TBR em tecidos renais através de imunoenaios com medição de fluorescência. O método apresentou LD de $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Em 1987, Lewis *et al.* descreveram um imunoenasiao enzimático para determinação de TBR que proporcionou valor de LD de 1 mg L^{-1} ($2,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Em 1996, Touw *et al.* utilizaram um imunoenasiao com detecção de fluorescência polarizada para determinação de TBR em soro sanguíneo de humanos, relatando um valor de LD de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Posteriormente, em 1998, Sachetelli *et al.* utilizaram a técnica universal ELISA para determinação de TBR e conseguiram um valor de LD de $0,025 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)¹. O mesmo grupo de pesquisa publicou um segundo artigo, em 1996 (Beulac *et al.*, 1996), relatando o uso da mesma abordagem para a determinação de TBR em tecidos de órgãos de humanos. Em ambos os artigos, os autores utilizaram um adaptação do método de Barends *et al.* (1981) como método comparativo para validação do imunoenasiao.

Abordagens analíticas para a determinação de AMG, incluindo TBR, com uso de AuNPs já reportados na literatura serão descritos e discutidos mais a frente nessa introdução.

2.1.2.

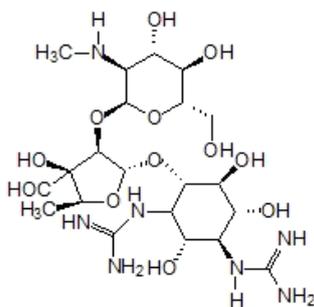
Uma breve descrição de alguns AMG importantes

2.1.2.1.

Estreptomicina

A estreptomicina (EST) foi inicialmente utilizada contra a praga da tularemia⁵. Em associação com outros agentes antimicrobianos, ela pode ser administrada no tratamento de brucelose, tuberculose e endocardite (Edson e Terrell, 1999).

A fórmula molecular da EST na forma de sulfato é $C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1,5 H_2SO_4$ (estrutura indicada na Figura 4), sua massa molecular é $728,69 \text{ g mol}^{-1}$, e sua toxicidade aguda ocorre (ou pode ser adquirida) em humanos pela administração de quantidades superiores a 430 mg kg^{-1} (Sigma-Aldrich, 2013). A estabilidade da EST foi estudada em 1946 por Regna *et al.* que relatou que as suas soluções são estáveis por até 60 dias em uma faixa de pH de 3 a 7 (em temperaturas entre $7 \text{ }^\circ\text{C}$ e $28 \text{ }^\circ\text{C}$), entretanto, há uma tendência de decomposição com o aumento da temperatura. Os autores observaram também que, em meio ácido (pH 2,0), a constante de velocidade de inativação para estreptomicina é de $4,3 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ à 28°C e dez vezes maior a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.



⁵ Tularemia: também conhecida como “febre do coelho”, é uma infecção causada pelo microorganismo *Francisella tularensis*. O contágio em humanos ocorre através da ingestão ou contato com animais infectados. Existem quatro tipos de tularemia: (i) tipo ulceroganglionar- é o tipo mais comum cujos sintomas são úlceras nas mãos, inchando os dedos e os gânglios linfáticos que estão do mesmo lado da infecção; (ii) tipo oculoganglionar- infecta o olho causando-lhe vermelhidão e edema, além de tumefacção dos gânglios linfáticos; (iii) tipo ganglionar- os gânglios linfáticos incham, mas não se formam úlceras sugerindo a ingestão das bactérias; (iv) tipo tifóide- produz febre muito alta, dor abdominal e esgotamento. Se a tularemia chega ao pulmão, pode-se verificar uma pneumonia (Manual Merck, 2013).

Figura 4: Estrutura molecular da estreptomina (livre de base).

2.1.2.2. Neomicina

A neomicina (NEO) é um antibiótico eficaz contra um amplo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo usado em muitos medicamentos tópicos, na forma de cremes, pomadas e colírios tanto na medicina humana quanto veterinária. A NEO é fabricada a partir de um complexo de substâncias fermentadas pela *Streptomyces fradie* (Stypulkowska *et al.*, 2013). Devido às aplicações veterinárias de NEO e ao seu potencial ototóxico e nefrotóxico à saúde humana, a European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA) estabeleceu limites máximos de NEO em alimentos ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$ em carnes e leite) (Chen *et al.*, 2010).

A fórmula molecular da NEO na forma de sulfato é $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{13} \cdot 3\text{H}_2\text{SO}_4$ (estrutura indicada na Figura 5) e sua massa molecular é $908,88 \text{ g mol}^{-1}$. A toxicidade aguda ocorre (ou pode ser adquirida) em humanos pela administração de quantidades superiores a 430 mg kg^{-1} (Sigma-Aldrich, 2013). O sulfato de NEO é constituído por uma mistura dos esteroisômeros neomicina B e neomicina C, cuja diferença está na inversão de configuração do grupo R indicado na Figura 5.

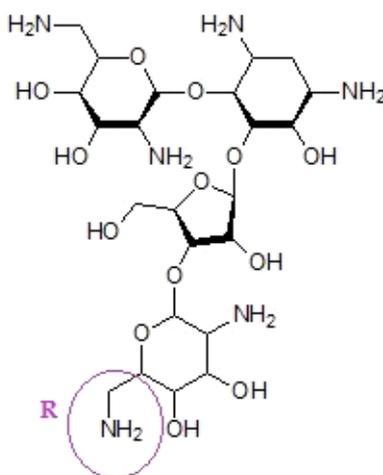


Figura 5: Estrutura molecular da neomicina (livre de base).

2.1.2.3. Gentamicina

A gentamicina (GENTA) foi isolada em 1963 por Weinstein *et al.* a partir de duas espécies de bactérias pertencente ao gênero *Micromonospora*. A GENTA é um antibiótico utilizado amplamente no tratamento de infecções hospitalares provocados por *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* que possuem baixa taxa de resistência à sua administração. Usualmente esse AMG pode ser usado no tratamento de infecções do trato urinário ou tularemia. Em sinergismos com outros antibióticos, pode ser administrada no tratamento de endocardites, bruceloses, otites, dermatites, queratoconjuntivites entre outras moléstias (Edson e Terrell, 1999). Ela também possui larga aplicação no uso veterinário podendo-se destacar o uso para o tratamento de mastites em bovinos, sendo prevista a contaminação do leite nos animais sob a administração de GENTA (Tan *et al.*, 2009).

A GENTA normalmente é comercializada sob a forma de uma mistura de isômeros, sua fórmula molecular geral é $C_{19-21}H_{39-43}N_5O_7 \cdot 2,5 H_2SO_4$ (estrutura indicada na Figura 2), e a massa molar que varia de 694 à 723 $g\ mol^{-1}$. A sua toxicidade oral é alcançada pela ingestão de quantidades superiores 5 $mg\ kg^{-1}$.

2.1.2.4. Amicacina

A amicacina (AMIC) possui grande eficácia no tratamento de infecções causadas por bactérias do gênero *Nocardia asteroides*, *Mycobacterium avium-intracellulare* e certas espécies de mycobactérias de crescimento rápido tais como *M. chelonae* e *M. fortuitum*. Usualmente, os tratamentos clínicos apenas usam AMIC quando não é possível a administração de GENTA, pois o alto custo da AMIC dificulta seu acesso aos pacientes (Edson e Terrell, 1999). A AMIC possui o maior espectro de ação em comparação com as demais substâncias pertencente à classe dos AMG, sendo útil na terapia de micobacterioses e em casos específicos de infecções por *M. tuberculosis* (ANVISA, 2013).

A AMIC é um antibiótico semisintético preparado a partir da espécie *S. aureus*, em presença de adenosina trifosfato (ATP), sendo obtida a partir da acilação da canamicina A com o ácido L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutírico (Toda *et*

al., 1978; El-Attug *et al.*, 2012). A fórmula molecular da AMIC, na forma de sulfato, é $C_{22}H_{45}N_5O_{13} \cdot 2 H_2SO_4$ (estrutura indicada na Figura 6) e sua massa molecular é $781,76 \text{ g mol}^{-1}$. A toxicidade aguda é alcançada na administração de dosagens superiores a $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, 2013).

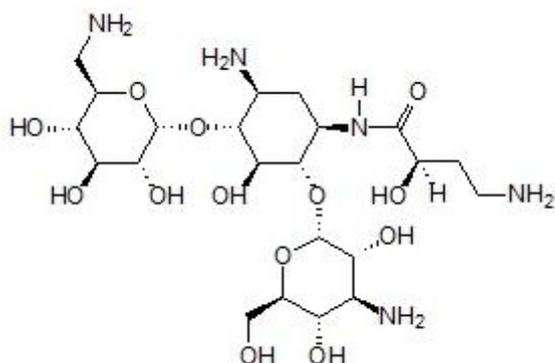


Figura 6: Estrutura molecular da amicacina (livre de base).

2.1.2.5. Canamicina

A canamicina (CANA) é um aminoglicosídeo cujo efeito antibiótico é utilizado para tratar uma grande variedade de infecções. Como outros aminoglicosídeos, a CANA apresenta uma margem de segurança relativamente estreita, podendo provocar muitos efeitos colaterais, tais como perda de audição, toxicidade para os rins e reações alérgicas à droga. Além disso, a quantidade residual de CANA encontrada em produtos de gênero alimentício pode conduzir à resistência ao antibiótico, colocando em risco o consumidor. Portanto, métodos sensíveis para detecção do resíduo de CANA é de fundamental importância para o diagnóstico clínico e para o controle de segurança alimentar (Zhu e colaboradores, 2012).

A CANA é produzida a partir da cepa de *Streptomyces Kanamyceticus*, sua fórmula molecular na forma de sulfato é $C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$ e a massa molecular é $582,58 \text{ g mol}^{-1}$. A toxicidade aguda é estabelecida para administração de dosagens superiores a $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, 2013; Chen *et al.*, 2013). A estrutura molecular da CANA encontra-se representada na Figura 7.

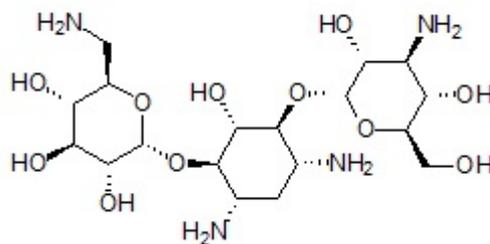


Figura 7: Estrutura molecular da canamicina (livre de base).

2.1.3.

Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de AMG

Diversos são os métodos analíticos que a literatura reporta para a determinação de AMG. Muitos métodos espectrofotométricos podem ser encontrados para os AMG, todos eles fazem uso da derivatização química para viabilizar a determinação indireta desses antibióticos com variação das faixas lineares da ordem de 10^{-3} a 10^{-7} mol L⁻¹ (Eisenman e Bricker, 1949; Emery e Walker, 1949; Stjohn *et al.*, 1951; Shaw e Fortune, 1962; Duda, 1973; Amin e Issa, 2009; Wang *et al.*, 1993; Al-Majed *et al.*, 2003).

Métodos cromatográficos também são relatados com o pré-tratamento das amostras por derivatização química, utilizando detecção por fotometria de absorção molecular no UV-vis, espectrometria de massas, espectrofotometria de fluorescência molecular, detecção por espalhamento de ressonância Rayleigh e detecção de quimioluminescência. É usual encontrar descrito no procedimento destes métodos o uso de C18 como fase estacionária. As faixas lineares das respostas analíticas descritas variam da ordem de 10^{-8} a 10^{-5} mol L⁻¹. (Kubo *et al.*, 1987; Stypulkowska *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2010; El-Attug *et al.*, 2012; Serrano e Silva, 2006).

É válido ainda destacar os métodos para separação de AMG que são comercializados como mistura de isômeros (NEO e GENTA) ou apresentam isômeros que são facilmente isolados e vendidos separadamente, em virtude da fácil separação dos mesmos no ato da síntese (EST). Podem-se citar, como exemplo, um dos primeiros métodos cromatográficos para a determinação de EST A, EST B e dihidroestreptomicina relatado por Whall (1981), utilizando coluna de fase reversa (C18), com fase móvel isocrática composta por acetonitrila, solução aquosa de hexaneosulfonato de sódio ($0,02$ mol L⁻¹) e fosfato de sódio tribásico

($0,025 \text{ mol L}^{-1}$) usando detecção fotométrica em 195 nm. A mesma composição da fase móvel foi utilizada nas reações de derivatização e no preparo dos padrões. Relatou-se uma faixa linear de $3,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $3,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Também é válido mencionar um dos trabalhos pioneiros para determinação de neomicina B e neomicina C, feito por Brooks *et al.* (1956), no qual se utilizou o furan-2-carboxialdeído para promover a derivatização. A determinação de NEO B e NEO C foi feita com comparação pontual com padrão derivatizado utilizando-se um espectrofotômetro com detecção no UV e um polarímetro. Não há informações a respeito do LD ou da faixa de resposta do método.

Métodos voltamétricos também estão descritos, observando-se algumas peculiaridades tais como: (i) o uso do eletrodo gotejante de mercúrio (Wang e Mahmoud, 1986), (ii) a determinação através da interface de duas soluções eletrolíticas imiscíveis, ITIES (Vladimirova *et al.*, 2013), (iii) o uso de eletrodos íon-seletivos (Kulapina *et al.*, 2005). As faixas lineares de resposta variam da ordem de 10^{-12} a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A eletroforese capilar também é uma técnica comumente mencionada para o desenvolvimento dessas técnicas analíticas (Hidobro *et al.*, 2009; Flurer e Wolnik 1994).

Também são frequentes as determinações por imunoenaios, que empregam variadas abordagens e técnicas de detecção, sendo isto peculiar de cada método. Os valores de LD variam da ordem de 10^{-12} a $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, com aplicações em amostras de derivados alimentícios e de fluidos biológicos (Chen *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2012, Khaldeeva *et al.*, 2002; Sánchez-Martinez *et al.*, 2009).

Métodos desenvolvidos por técnicas mais recentes também podem ser mencionados, como por exemplo, o artigo publicado em 2013 por Du *et al.* que relata um método para a determinação de EST por quimioluminescência na presença de N-bromossuccinimida e eosina em meio alcalino. Valores de LD de $1,10 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,37 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foram reportados. Pode-se destacar também o método desenvolvido em 2011 por Sarraguça *et al.* no qual relata-se um método analítico para determinação de NEO por espectrometria no infravermelho próximo (NIRS), sem derivatização prévia dos padrões, alcançando-se uma faixa linear de $5,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $3,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

2.2. Nanomateriais

Toda matéria possui potencial para ser considerado um material (definido como uma substância que possui alguma utilidade) a partir do momento em que suas propriedades lhe conferem alguma função específica. Uma vez que a aplicação, estrutura, propriedades e preparação dos materiais estão diretamente relacionadas às suas propriedades químicas. A química dos materiais é um ramo emergente devido a grande importância política, econômica e social decorrente do desenvolvimento de novas tecnologias (Zarbin, 2007).

O limiar entre o ramo denominado “ciências dos materiais” e a “química de materiais” estabeleceu-se entre as décadas de 1980 e 1990, quando a *American Chemical Society* e a *Royal Society of Chemistry* lançaram periódicos específicos nessa área. Desde então, essa linha de pesquisa, que é relativamente recente, tem arrematado grandes proporções de investimento econômico e humano na pesquisa pura e aplicada. Diante deste panorama, que requer conhecimentos de várias áreas, tem-se observado a diminuição da fragmentação e da compartimentalização do conhecimento em áreas, subáreas e disciplinas, de forma a contemplar essas novas linhas de atuação em pesquisa multidisciplinar, que por sua vez, são compartimentadas com base em outros critérios. Nesse contexto, o estudo dos nanomateriais surge a partir da diferenciação entre as propriedades dos materiais em função das suas dimensões (Zarbin, 2007).

Considerando-se os processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem na natureza, é possível perceber a presença da nanotecnologia em períodos remotos da história da humanidade. Os chineses, embora sem ter consciência disso, já aplicavam a nanotecnologia ao empregarem nanopartículas de carvão em solução aquosa para produzir a tinta nanquim. Na Europa, o colorido dos vitrais das igrejas medievais era o resultado da formulação do vidro com nanopartículas de ouro (Ferreira e Rangel, 2009).

As Nanotecnologias e Nanociências são aplicáveis a uma vasta área interdisciplinar do conhecimento que abrange áreas tais como química, física, biologia, farmácia, etc. Observa-se o crescimento das pesquisas que se dedicam em conhecer e dominam as relações de dependência entre as propriedades dos materiais e suas dimensões. Dispositivos e sistemas têm sido desenvolvidos com

novas propriedades e funções a partir da relação estabelecida entre o tamanho das partículas (Trindade, 2008) viabilizando a utilização de processos nos quais é imprescindível a distinção entre sistemas nano (1-100 nm) e micro.

O termo nanotecnologia foi introduzido, em 1974, pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi, para denominar uma nova tecnologia que ia além do controle de materiais e da engenharia em microescala (Casanova, 2010). Entretanto, o conceito estabelecido por Eric Drexler possui maior abrangência para as novas aplicações; ele se refere à nanotecnologia como sendo a metodologia de processo envolvendo a manipulação átomo a átomo (Drexler, 1981). Nesse contexto, os nanomateriais podem ser definidos como materiais que possuem ao menos uma dimensão na faixa nanométrica, compreendidas na faixa de tamanho crítico capaz de alterar alguma de suas propriedades com relação ao material massivo (Casanova, 2010).

As novas propriedades físico-químicas que são observadas na escala dos nanomateriais estão associadas aos efeitos quânticos e de superfície que ocorrem nesses sistemas. A nanoquímica, então, corresponde à utilização de todas as ferramentas da química para preparar, caracterizar e compreender as propriedades de nanopartículas com diferentes tamanhos, formas, composições e estruturas, com possibilidade de um rigoroso controle sobre cada uma dessas variáveis (Trindade, 2008). Pode-se adicionar a isso, a utilização das propriedades peculiares desses materiais para se obter alguma vantagem em relação à informação química.

O conceito de nanoquímica tem sido aliado aos conceitos de química verde; o modelo em larga escala começa a ser revisto na medida em que a nanoquímica propõe processos mais limpos, com maior eficiência energética, que empreguem menores quantidades de matéria e com isso produzindo menos quantidade de resíduos e, possivelmente, com o emprego de novas fontes renováveis (Casanova, 2010).

É importante definir alguns termos comuns, encontrados na literatura, utilizados para materiais nanoestruturados:

- i) Cluster: conjunto de unidades (átomos ou moléculas reativas) com, no máximo, 50 unidades. Clusters protegidos por monocamadas (MPC) possuem essas unidades envolvidas por ligantes conferindo às espécies maior estabilidade, solubilidade e possibilidade de isolamento em solução.

- ii) Colóide: dispersão estável contendo partículas na faixa de 1-1000 nm.
- iii) Nanopartícula: partícula sólida com tamanho variável entre 1-1000 nm.
- iv) Nanocristal: Partícula sólida que é um monocristal com dimensões nanométricas.
- v) Pontos quânticos (Quantum dots): partícula semicondutora que apresenta um efeito de quantização de tamanho em pelo menos uma direção (Shipway e Willner, 2001).

Existe hoje uma produção científica significativa no Brasil, nos temas de manipulação de nano-objetos, nanoeletrônica, nanomagnetismo, nanoquímica e nanobiotecnologia, incluindo os nanofármacos, a nanocatálise e as estruturas nanopoliméricas. Também há uma produção tecnológica representada por patentes e há projetos sendo executados por empresas, isoladamente ou em cooperação com universidades ou institutos de pesquisa (Galembeck et al., 2007).

2.2.1. Nanopartículas

A ocorrência natural de nanoestruturas é inerente aos sistemas biológicos que apresentam uma organização sistemática de estruturas e processos a uma escala nanométrica. No ramo da mineralogia também podem ser encontrados nanocristais formados naturalmente há milhares de anos (Martins e Trindade, 2012). A compreensão das propriedades em nanodimensões permite uma associação entre os sistemas nanométricos pré-existentes na natureza e os novos nanomateriais produzidos, permitindo vislumbrar aplicações de suma importância. Em todas as áreas da ciência, o desenvolvimento de tecnologias associadas ao uso de nanopartículas é um assunto emergente e de grande interesse (Assis *et al.*, 2012). Sendo este um assunto de grande amplitude, é necessário ater-se aos aspectos relevantes que impactam no escopo deste trabalho tais como as nanopartículas metálicas e semicondutoras.

As nanopartículas metálicas e semicondutoras possuem propriedades físicas e químicas dependentes do seu tamanho e forma. A redução do tamanho às dimensões nanométricas produzem propriedades intermediárias entre o bulk (sólido massivo) e o molecular, assim, as propriedades eletrônicas são alteradas e há um grande aumento da área superficial (Otubo, 1999). A redução do tamanho das partículas faz com que os fenômenos deixem de ser compreendidos com

amplitude pela física clássica tornando necessário recorrer à física quântica: 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) assumem maior importância. Para se ter uma idéia da mudança de paradigma na escala nanométrica, a força de atração eletrostática entre dois prótons é cerca de 1036 vezes maior que a força gravitacional, dessa maneira, os efeitos quânticos assumem uma importância maior do que os vistos pela física clássica (Neto, 2009).

As nanopartículas são termodinamicamente instáveis têm a tendência natural de se aglomerar, sendo um desafio o preparo de nanomateriais estáveis e monodispersos que possam ser manipulados sem a perda de suas propriedades (Casanova, 2010). Dentre os principais tipos de “novos materiais” produzidos a partir de nanopartículas, duas classes principais podem ser destacadas, sendo subdivididas de acordo com suas propriedades, são elas as nanopartículas de semicondutores (pontos quânticos) e nanopartículas metálicas.

2.2.1.1. Nanopartículas de ouro

As nanopartículas anisotrópicas de metais nobres (ouro e prata) possuem propriedades ópticas peculiares que fundamentam inúmeras aplicações. Tais aplicações baseiam-se em três características fundamentais da resposta óptica de nanoestruturas metálicas: (i) a alta sensibilidade a mudanças na vizinhança química, (ii) a localização dos campos eletromagnéticos da radiação incidente abaixo do limite de difração e (iii) a subsequente geração de campos próximos de alta intensidade (Castilho *et al.*, 2011). A determinação de uma estrutura estável para as nanopartículas é de fundamental importância para o entendimento das propriedades físico-químicas destas e para futuras aplicações (Alencar, 2012).

A primeira síntese de nanopartículas metálicas foi registrada em 1857 com o trabalho pioneiro de Michael Faraday. Ainda sob os pilares na física clássica, Faraday utilizou a teoria ondulatória da luz para explicar as transições de cores ao modificar condições de temperatura e pressão na síntese de colóides formados a partir diferentes metais (ouro, cobre, ferro, chumbo, zinco, paládio, platina,

alumínio, ródio e prata), entretanto, ele encontrou singularidades específicas relacionadas aos colóides de ouro e prata e a transmissão de luz nos mesmos (Faraday, 1857).

A síntese de nanopartículas em meio coloidal é a abordagem mais comum, pois possui custos mais baixos em relação a outros métodos de produção de nanopartículas metálicas (tais como litografia de elétrons e crescimento epitaxial). Além disso, essa abordagem apresenta a vantagem do controle das propriedades e da possibilidade de manipulação das nanopartículas após a síntese (Zanchet, 2000; Rocha, 2008). Apesar de existirem diferentes métodos para a síntese de nanopartículas coloidais, em geral, todos eles baseiam-se em quatro componentes: meio (solvente utilizado na reação), precursor (normalmente, sais de metais), agente redutor (que reduzirá o íon ao estado metálico) e estabilizante (utilizado para recobrir a superfície das nanopartículas). A estabilização das dispersões coloidais pode ser eletrostática (utilizando-se como princípio a repulsão eletrostática entre as cargas nas superfícies das nanopartículas) ou estérica quando se utiliza moléculas longas para impedir a aproximação e a aglomeração das nanopartículas (Rocha, 2008).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) são alvo da curiosidade humana desde a época dos alquimistas medievais, havendo vários exemplos de sua utilização com motivações decorativas ou medicinais. Um famoso exemplo da utilização de AuNPs é a Taça de Lycurgus, datada do período romano (século IV d.C), fabricada em matriz vítrea, possui coloração dependente do ângulo de incidência da luz visível sobre a sua superfície. Exibe uma cor verde quando a luz é refletida pela superfície da taça, mas, torna-se avermelhada quando a luz é transmitida através da taça. Tal efeito óptico deve-se às AuNPs e às nanopartículas de prata (AgNPs) que se encontram dispersas no vidro do cálice, originando um vidro dicróico (Ferreira e Rangel, 2009; Martins e Trindade, 2012).

De acordo com Naveenraj *et al.* (2013), as AuNPs podem ser descritas como uma das nanopartículas de metal nobre cujo efeito ressonante plasmônico permite uma oscilação coletiva coerente de elétrons livres, provocando intensa absorção de luz. Mammen *et al.* (1998) destacaram que as características de superfície, a geometria controlável, a rigidez e a estabilidade química observadas nas AuNPs as habilitam para diversas aplicações especiais incluindo estudos termodinâmicos (por exemplo, a avaliação da contribuição de entropia

conformacional em ligações polivalentes). As AuNPs são capazes de estabelecer interações com diversos grupos funcionais, em especial o grupo tiol. Nesse caso, observou-se que tais interações dependiam da geometria do composto que continha o grupo tiol e da quantidade de grupos tióis presentes no mesmo (Bresee *et al.*, 2010).

O estudo das propriedades das AuNPs é um assunto vasto que associa muitas teorias. Quando presente em um sistema coloidal, alguns aspectos importantes dos modelos definidos para sistemas dessa natureza devem ser ressaltados, levando em consideração a clássica química dos coloides. Deste modo, pode-se compreender melhor as teorias mais recentes que explicam as propriedades das AuNPs, como o efeito de superfície plasmônica ressonante e as implicações deste efeito, em especial, na magnitude do coeficiente de extinção desses sistemas.

2.2.1.2. Características das dispersões coloidais

Uma dispersão coloidal pode ser definida como um sistema de partículas submicroscópicas de uma fase dispersa em outra, cujas partículas possuem dimensões que variam de 1 a 1000 nm. Em sistemas dessa natureza, duas forças principais são importantes, a força gravitacional (que tende a decantar as partículas) e a força viscosa, que relaciona a resistência ao movimento das partículas, provocando um movimento aleatório destas, chamado de movimento Browniano (Soares, 2009).

O processo de formação dos sistemas coloidais de ouro depende de quatro componentes principais: (i) o meio (fase líquida), (ii) o precursor (fonte do ouro), (iii) o agente redutor e (iv) o agente estabilizante (em geral um ligante orgânico) (Rocha, 2008).

O mecanismo de nucleação e crescimento das AuNPs varia de acordo com o tipo de síntese, entretanto, uma visão global desse mecanismo foi proposta por La Mer (1952), baseando-se nas considerações prévias de Ostwald's sobre processos de nucleação e nos conceitos de Gibb's sobre as contribuições termodinâmicas e os estados metaestáveis.

Segundo este mecanismo, a nucleação ocorre a partir dos monômeros presentes na solução (no caso íons de ouro ou complexos destes que formarão as nanopartículas). À medida que ocorre a nucleação, a concentração de monômeros disponíveis diminui até atingir a concentração crítica de nucleação, a partir desse ponto, ocorre o crescimento dos núcleos pré-formados pela incorporação dos monômeros (etapa de crescimento). O tamanho médio final das nanopartículas pode ser controlado tanto pelo tipo do ligante quanto pela variação das proporções do precursor e do ligante utilizados. Elevadas quantidades de ligante (que se estabelece na superfície) em relação ao precursor (que influencia no volume) geram grande área superficial estabilizada, resultando na formação de nanopartículas de pequenas dimensões. No caso de se almejar nanopartículas maiores, deve-se aumentar a concentração do precursor no meio. Também é válido ressaltar que a magnitude de interação entre o ligante e o metal também influencia no tamanho das nanopartículas, já que ligantes que interagem fortemente com o precursor tendem a formar partículas menores por dificultar a incorporação dos monômeros (Rocha, 2008; La Mer, 1952).

O controle da distribuição de tamanho das nanopartículas depende da separação temporal das etapas de nucleação e crescimento, assim sendo, a nucleação homogênea é imprescindível para garantir a homogeneidade das nanopartículas e com isso a homogeneidade das propriedades do sistema coloidal. Usualmente, obtêm-se uma nucleação homogênea ao se promover uma redução rápida com um agente redutor forte e uso de agitação vigorosa (Rocha, 2008; La Mer, 1952).

A possibilidade de aglomeração das nanopartículas é decorrente das forças de Van Der Waals atuante entre elas. A aglomeração faz com que a força da gravidade passe a ser dominante, forçando a decantação do material. Para evitar a decantação das partículas, faz-se necessário contrabalancear a força de Van der Waals com alguma outra força dispersiva que impeça a formação de aglomerados (Soares, 2009).

As dispersões coloidais não são termodinamicamente estáveis e tanto a natureza quanto a magnitude da energia de superfície são determinadas pelas propriedades físico-químicas das partículas e dos solventes (meio onde elas estão dispersas). O movimento browniano no meio provoca frequentes colisões entre as partículas, desse modo, a estabilidade bem como outras características desses

sistemas são também determinadas pela natureza da interação entre as partículas durante as colisões. As interações em um sistema coloidal podem ser divididas entre as do tipo partícula-partícula (as mais importantes para definição das propriedades da dispersão) e as do tipo partícula-solvente. Em geral, seis tipos de forças de interação podem existir em suspensões coloidais: (i) dupla camada elétrica, (ii) força de Van der Waals, (iii) interação estérica, (iv) interação por hidratação/solvatação, (v) ligações poliméricas e (vi) interações hidrofóbicas. Na Tabela 1 é apresentado um resumo a respeito destas interações, a natureza e a fonte das mesmas (Somasundaran *et al.*, 2002).

Tabela 1: Resumo das forças entre duas partículas idênticas dispersas em dispersões coloidais (Fonte: Somasundaran *et al.*, 2002).

Força	Natureza	Fonte
Dupla camada elétrica	Repulsiva	Adsorção dos íons nas superfícies das estruturas
Van der Waals	Usualmente, atrativa	Presença universal
Interação estérica	Atrativa ou Repulsiva	Induzida pelas espécies adsorvidas nas superfícies das partículas
Energia de hidratação/solvatação	Atrativa/repulsiva	Hidratação ou solvatação do adsorvente ou adsorvato
Pontes poliméricas	Atrativa	Induzida pela adsorção em longas cadeias poliméricas
Interação hidrofóbica	Atrativa	Intrínseca ou induzida por adsorção

A força de Van der Waals (a força atrativa universal) é de curto-alcance e atua por meio de dipolos temporários que ocorrem em algumas moléculas induzindo a formação de outros dipolos nas moléculas vizinhas. No caso das dispersões coloidais, essas forças atuam por causa de polarizações magnéticas e elétricas que ocorrem naturalmente, podendo provocar a dispersão das partículas mantendo uma separação média entre as mesmas (Somasundaran *et al.*, 2002).

Outra interação importante é a do tipo hidrofóbica que podem ocorrer naturalmente ou podem ser induzidas por espécies hidrofóbicas adsorvidas nas partículas. Uma vez que as espécies hidrofóbicas encontram-se adsorvidas na superfície da partícula, se o solvente for polar, as moléculas deste encontrar-se-ão entre as camadas hidrofóbicas, desse modo há uma perda de energia rotacional e translacional devido ao contato com as espécies hifrofóbicas. Assim sendo, as

espécies hidrofóbicas tendem a estar mais próximas umas das outras ao passo que as moléculas hidrofílicas do solvente tendem a um maior contato entre si. Ou seja, todo o processo de aglomeração é regido pelas afinidades dadas pelas interações intramoleculares das espécies que compõem o sistema. Este é um tipo de interação é de alcance muito maior do que o das interações de Van der Waals (Somasundaran *et al.*, 2002).

As forças estéricas surgem a partir da sobreposição de camadas de ligantes adsorvidas nas partículas, e podem ter natureza atrativa ou repulsiva, dependendo do grau de interação que estas camadas têm com o solvente. Se a adsorção do solvente sobre as camadas for mínima há uma tendência de que as camadas de duas partículas se interpenetrem promovendo a agregação das mesmas, sendo válido o mesmo raciocínio para a situação inversa. No caso de partículas que contém moléculas de cadeias longas adsorvidas em suas superfícies, a aproximação provoca a diminuição da entropia por adsorção molecular o que acarreta na dessorção dessas moléculas (para induzir o aumento de entropia no sistema) e o aumento da energia interfacial, assim, um trabalho adicional é necessário para manter as partículas juntas. Essa pode ser considerada uma manifestação de força repulsiva. Em contrapartida, a presença de polímeros de cadeias longas pode gerar pontes entre as partículas, em especial, quando as partículas não estão totalmente recobertas. Isso gera a aglomeração e floculação das partículas, o que constitui uma força atrativa (Somasundaran *et al.*, 2002).

As interações decorrentes da hidratação e da solvatação, bem como os efeitos que relacionam a mudança de fase entre as camadas de duas superfícies, são interações de curto-alcance que influenciam na ordem de empacotamento das moléculas de interface. A teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) relaciona a interação entre os corpos e o meio, sendo caracterizada por propriedades dielétricas quando não há separação de fases. Entretanto, esta teoria não é válida para pequenas distâncias, quando a ordem das propriedades do sistema se diferencia do bulk. Para pequenas distâncias, as forças que atuam entre a separação de fases ou transição de fases entre o filme líquido e as superfícies incluem condensação por capilaridade, cavitação e forças que atuam nas superfícies induzindo, nas moléculas do solvente, importantes contribuições para estabilização das dispersões. A repulsão entre as partículas é devido à tendência dos íons em desfazer ligação com o solvente (camada de hidratação ou

solvatação) para que possam aproximar-se uns dos outros, sendo este um processo termodinamicamente desfavorável. Entretanto, o efeito de hidratação em sistemas coloidais surge devido ao significativo grau de atração entre duas partículas hidrofóbicas (Somasundaran *et al.*, 2002).

Muitas substâncias, ao entrarem em contato com um meio de polaridade média, adquirem cargas elétricas na superfície, resultante de um somatório de efeitos cujos três principais são:

- A solvatação e dissolução preferencial na superfície das espécies, seguidas da dissociação de algumas dessas espécies;
- Grau de imperfeições na superfície dos sólidos;
- Adsorção de íons ou impurezas na interface sólido-líquido: as cargas adsorvidas na superfície influenciam na distribuição espacial dos íons e moléculas do sistema: partículas de cargas opostas se atraem e partículas de mesma carga se repelem. O movimento térmico dessas partículas resulta na formação de uma dupla camada elétrica difusa (Figura 8) que consiste na superfície carregada, neutralizada por contra-íons, possuindo co-íons adicionais distribuídos de maneira difusa. (Somasundaran *et al.*, 2002).

Na ausência de significativa ionização e em meios de baixa constante dielétrica esses três efeitos são improváveis. Na ausência de surfactantes adsorvidos, a dissociação na superfície dos grupos aparece, de maneira geral, por um mecanismo no qual o íon é responsável pela transferência de cargas entre o solvente e a partícula protonada. A direção de transferência protônica depende do grau de acidez ou basicidade do solvente e das partículas. A carga nas partículas é resultante da adsorção de surfactantes iônicos e dependerá do grau de adsorção do surfactante catiônico e aniônico. Um mecanismo provável foi elucidado por Fowkes no qual o surfactante atua como par iônico em uma reação de troca protônica cuja direção depende da relação de acidez e basicidade entre o surfactante e a superfície. A etapa final é um processo de geração de cargas com dessorção de espécies do surfatantes (protonados ou desprotonados) gerando cargas na interface, conforme indica a Figura 9 (Somasundaran *et al.*, 2002).

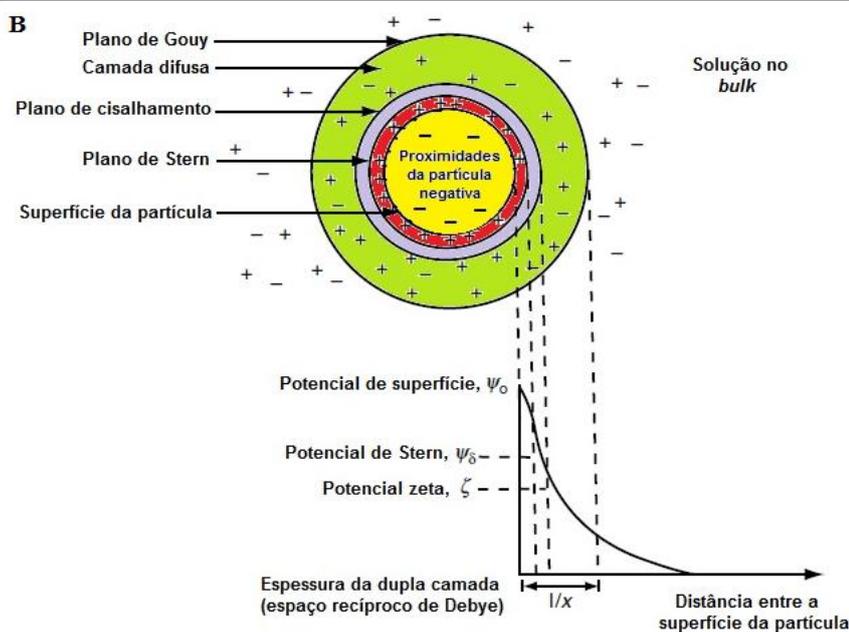
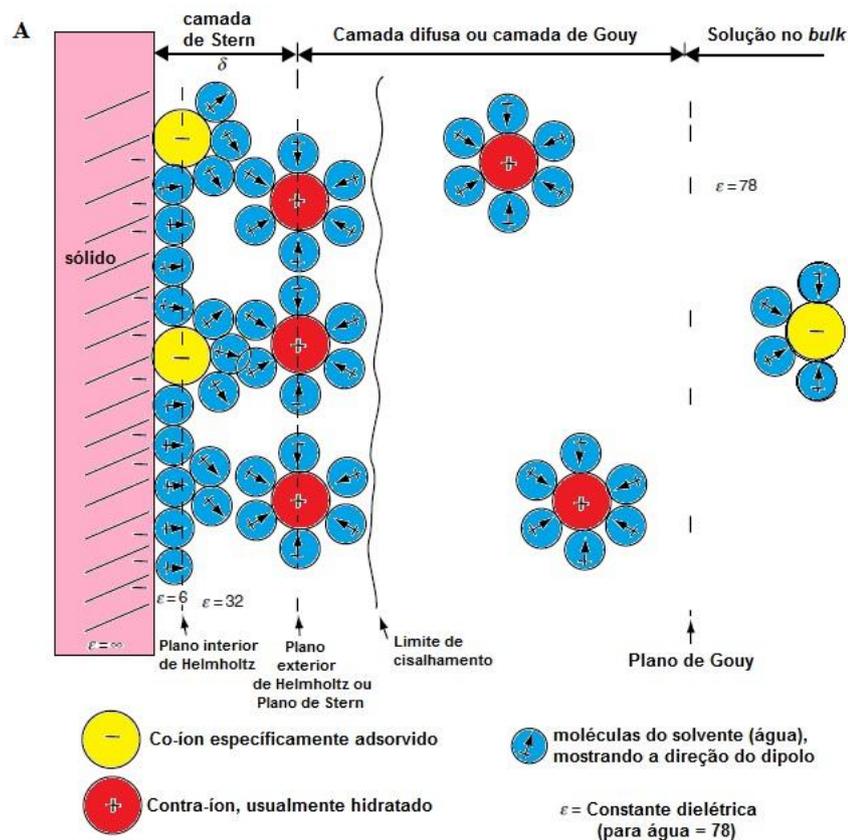


Figura 8: A) Representação esquemática da dupla camada elétrica e da vizinhança em interfaces sólido-líquido. B) Distribuição do potencial elétrico na região da dupla camada em torno de uma partícula carregada, mostrando o potencial zeta e o espaço recíproco de Debye (adaptado de Somasundaran et al., 2002).

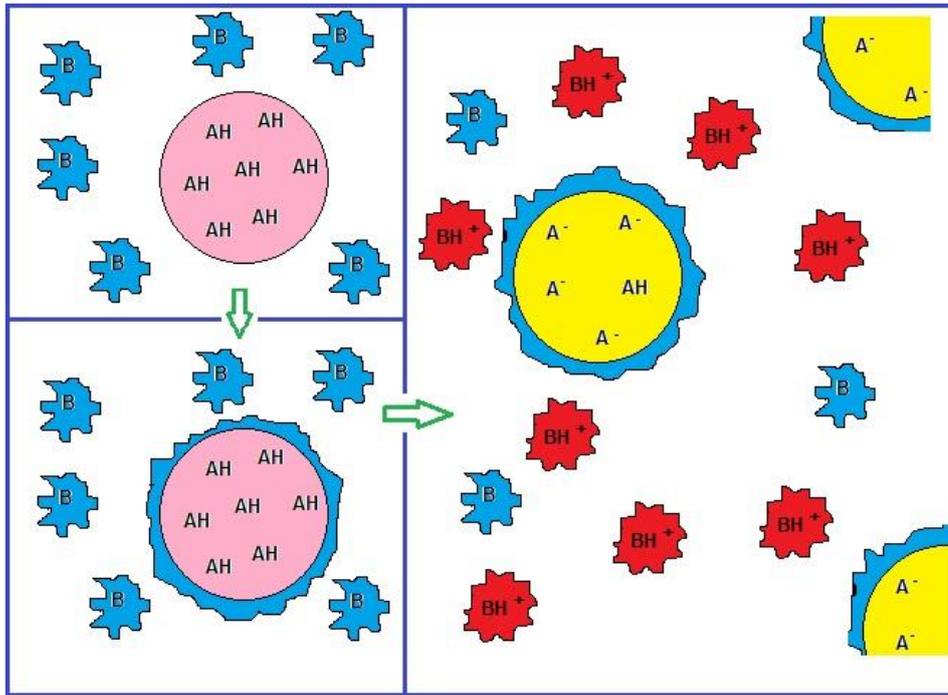


Figura 9: Representação esquemática da origem de cargas em meios não aquosos, onde: B = molécula do solvente; AH = molécula do surfactante (Fonte: da própria autora).

Apesar das dificuldades no tratamento quantitativo, existem modelos teóricos baseados no tratamento clássico iniciado por Gouy, Chapman, Debye e Huckel e, posteriormente modificado por Stern e Grahame. Na Figura 8B é apresentada uma representação da distribuição do potencial na dupla camada segundo a distribuição de Poisson-Boltzman. A partir de tratamentos matemáticos da distribuição de Poisson-Boltzman e do espaço recíproco de Debye, pode-se calcular a distribuição de cargas em dispersões coloidais. A natureza e a espessura da dupla camada elétrica são muito importantes, pois a interação entre as partículas carregadas é um fator determinante para a sobreposição das camadas difusas⁶. O potencial da camada de Stern⁷ não pode ser mensurado experimentalmente, mas, pode-se medir o potencial zeta no plano de

⁶ **Camada Difusa:** Estabelecida pelo modelo de Goy-Chapman, considera que uma maior quantidade de íons encontram-se imediatamente ao lado do sólido de maneira que a força de atração eletrostática é superior aos efeitos térmicos. A concentração das espécies diminui com a distância formando a camada de carga difusa. O tratamento matemático considera os íons como cargas puntiformes (Soares, 2009).

⁷ **Camada de Stern:** Esse modelo assume a existência de uma camada compacta de íons na superfície da partícula, seguida por uma camada difusa de íons. O tratamento matemático é feito considerando dois capacitores ligados em série, representando a camada compacta e a camada difusa (Soares, 2009).

cisalhamento, próximo à camada de Stern. Para muitas situações, a energia da interação repulsiva entre duas partículas similares de mesma carga pode ser calculada através do raio (R), do potencial zeta (ζ), do espaço recíproco de Debye (λ_D) e da distância da separação (l), conforme a Equação 1 (Somasundaran et al., 2002).

$$V_e = 0,5\pi\epsilon R\zeta^2 \ln(1+e^{-kl}) \quad (1)$$

O potencial zeta é uma grandeza que diz respeito ao mecanismo eletrostático de estabilização de dispersões coloidais e seu valor relaciona-se diretamente ao do pH (sendo positivo em regiões de meio ácido e negativo em regiões de meio básico). O valor de pH no qual o potencial zeta é nulo é chamado de ponto isoelétrico: a região nestas proximidades corresponde à região de menor estabilidade das suspensões do ponto de vista eletrostático (Soares, 2009).

As nanopartículas coloidais de AuNPs podem manter-se estáveis por semanas, meses ou anos quando sintetizadas sob condições ideais. Essa estabilidade é mantida porque as forças de repulsão (de natureza eletrostática ou estérica) são plenamente contrabalanceadas pelas forças de atração (Van der Waals). Entretanto, em casos de supersaturação do precursor há uma tendência de aglomeração das partículas (Prasad *et. al.*, 2008).

2.2.1.3.

Efeito dos plasmons de ressonância na superfície das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro dispersas formando um sistema coloidal apresentam uma carga quantizada da dupla camada decorrente da baixa capacitância efetiva para núcleos com diâmetros menores que 2 nm, desse modo, as transições eletrônicas ocorrem em intervalos de energia muito grandes (Alencar, 2012). As propriedades ópticas das AuNPs são dependentes de seu formato e tamanho, assim sendo, observa-se uma grande variação de cor para as dispersões coloidais das AuNPs que vão do vermelho ao azul, a depender do tamanho de partícula (quanto menor as AuNPs maior o deslocamento para o azul). Esses efeitos de cor são consequência do confinamento quântico dessas partículas

e estão relacionados a mudanças na ressonância plasmônica de superfície (Casanova, 2010).

Nos átomos de um metal do bloco d, observam-se transições eletrônicas do orbital d para o orbital s, a partir da absorção de fótons. Na prata, por exemplo, a diferença energética entre esses orbitais é muito elevada de modo que tais transições são provocadas apenas por fótons da região do ultravioleta, os fótons na região do visível apenas resvalam nos elétrons, implicando na aparência espelhada do metal, no bulk (Scerri, 2013).

A distribuição eletrônica do ouro é $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^1$, o orbital 5d completo e o elétron desemparelhado no orbital 6s propiciam ao ouro (considerando as propriedades do bulk) um maior efeito de contração relativística da camada quando comparado com outros metais (Zamarion, 2008). Devido ao peso atômico elevado do ouro, este efeito de contração relativística reduz a energia dos orbitais s e aumenta a energia dos orbitais d, diminuindo a diferença entre os dois níveis de energia (Scerri, 2013). Desse modo, há uma tendência de decréscimo da densidade de estados, que já é pequena, diminuindo também a probabilidade de transição interbanda, assim, menos elétrons reemitem fótons e a absorção de luz torna-se maior do que a reflexão (o metal possui a cor complementar amarela para o bulk, resultante na absorção de fótons com energia correspondente à parte azul da onda eletromagnética no visível) (Zamarion, 2008; Toma *et al.*, 2010; Scerri, 2013).

Com a diminuição do tamanho, as contribuições das transições inter e intrabanda tornam-se ainda mais especiais, pois o elétron desemparelhado no orbital s (na banda de condução) fica mais susceptível à ação do campo elétrico externo, em função disso, faz-se necessário uma abordagem considerando os elétrons livres para descrever a cor das dispersões coloidais de AuNPs (Zamarion, 2008).

O modelo dos elétrons livres considera um mar de elétrons se movimentando sob a influência de cátions fixos, numa aproximação na qual se ignora a vibração de íons ou fônons. Esta premissa do modelo define um plasma (ou plasma de elétrons livres). Nesse contexto, o plasma pode ser descrito como uma mistura de partículas eletricamente carregadas em movimento e com densidades e energias diferentes. O plasmon, por sua vez, é uma quasipartícula resultante da quantização de oscilações do plasma, assim como fótons e fônons

são respectivamente resultado das quantizações de luz e de vibrações mecânicas (Zamarion, 2008; Roditi, 2005).

Para partículas esféricas com diâmetro muito menor que o comprimento de onda da luz visível, um campo magnético incidente pode induzir uma oscilação coletiva dos plasmons, de modo que todos os elétrons ficam confinados ao mesmo campo em um dado intervalo de tempo. Uma separação dipolar de cargas na superfície das AuNPs ocorre quando a nuvem eletrônica se movimenta sob influência do campo elétrico, havendo uma tendência de recombinação natural por interação eletrostática (como ilustrado na Figura 10). Entretanto, uma vez que a nuvem eletrônica permanece sob a ação do campo elétrico, uma nova separação de cargas pode ocorrer gerando uma oscilação periódica superficial, chamada de ressonância plasmônica superficial localizada (Zamarion, 2008; Kreibi, 1995; Trügler, 2011).

Essa oscilação superficial é dependente da constante dielétrica do bulk, cuja frequência é reduzida na região do visível, entretanto, essa oscilação possui simetria dependente do tamanho (com excitações multipolares para partículas maiores do que 35 nm) e da anisotropia da partícula (Zamarion, 2008).

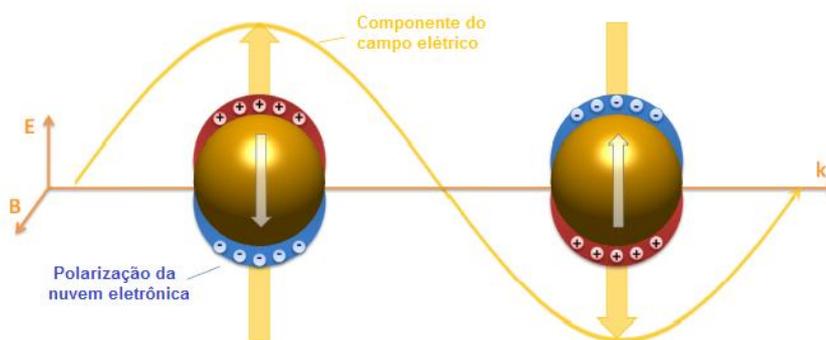


Figura 10: Separação de cargas na superfície de AuNPs decorrentes da incidência de uma onda eletromagnética (Adaptado de Trügler, 2011).

Adotando-se uma aproximação quase-estática, o campo elétrico dentro da partícula (E_i) pode ser calculado a partir do campo elétrico externo aplicado (E_0), da constante dielétrica do meio (ϵ_m) e da constante dielétrica da partícula metálica (ϵ) dependente da frequência (ω), conforme a Equação 2 (Trügler, 2011; Zamarion, 2008):

$$E_i = E_0 [3\epsilon_m / (\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m)] \quad (2)$$

O campo eletromagnético ao redor da partícula pode ser calculado a partir da equação de Laplace que relaciona o potencial elétrico (ϕ) e o campo elétrico externo aplicado, considerando-se que ϕ é contínuo na superfície da esfera e que a componente normal do deslocamento elétrico também é contínua (Zamarion, 2008). O momento de dipolo gerado (p) pela incidência do campo eletromagnético em uma nanopartícula metálica esférica pode ser calculado pela Equação 3, na qual, a polarizabilidade estática da esfera, α , é obtida a partir da resolução da equação de Laplace, conforme a Equação 4.

$$P = \alpha \epsilon_m \epsilon_0 \quad (3)$$

$$\alpha = 4\pi\epsilon_0 R^2 [(\epsilon - \epsilon_m) / (\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m)] \quad (4)$$

O valor de ϵ considera as contribuições da parte real e imaginária, relacionando o índice de refração (η) e a absorção de luz (κ), conforme a Equação 5 (Zamarion, 2008; Toma *et al.*, 2010).

$$\epsilon = \epsilon_{1(\omega)} + i\epsilon_{2(\omega)} = (\eta + i\kappa)^2 \quad (5)$$

A condição de ressonância ocorre quando o termo $\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m$ é mínimo, conseqüentemente, a polarizabilidade é máxima e o dipolo gerado pela influência do campo também. Para AuNPs, a ressonância encontra-se dentro da faixa do visível do espectro eletromagnético, resultando nas diferentes colorações observadas (Zamarion, 2008; Trügler, 2011).

A dependência entre o comprimento de onda e a ressonância plasmônica está associada às constantes dielétricas $\epsilon_1(\omega)$ e $\epsilon_2(\omega)$, onde ω é a frequência de excitação da luz. O decaimento do estado plasmônico excitado, de maneira geral, pode ocorrer por processos radiantes e não radiantes, dando origem a um maior espalhamento e absorção da frequência ω (Toma *et al.*, 2010). O comprimento de onda da faixa plasmônica de ressonância para nanopartículas metálicas é afetado pelas outras vizinhas. Quando duas nanopartículas estão muito próximas, os plasmons se acoplam e a mudança no comprimento de onda de ressonância dependerá da distância de separação entre elas (Sönnichsen, 2005).

A incidência de uma onda eletromagnética na frequência da faixa de ressonância dos plasmons conduz ao estado plasmônico excitado, através da promoção dos elétrons da banda de valência para a banda de condução,

resultando, para AuNPs, principalmente em uma energia de relaxação provocada por processos não radiantes, gerando uma banda de absorção. Para AuNPs o máximo dessa banda de absorção peculiar ocorre em 530 nm (em suspensões coloidais estáveis com diâmetro entre 5 e 30 nm), a este fenômeno está associada uma polarização transversal dos plasmons ressonantes. A aglomeração ou o aumento do tamanho das partículas das AuNPs possibilita a observação de mais uma banda, com intensidade máxima em aproximadamente 700 nm, resultante da polarização longitudinal dos plasmons ressonantes (Toma *et al.*, 2010). Assim sendo, a variação de diâmetros das AuNPs influencia diretamente no espectro das mesmas.

A ressonância plasmônica de superfície é uma propriedade sensível ao formato da partícula, resultando em mudanças de coloração muito intensas. A banda plasmônica de superfície se mostra ausente para AuNPs com diâmetro inferior a 2 nm, como também para porções macroscópicas de ouro (Casanova, 2010). O máximo de absorção da banda plasmônica e a sua largura são influenciados pelo formato da partícula, pela constante dielétrica do meio e pela temperatura. O índice de refração do solvente da dispersão induz um deslocamento de banda (previsto pela teoria de Mie) (Casanova, 2010). Essas propriedades podem ser manipuladas para a produção de novos materiais que respondam adequadamente à aplicação desejada. Por exemplo, pode-se produzir AuNPs em meios diferentes, em processos de auto-montagem que resultam em nanotubos de ouro. Os nanotubos de ouro conservam a relação entre o diâmetro das partículas e seu espectro de absorção, além disso, o ângulo de incidência da radiação pode resultar em polarização longitudinal, alterando o espectro de absorção. Para esses casos, todas as dimensões do material podem ser controladas, assim não apenas o diâmetro possui influência na resposta dos espectros de absorção, o comprimento dos nanotubos e a distância entre as partículas também ditam as propriedades do material produzido (Zhang e Zhang, 2012).

2.2.1.4.

Coeficiente de extinção em nanopartículas de ouro

A dependência entre as propriedades ópticas e o tamanho de partículas esféricas metálicas foi explicada quantitativamente pela teoria de Mie em 1908,

que apresentou o formalismo teórico a respeito do processo de extinção da luz visível por nanopartículas. Em 1912, Gans adaptou esta teoria para nanopartículas metálicas, relacionando o espalhamento da luz com o tamanho destas (Swanson e Billard, 2003; Myroshnychenko *et al.*, 2008; Zamarion, 2008).

Mie resolveu as equações de Maxwell para sistemas esféricos individuais, com dimensões da ordem ou menores do que o comprimento de onda da radiação incidente (Zamarion, 2008). De acordo com a teoria de Maxwell, a reflexão da luz em superfícies metálicas (no *bulk*), é proporcional à parte imaginária do termo dielétrico associado ao fenômeno de absorção (Toma *et al.*, 2010). A teoria de Mie considera que, após o feixe de luz passar por uma dispersão diluída de nanopartículas, a quantidade de luz que chega ao detector de um espectrofotômetro é uma contribuição da radiação absorvida pelas nanopartículas e da radiação espalhada, onde a extinção é dada pela soma de coeficientes a seguir: $\delta_{\text{ext}} = \delta_{\text{abs}} + \delta_{\text{sca}}$ referentes respectivamente à extinção de luz (ext), absorção de luz (abs) e espalhamento de luz (sca). A extinção está associada com a secção transversal das partículas esféricas (Equação 6), podendo-se relacionar a radiação espalhada com o tamanho da partícula (Equação 7). Considerando a intensidade de radiação absorvida por uma amostra, Mie formulou a Equação 8 para o coeficiente de extinção em nanopartículas (Casanova, 2010; Zamarion, 2008).

$$\delta_{\text{ext}} = (2\pi/k^2)\Sigma(2L+1)R_e(a_L+b_L) \quad (6)$$

$$\delta_{\text{abs}} = (2\pi/k^2)\Sigma(2L+1) (a_L^2+b_L^2) \quad (7)$$

$$\delta_{\text{sca}} = (2\pi/EmK_0^2) \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \text{Re} (a_n + b_n) \quad (8)$$

Onde, k é um parâmetro diretamente proporcional à dimensão da partícula, L refere-se à ordem de excitação ($L=1$, excitação dipolar), a_L e b_L são parâmetros expressos por funções do tipo Riccati-Bessel empregadas na resolução das equações de Maxwell, R_e 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. Os coeficientes de Mie estão relacionados com a parte real das funções de Riccati-Bessel, em que são considerados o tamanho da partícula e a constante dielétrica do meio (Casanova, 2010; Zamarion 2008).

A resposta óptica das nanopartículas metálicas pode ser descrita por uma soma de ondas parciais. O índice do somatório indica a ordem de onda parcial descrita pelo harmônico esférico vetorial correspondente para o campo elétrico ou magnético e também refere-se à ordem de excitação multipolar na nanopartícula. Desta forma, $n=1$ corresponde a campos de dipolo, $n=2$ quadrupolo, $n=3$ octupolo e assim sucessivamente, com as respectivas excitações coletivas multipolares nas partículas. Nessas equações a e b são constantes (Castilho *et al.*, 2011).

A banda espectral da superfície plasmônica ressonante pode ser associada às informações a respeito do tamanho, estrutura e agregação das nanopartículas. Relacionando-se os espectros no UV-vis com resultados de microscopia eletrônica de transmissão pode-se obter informações a respeito da concentração das AuNPs na dispersão, conforme Equação 9 e Equação 10 (Liu *et al.*, 2007).

$$N = (\pi\rho D^3)/(6M) \quad (9)$$

$$C = N_T/(NVN_A) \quad (10)$$

Considerando-se que 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). A partir dessas equações, o coeficiente de extinção pode ser previsto para AuNPs de acordo com a lei de Lambert-Beer.

2.2.1.5.

Tipos de sínteses de nanopartículas de ouro

Como mencionado, em escala nanométrica, uma grande fração dos átomos se concentra na superfície das AuNPs. Uma vez que a superfície dos átomos de Au exibe uma valência incompleta, eles estão ligados apenas por átomos internos mantendo disponíveis sítios externos para interagir com espécies doadoras/aceptoras ou ligantes (Toma *et al.*, 2010).

As AuNPs podem ser sintetizadas em meio orgânico ou aquoso. Tipicamente, um sal de ouro é submetido à ação de um agente redutor, desse

modo, a espécie Au^{3+} é conduzida, em um processo de nucleação e redução, a espécie Au^+ , provocando a formação das nanopartículas. Usualmente, um agente passivante é adicionado ao meio para garantir a estabilidade da dispersão coloidal (Sperling *et al.*, 2008).

Os processos de preparação de nanomateriais metálicos geralmente utilizam agente redutores tais como citrato de sódio, boridreto de sódio, hidrazinas, formaldeídos, hidroxilaminas, alcoóis saturados e insaturados além de açúcares. Variáveis tais como pH do meio reacional, temperatura e a dispersão das espécies químicas de interesse, devem ser controladas para se obter o tamanho de partícula desejado (Casanova, 2010).

A abordagem introduzida por Michael Faraday, em 1857, foi referente a um método de síntese que se baseou na redução do ânion AuCl_4^- utilizando-se fósforo em sulfeto de carbono. O método possui variações estabelecidas por Faraday através da adição em pequenas quantidades de diferentes eletrólitos (indutores de forma, surfactantes catiônicos e outros aditivos) que promoveram a formação de nanopartículas com diferentes dimensões e geometrias implicando na obtenção de dispersões coloidais com diferentes cores (Casanova, 2010; Ferreira e Rangel, 2009).

Após o trabalho de Faraday, diversos métodos de síntese foram publicados, podendo-se destacar o método clássico de Turkevich (1951), baseado na redução de HAuCl_4 por citrato de sódio (tipo do citrato não mencionado). O trabalho de Turkevich apresentou uma avaliação microscópica de dispersões coloidais de ouro preparadas por diferentes rotas sintéticas, desse modo, ele comparou o processo de síntese desenvolvido por ele e seus colaboradores com outros métodos de síntese existentes descritos na época (Turkevich *et al.*, 1951).

Turkevich utilizou seis métodos de síntese comparando-os com outros quatro tipos de síntese que ele desenvolveu. Na Tabela 2 é mostrado um resumo de todas as sínteses utilizadas no trabalho de Turkevich, onde se relacionam as condições de síntese e os tamanhos médios de partícula encontrados em cada uma delas (Turkevich *et al.*, 1951).

Tabela 2: Métodos sintéticos avaliados por Turkevich et al.(1951)

Método de síntese	Precursor (fonte de Au)	Meio (solvente)	Agente Redutor	Diâmetro das AuNPs
Método de Bredig	Arco com dois eletrodos de Au	Solução de hidróxido de sódio	Redução eletroquímica com diferença de potencial de 115 V e frequência de 60 ciclos	3-10 nm
Método de Faraday	HAuCl ₄ (1 g de Au por litro)	H ₂ O/CS ₂	Solução saturada de fósforo branco em éter dietílico.	3 nm
Método de Davies	HAuCl ₄ (0,12 mg de Au por litro)	Acetona	Permanganato em meio alcalino	20 nm
Método de Wieser	HAuCl ₄ (1 g de Au por litro)	Água (meio neutralizado com carbonato de sódio)	Ácido tânico	12 nm
Método Turkevich (ácido oxálico)	HAuCl ₄ (0,53 g de Au por litro)	Água	Ácido oxálico	200 nm
Método de Rinde	HAuCl ₄ (1 g de Au por litro)	Água contendo K ₂ CO ₃ (meio básico)	Hidrocloreto de hidroxilamina	15 nm
Método de Donau	HAuCl ₄ 0,001% de Au	Água	Monóxido de carbono	20 nm
Método Turkevich (acetileno)	HAuCl ₄ (0,56 g de Au por litro)	Água	Acetileno	28,5 nm
Método Turkevich (ácido cítrico)	HAuCl ₄ (0,53 g de Au por litro)	Água	Ácido cítrico	10-50 nm (grande variedade de tamanhos em uma mesma partida reacional)
Método Turkevich (citrato de sódio)	HAuCl ₄ (0,53 g de Au por litro)	Água	Citrato de sódio	20 nm

Turkevich também aprofundou o estudo das variações de condições de síntese do método por redução de citrato, relatando que o aumento da temperatura provoca um aumento do diâmetro médio das AuNPs, para dispersões com colorações macroscopicamente similares, sendo que, à 100°C a reação se completa em 5 min, ao passo que à 70°C a reação se completa em 45 min. Variando-se à concentração do citrato, Turkevich observou uma tendência de aumento do tamanho das AuNPs proporcional ao incremento de concentração de citrato no meio. Observando-se o processo de nucleação em função do tempo (nas condições de síntese), relatou-se que a razão partículas/volume tende a aumentar com o tempo até atingir 5 min, quando o processo atinge estabilidade (avaliada por 10 min). Foi demonstrado também que a alteração do agente redutor produziu dispersões de AuNPs menos homogêneas em termos de tamanho do que a obtida pela redução por citrato. Não há informações a respeito da natureza do citrato utilizado (monobásico ou tribásico) ou sobre o pH do meio (Turkevich *et al.*, 1951).

A rota sintética proposta por Turkevich (ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio) apresenta uma nucleação rápida seguida por crescimento difusional controlado. O citrato atua tanto como agente redutor quanto como agente estabilizante. Na Figura 11 se apresenta um fluxograma deste processo de nucleação e crescimento, podendo-se observar a dependência em relação ao meio de síntese (Casanova, 2010).

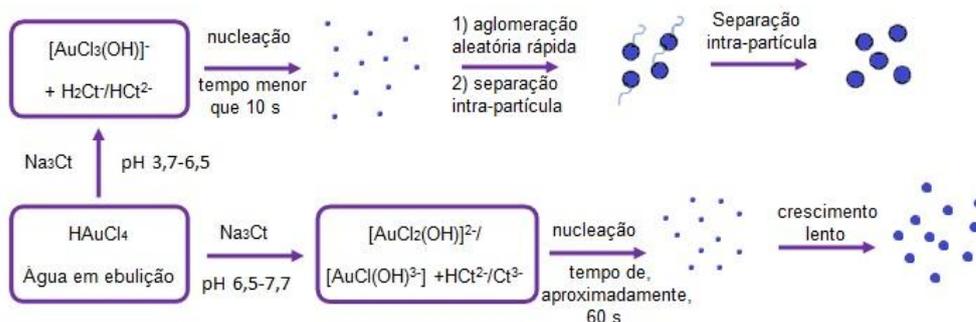


Figura 11: Fluxograma esquemático do processo de formação de AuNPs por redução do citrato de sódio tribásico (Na₃Cit) (adaptado de Casanova, 2010).

Chow e Zukoski (1994) demonstraram que o processo inicial de nucleação favorece a formação de grandes agregados resultando na redução da espécie Au³⁺ pelo citrato. Ao longo da reação, esses agregados se dispersam para formar nanopartículas monodispersas.

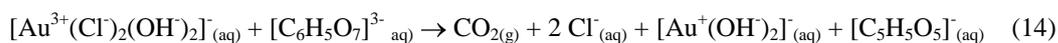
A taxa de redução observada durante a formação das AuNPs é um reflexo dos conflitos de tendência da dependência entre o pH do meio e a reatividade entre as espécies citrato e ouro. Quando a síntese ocorre em valores baixos de pH, a etapa inicial de nucleação é rápida e a formação das AuNPs seguem três etapas principais: nucleação, agregação e separação das nanopartículas. Diferentemente, quando a síntese ocorre em valores elevados de pH, a nucleação é mais lenta mas a formação das AuNPs é consistente com o tradicional método de nucleação e crescimento das nanopartículas. Muitas reações intermediárias ocorrem durante a formação das AuNPs, mas, de maneira geral o mecanismo tem início com a redução do Au³⁺ e termina com a descarboxilação do citrato (Ojea-Jiménez e Campanera, 2012).

Essa dependência da formação das AuNPs com o pH pode ser explicada ao avaliar-se os valores de pK_a das espécies envolvidas. Quando o ácido cloroáurico

é dissolvido em água há uma completa dissociação das espécies, com geração de complexo quadrado planar $[\text{AuCl}_4]^-$, em meio básico, ocorrem sucessivas reações de substituição nas quais o ligante Cl^- é substituído por OH^- , conforme indicado na Equação 11 (Ojea-Jiménez e Campanera, 2012).



O tipo de complexo que será formado pode ser previsto de acordo com os valores de pK para as sucessivas reações ($\text{pK}_1 = 5,4$; $\text{pK}_2 = 6,4$; $\text{pK}_3 = 7,5$; $\text{pK}_4 = 8,3$). Similarmente, a variação do potencial redox do citrato de sódio em solução aquosa está associada aos seus estados de ionização, com valores de pK_a de 3,1 (para o COOH próximo ao OH), 4,8 e 6,1 (para os dois COOH distantes do OH) e 14,4 (para o OH). Desse modo, de acordo com o pH do meio, pode-se deduzir quais as espécies dominantes no meio reacional para que sejam previstas as espécies que serão formadas. Nas Equações 12, 13 e 14 são indicadas possíveis equações globais de reação, considerando-se as espécies iniciais e os produtos formados para meios ácido (pH 3,1 a 4,8), levemente ácido (pH 5,4 a 6,4) e perto da neutralidade (pH 6,4 a 7,5), respectivamente (Ojea-Jiménez e Campanera, 2012).



O mecanismo que envolve a formação das AuNPs pode ser dividido em quatro etapas: (i) substituição do ligante, reação ácido-base, (ii) conversão interna, (iii) redução do Au^{3+} e (iv) descarboxilação (Ojea-Jiménez e Campanera, 2012). Na Figura 12 é indicado um possível mecanismo de reação em meio ácido, que abrange a faixa de pH utilizada na síntese realizada no presente trabalho

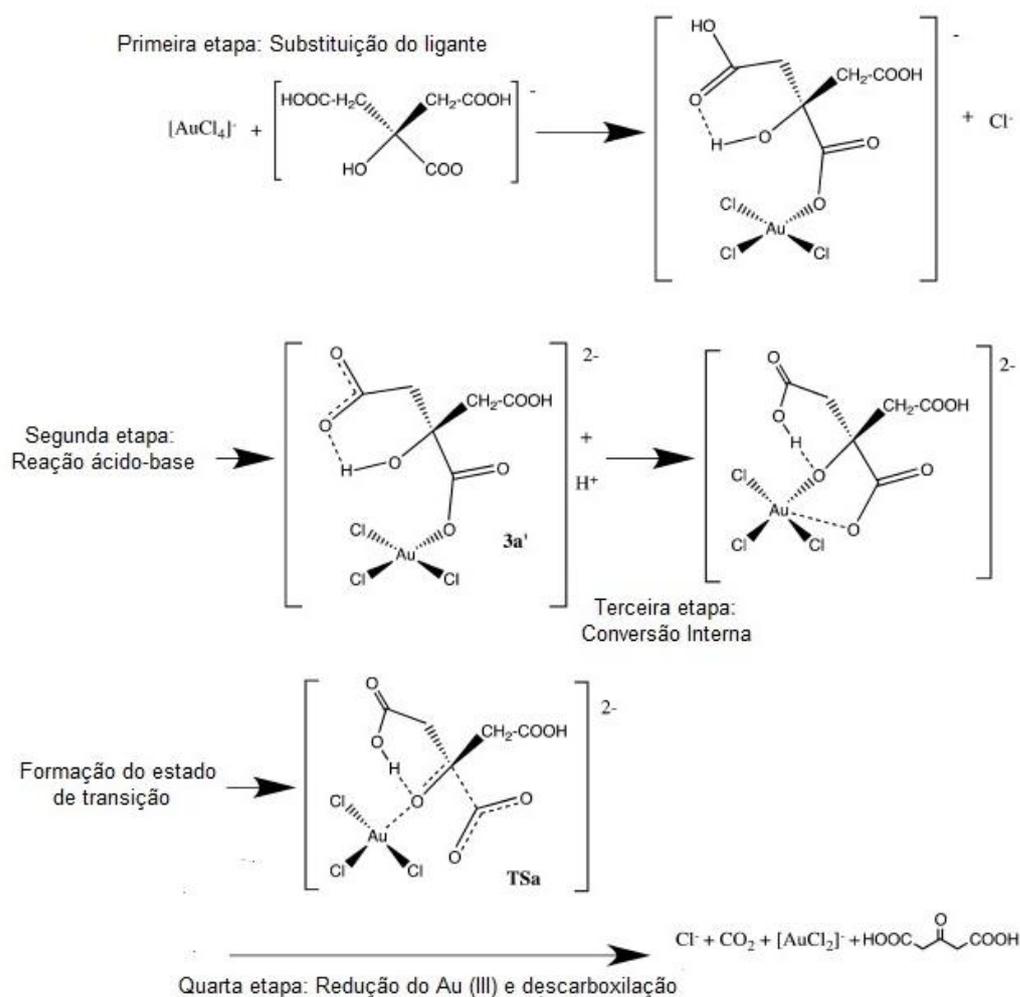
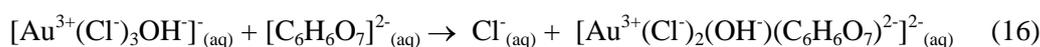
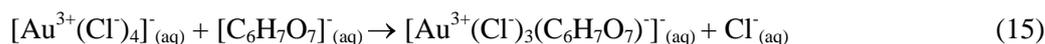


Figura 12: Proposta de mecanismo para a redução de Au(III) e oxidação do citrato em meio ácido (pH: 3,1-4,8). (adaptado de Ojea-Jiménez e Campanera, 2012).

As espécies formadas durante a segunda etapa (reação ácido-base) influenciarão diretamente na formação do estado de transição. As equações globais das reações que envolvem essa segunda etapa estão representadas nas Equações 15, 16 e 17 para os meios ácido, levemente ácido e perto da neutralidade, respectivamente (Ojea-Jiménez e Campanera, 2012).



Na Figura 13, são representadas as possíveis geometrias dos complexos formados nas diferentes etapas do processo, considerando-se a influência do pH do meio reacional.

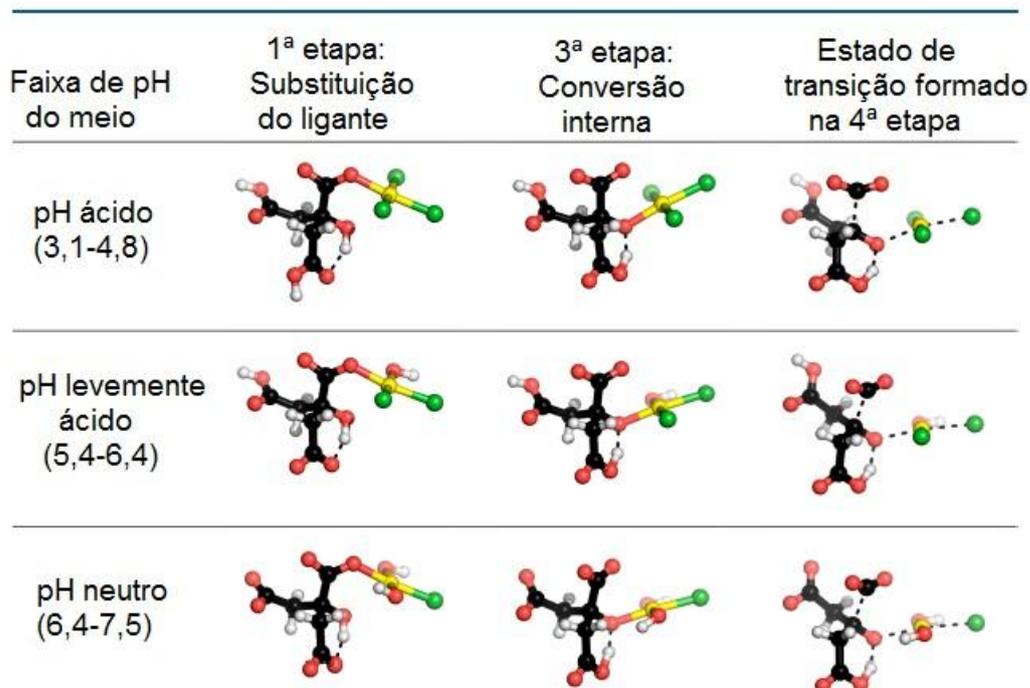


Figura 13: Estruturas moleculares relevantes formadas durante as etapas do mecanismo de reação de formação das AuNPs, considerando-se a influência do pH do meio. As representações seguem o modelo de bola e bastão (Ball and Stick models), as linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio intramoleculares e as ligações quebradas no estado de transição. As bolas verdes representam os átomos de cloro, as amarelas o átomo de ouro, em preto os átomos de carbono, em vermelho os átomos de oxigênio e em branco os átomos de hidrogênio (adaptado de Ojea-Jiménez e Campanera, 2012).

A energia livre de Gibbs prevista para as reações é de $-37,2 \text{ kcal mol}^{-1}$, $-29,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-26,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ para os meios ácido, levemente ácido e próximos à neutralidade, respectivamente. Tendo em vista esses valores, pode-se perceber que a formação de AuNPs é um processo mais espontâneo em meio ácido (Ojea-Jiménez e Campanera, 2012).

O estudo de Turkevich foi explorado por diversos pesquisadores, observando-se diferenças entre os produtos obtidos ao se alterar variáveis da síntese tais como concentração do agente redutor (Frens *et al.*, 1973), pH (Ji *et al.*, 2007), alterações na sequência de adição dos reagentes (Ojea-Jimenez, *et al.*, 2011) e modificação do solvente utilizado (Ojea-Jimenez *et al.*, 2010). Esses autores tiraram vantagem do fato de que a geometria dos complexos obtidos, o

tamanho das nanopartículas e suas propriedades ópticas podem ser alterados de acordo com a manipulação das condições de síntese (Ojéa-Jimenez *et al.*, 2012).

Em 1994, o método de Brust-Schiffrin para a síntese de AuNPs teve grande impacto uma vez que foi proposta a síntese de AuNPs termicamente estáveis, de tamanho controlado e com dispersão em meio redutor (Casanova, 2010). O método utilizou como precursores o ácido cloroáurico em tolueno e dodecanotiol, reduzido por boridreto de sódio (Perala e Kumar, 2013).

Li *et al.* publicaram, em 2011, um artigo a respeito dos métodos utilizados para a síntese de AuNPs. Segundo eles, o método mais difundido para esta síntese, utilizando como princípio redução pelo citrato, forneceu produtos com baixas concentrações das nanopartículas, limitando a aplicação destas. Os autores ofereceram uma nova rota sintética, para a síntese de Turkevich, a partir de ácido clorídrico em concentração elevada, com posterior adição de hidróxido de sódio e controle de temperatura (este sistema proporciona um controle da redução de citrato), obtendo concentrações mais elevadas e uniformes das nanopartículas. Esta rota sintética, proposta como rota comercial por estes pesquisadores ofereceu, segundo os autores, a vantagem de redução do gasto de energia, minimizando os impactos no meio ambiente.

Em 2010, Rai *et al.* publicaram uma síntese de AuNPs utilizando o antibiótico cefaclor tanto como agente redutor quanto como agente estabilizante. Os autores destacaram que o grupamento amino primário do cefaclor foi o responsável por esse papel duplo durante a síntese. A atividade antibacteriana do antibiótico ligado às AuNPs foi intensificada quando comparada a atuação do medicamento sozinho.

Esses são alguns dos métodos de síntese propostos para a produção de AuNPs. Apenas em 2013, foram publicados 1647 artigos relacionados com sínteses de AuNPs (Web of Science, acesso em 30/12/13), demonstrando a grande importância desses materiais.

2.2.1.6.

Aplicações de nanopartículas em Química Analítica

Os nanomateriais estão provocando uma revolução em várias áreas das ciências puras e aplicadas (engenharia ambiental, biomedicina, farmácia, física,

ciência de materiais, entre outras) e é claro que a química analítica também tem se beneficiado das características e propriedades peculiares destes. Por exemplo, o tamanho de nanosensores permite o monitoramento de analitos *in vivo*. Pode-se citar a utilização de nanotubos de carbono para monitoramento, *in vivo*, de sinais neuroquímicos tendo em vista a importância que os cátions e ânions têm na regulação dos sinais eletroquímicos do sistema nervoso. A diferença de potencial entre o meio intracelular e extracelular dos neurônios está interligada com as diferenças de concentrações de ânions e cátions em ambos os meios. Assim, nanosensores feitos com nanotubos de carbono podem ser usados para a medição dessas diferenças em concentração até mesmo numa célula *in vivo*. Outro exemplo a ser citado é a utilização de nanopartículas de ouro como plataforma para quantificação colorimétrica *in vivo* de glicose em células cerebrais (Zhang *et al.*, 2011). Diversos outros sensores baseados nas propriedades diferenciadas dos nanomateriais semicondutores e nanomateriais metálicos têm sido apresentados para aplicações biológicas (Ojea-Jiménez *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

As nanopartículas metálicas têm sido utilizadas em química analítica para desenvolvimento de métodos analíticos baseados no uso de várias técnicas incluindo as diversas espectrometrias (ópticas e de massa), abordagens eletroanalíticas e de separação. Nesse caso os nanomateriais têm sido usados como sensores ou plataformas. Por possuírem a vantagem de apresentar um elevado coeficiente de extinção, as nanopartículas metálicas têm sido muito utilizadas como marcadores ou sondas, viabilizando medições ópticas (luz transmitida ou espalhada) (Zamborini *et al.*, 2012). De 2010 a 2013, constam-se, na base de dados da Web of Science, 185 artigos relacionados apenas ao uso analítico das AgNPs. Esta elevada produção científica indica a gama de aplicações que interligam a química analítica e as nanopartículas metálicas. Alguns destes trabalhos trazem um grau de inovação importante, tais como o apontado por Chen *et al.* (2014) no qual verificou-se que ao se recobrir AgNPs com um fluorosurfactante não iônico em meio aquoso, produziu-se uma sonda seletiva para cisteína em relação a outros aminoácidos e biomoléculas. Os autores avaliaram a interação da sonda com a cisteína por meio da variação da atividade óptica em 560 nm, relatando um valor de LD de $0,05\mu\text{mol L}^{-1}$. Em 2013, Shang *et al.* relataram um método simples para determinação de Al^{3+} , visando o

monitoramento de água, para tal, desenvolveram um sensor com AgNPs funcionalizadas com 8-hidroxiquinolina-5-sulfonato, que tem resposta óptica afetada em 530 e 392 nm na presença de Al^{3+} . O valor de LD de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi reportado.

Em 2010, Chen *et al.* desenvolveram um biosensor com multicamadas de AgNPs associados à ADN para determinação de gentamicina. Os autores relataram um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, assumindo-se o princípio de funcionamento do sensor por adsorção e dessorção eletrostática, conforme o modelo de Langmuir.

Com relação às AuNPs, podem-se destacar inúmeras vantagens nas aplicações biológicas tais como; a natureza não-tóxica e biologicamente inerte das nanopartículas, a síntese conveniente e controlada para atingir tamanhos específicos, a ligação eficiente com um grande número de compostos farmacêuticos que podem ser carregados e liberados controladamente em células-alvo (drug delivery) (Rastogi *et al.*, 2012). Galanzha *et al.* (2012) também citam a utilização das AuNPs para finalidades como auxílio no contraste de imagens no diagnóstico de doenças e na intensificação do efeito de antibióticos.

Mammen *et al.* (1998) destacaram que a superfície bem desenvolvida, a geometria controlável, a rigidez e a estabilidade química observadas nas AuNPs viabiliza que estas sejam utilizadas como ferramenta para avaliação da contribuição de entropia conformacional em ligações polivalentes, resultando em grandes contribuições analíticas. Uma das aplicações usuais de AuNPs em química analítica é viabilizar a detecção de substâncias de baixo peso molecular, tais como, íons potássio, cocaína, adenosina, ocratoxina, dopamina, bem como substâncias de maior peso molecular tais como a trombina (Derbyshire *et al.*, 2012).

Uma aplicação que merece destaque é o trabalho recente (2012), de Ojea-Jiménez *et al.*, no qual foi abordada a utilização de dispersões de AuNPs como catalisadores para a redução de Hg(II), utilizando o citrato de sódio como agente redutor. Tal sistema é proposto para a purificação e remoção de Hg(II) de águas poluídas, pois o efeito de absorção de Hg(II) nas AuNPs implica na formação de um amálgama cuja hidrofobicidade possibilita a remoção deste íon da água. A aplicação do método foi feita em amostras do Rio Ebron, contaminadas com 6,5 ppm de mercúrio e após o tratamento com nanopartículas de ouro (de 1,7 nm de

dimensão e em concentração de 7,1 ppm) conseguiu-se eliminar 41% do mercúrio total.

Essas são apenas algumas das aplicações das AuNPs em química analítica; muitos grupos de pesquisa têm desenvolvido projetos que relacionam aplicações analíticas com o uso de AuNPs apresentando grande vantagens com relação aos métodos pré-existentes.

2.2.1.7.

Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas de ouro

A interação entre AuNPs e AMG é um tema de pesquisa recente. Inicialmente, tal interação foi estudada com finalidades biológicas, avaliando a intensificação das propriedades antibióticas dos AMG quando associados às AuNPs. Esse tipo de esforço científico é decorrente da biocompatibilidade, natureza não tóxica e estabilidade das AuNPs e de sua simples conjugação com moléculas orgânicas que permite sua aplicação em diversos campos da biomedicina e na área de fármacos. Artigos mais recentes, publicados em 2012 e em 2013, apontam finalidades analíticas associadas à determinação indireta de AMG com o uso de dispersões coloidais de AuNPs, entretanto, todos apresentam peculiaridades nas sínteses e nas aplicações sendo possível observar direções distintas entre o trabalho apresentado nessa dissertação e os trabalhos já publicados.

O trabalho pioneiro relatando a interação entre AuNPs e AMG foi publicado em 2007 por Grace *et al.*, que sintetizaram AuNPs em meio aquoso, através de uma reação de oxirredução entre o ácido cloroáurico e o citrato de sódio tribásico. O estudo foi feito para avaliar a interação entre AuNPs com EST, GENTA e NEO. Os AMG foram fixados às nanopartículas após 2 h de agitação (tempo que julgaram necessário para que se obtivesse total adsorção na nanopartícula). Muito embora o trabalho tivesse como foco abordar a viabilidade do uso de AuNPs como veículos portadores dos AMG no organismo e mostrar que a interação entre os AMG e a AuNPs, foi constatada a intensificação do efeito antibiótico dos AMG em diversas culturas de bactérias. Os espectros no UV-vis indicaram que era possível identificar diferentes interações de acordo com a variação da concentração de AuNPs no sistema com o AMG utilizado. Adicionalmente, ao

caracterizarem as dispersões de AuNPs com AMG, os autores descreveram o efeito de polarização longitudinal e transversal nos espectros na região do visível, relacionando a intensidade da radiação transmitida com a concentração. Os autores também realizaram as análises por espectrometria no infravermelho com a finalidade de comprovar a interação entre os AMG e as AuNPs. Observou-se que a interação com os grupos amino dos antibióticos é pronunciada, dado a forte atenuação do pico correspondente à frequência de alongamento do grupo NH₂ no espectro na região do infravermelho. Com isso, os autores chegaram à conclusão final de que os grupos carboxílicos não se ligam à superfície das AuNPs. Toda a interação é atribuída aos grupos aminos livres em cada antibiótico. Por fim, os autores provaram um aumento da eficiência dos antibióticos quando transportados pelas AuNPs.

Em 2009, Wang *et al.* relataram a utilização de AuNPs revestidas com prata como sondas para a determinação de AMG. O nanocompósito produzido foi utilizado como superfície assistente na dessorção e na ionização por laser em análise por espectrometria de massas. A aplicação do método foi na determinação de paromomycin, CANA A, NEO e GENTA em plasma humano, sendo relatados limites de detecção de 9 a 180 nmol L⁻¹.

Ainda em 2009, Burygin *et al.* publicaram um artigo sobre a interação entre AuNPs e GENTA para finalidades biológicas. Os autores incorporaram moléculas desse AMG às AuNPs, avaliando a adsorção através dos espectros eletrônicos gerados, entretanto, ao avaliarem o potencial bactericida na presença de *Escherichia coli* K12, os autores não perceberam significantes diferenças entre a atividade antibiótica da GENTA pura e incorporada às AuNPs. Os autores atribuíram o insucesso desse resultado à possibilidade de que certa quantidade de GENTA associada à superfície das AuNPs poderia estar em quantidade insuficiente para interagir com os sítios das bactérias.

Em 2010, Zhu *et al.* utilizaram AuNPs acopladas à nanotubos de carbono para produzir um imunossensor para monitoramento de NEO. Os autores otimizaram as condições de resposta da sonda em função do tempo, temperatura, pH e aplicação de potencial, relatando um limite de detecção de $7,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e uma faixa linear de $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ a $2,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Zhu *et al.* (2011) apresentaram um método no qual nanotubos de ouro foram usados como sensores ópticos para detecção residual de GENTA, utilizando

ovalbumina e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como agente estabilizador. Os autores descreveram um limite de detecção de $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$ ($7,1 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$) e uma faixa linear que se expande até 20 ng mL^{-1} ($2,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Ao testar o uso do sensor para outros AMG, tais como CANA, EST, NEO e cloranfenicol, os autores constataram que os nanotubos produzidos eram seletivos para GENTA na faixa linear estudada.

Posteriormente, em 2012, Derbyshire *et al.* produziram um nanocompósito acoplando AuNPs à aptâmeros de ARN. Este nanocompósito foi utilizado para viabilizar a determinação de oito AMG: CANA, paromomicin, dihidrostreptomycin, EST, apramicina, TBR, NEO e GENTA. Os autores produziram um sensor no qual as AuNPs foram revestidas com aptâmeros de ARN e com o AMG de interesse. A síntese foi feita através da evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX), indicando afinidades nanomolares entre os aptâmeros resultantes e os AMG. O estudo parte do princípio de que a estrutura do ARN ligado aos AuNPs e os AMG compartilham uma estrutura do núcleo comum, o anel 2-dioxoestreptamina. Os aptâmeros adsorvem fisicamente na superfície das AuNPs, estabilizando-as, reduzindo, desse modo, a agregação induzida por sal que provocaria uma mudança de coloração do rosa para o azul. A quantificação dos AMG foi feita estabelecendo-se uma relação entre os dois principais picos detectados na região visível do espectro na presença dos AMG (A_{650}/A_{530}), em uma faixa de concentração até 500 nmol L^{-1} (Derbyshire *et al.*, 2012).

AuNPs também foram adaptadas para a produção de um sensor eletroquímico para determinações quantitativas de CANA. O nanocompósito foi obtido utilizando-se um polímero condutor como agente estabilizante das AuNPs. Tal nanocompósito gerou um sensor voltamétrico muito sensível à presença de CANA, obtendo-se um intervalo linear de $0,05$ a $9,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e um valor de LD de $9,4 \text{ nmol L}^{-1}$ para o AMG (Zhu *et al.*, 2012).

Rastogi *et al.* (2012) relatam um método no qual AuNPs foram produzidas com o intuito de serem funcionalizadas com os AMG de modo a atuarem como um veículo de entrega desses antibióticos. Os autores observaram que a atuação do antibiótico foi potencializada quando os AMG eram acoplados às AuNPs. Para fixação dos AMG foram necessárias 18 h de agitação em baixas temperaturas, resultando em diferentes nanopartículas funcionalizadas que apresentaram

variações espectrais na região do visível, no tamanho e no potencial Zeta. Os espectros de infravermelho obtidos para cada nanopartícula funcionalizada permitiu identificar que a interação ocorre através dos grupos N–H e dos grupos carboxilados, uma vez que os picos correspondentes a esses grupos têm suas intensidades modificadas quando o AMG é adsorvido na AuNPs.

Recentemente, em 2013, Zhou *et al.* utilizaram aptâmeros específicos do ADN para produção de um nanocompósito com AuNPs. O material foi utilizado para a determinação de EST em mel. A detecção foi feita por espectrofotometria na região do visível, relatando-se um limite de detecção de $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Ainda em 2013, Apyari *et al.* relataram o desenvolvimento de um método espectrofotométrico para determinação de NEO utilizando-se dispersões coloidais de AuNPs, preparada pelo método de Frens, realizando a redução do ácido cloroáurico através do citrato de sódio (não foi especificado o tipo do citrato utilizado), sendo necessário um processo de recristalização com duração de 24 h. No método descrito por Apyari *et al.* o preparo dos padrões teve a adição de quantidades definidas de EDTA a fim de minimizar interferências provocadas por certos íons. Soluções oftálmicas e otológicas contendo NEO foram analisadas. Os autores relataram um limite de detecção de 28 ng mL^{-1} ($3,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) para uma faixa de pH robusta entre 4-8. Não foi relatada a identificação de seletividade do método com relação a outros AMG.

Um grupo de pesquisa da universidade de Zhengzhou também publicou um artigo em 2013, relacionando o uso de dispersões de AuNPs para determinação de CANA (Wang *et al.*, 2013). Em um primeiro artigo, os autores relatam uma comparação entre um método desenvolvido com o uso de AuNPs e um método com o uso de QDs de CdTe capeados com ácido 2-mercaptopropiônico. Os autores produziram as AuNPs através da redução do ácido cloroáurico por íons citrato (não foi especificado o tipo do citrato) e realizaram a determinação do analito através de espectrofotometria no visível medindo a diminuição da radiação transmitida em função da presença de CANA. O valor de LD de $1,7 \times 10^9 \text{ mol L}^{-1}$ foi obtido, no entanto, os autores identificaram interferências elevadas quando adicionaram aminoácidos ao meio. Já com a sonda de QDs, observou-se o aumento da fluorescência na presença de CANA, que gerou um valor de LD de $1,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. A comparação de desempenho indicou que a sonda de AuNPs teve melhor desempenho. Nenhum estudo detalhado de seletividade ou rigor em

estabelecer outros parâmetros de mérito foi mostrado. A aplicação foi feita em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos entre os dois métodos mostraram coerência com relação à recuperação de amostras simuladas (Wang *et al.*, 2013). Um segundo artigo desse grupo de pesquisa relata o uso de uma dispersão de AuNPs para determinação de GENTA, AMIC e TBR, indicando um valor de LD de $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para TBR, entretanto, não foi mencionado nada sobre seletividade do método com relação à outros AMG presentes no meio (Wang *et al.*, 2013).

3

3.1. Materiais, Instrumentação e procedimentos experimentais

3.1.

Materiais e Reagentes

Água ultrapura (purificada em sistema Milli-Q, Millipore, modelo simples 185, EUA) foi usada para a preparação de todas as soluções e dispersões aquosas. Para a síntese das AuNPs utilizadas para fins analíticos foi usado o citrato de sódio monobásico P.A. (99,5%, Sigma-Aldrich, EUA), citrato de sódio tribásico (99,9%, Merck, Alemanha), cloreto de ouro (99,99%, Sigma-Aldrich) e ácido cloroáurico (99,99%, Sigma-Aldrich).

Para o preparo dos padrões e amostras simuladas foram usados: sulfato de tobramicina, sulfato de estreptomicina, sulfato de neomicina, sulfato de gentamicina, sulfato de amicacina e sulfato de canamicina (99,99%, Sigma-Aldrich, para todos os padrões).

Para o preparo de soluções aquosas de possíveis interferentes foram usados ácido clorídrico concentrado P.A. (Isofar, Rio de Janeiro), hidróxido de sódio P.A. (Merck, Alemanha), ácido cítrico (99,5%, Sigma-Aldrich), sulfato de estreptomicina (99,99%, Sigma-Aldrich), cloreto de benzalcônio (95%, Sigma-Aldrich), tyloxapol (99%, Sigma-Aldrich), ácido bórico (Sigma-Aldrich), sulfato de sódio (99%, Sigma-Aldrich), cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro), EDTA (Sigma-Aldrich).

Para as análises por HPLC foram usados acetonitrila e metanol (ambos solventes grau HPLC, J.T. Baker, EUA), cloreto de sódio (Vetec), cloreto de potássio (Merck), hidrogenofosfato de sódio (Merck), fosfato de potássio monobásico (Merck), 1-fluoro-2,4-dinitrofluorobenzeno (99,%, Sigma-Aldrich), ácido bórico (Merck) e borato de sódio (99%, Spectrum, EUA).

Para o pré-tratamento de desnaturação de proteínas em amostras de saliva utilizou-se ácido perclórico concentrado (Vetec). Na limpeza do material foram utilizados ácido nítrico concentrado (Vetec) e o detergente Extran (Merck).

As amostras de formulações farmacêuticas analisadas foram obtidas a partir da diluição de soluções oftálmicas comerciais de dois fabricantes adquiridas no comércio local: Colírio a e Colírio b, cujos excipientes da formulação encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Composição das matrizes das soluções oftálmicas analisadas.

Colírio:	Excipientes das soluções oftálmicas
Colírio a	ácido bórico, sulfato de sódio, cloreto de sódio, tiloxapol, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio e água purificada
Colírio b	ácido bórico, cloreto de sódio, sulfato de sódio, ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e água purificada

3.2. Instrumentação

As AuNPs foram sintetizadas utilizando uma chapa de aquecimento com agitação magnética (1-1500 RPM) e controle de temperatura de 50 a 350°C (Go stirrer, MS-H-Pro, Go-lab, Alemanha).

Para a caracterização das AuNPs, imagens das nanopartículas foram obtidas, com um microscópio eletrônico de varredura com canhão de elétrons por emissão de campo (FESEM, JSM-6701F), operado em modo de varredura por transmissão (STEM, 30 kV com uma distância de trabalho de 6,1 mm).

Os espectros eletrônicos foram obtidos com um espectrofotômetro UV/Vis/NIR, Lambda 19 a Perkin Elmer (EUA) com banda espectral passante de 10 nm e velocidade de varredura de 0,01 nm min⁻¹, operado no modo de duplo feixe, usando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, e fazendo-se a varredura na faixa de 400 a 900 nm. Entre a troca de padrões (bem como das amostras) fez-se necessário a lavagem da cubeta com o detergente Extran e água ultrapura, para garantir que não houvesse efeito de memória entre as análises.

As análises de cromatografia foram feitas num cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies, série 1200, Japão), equipado com um detector do tipo arranjo de diodos para medição de absorvância.

Para o preparo de soluções padrões e dispersões, utilizaram-se micropipetas reguláveis de 100 a 1000 µL, de 20 a 200 µL, de 5000 a 1000 µL (Brand, Alemanha). Todas as micropipetas foram calibradas em um laboratório integrante

da Rede Brasileira de Calibração-RBC (Laboratório de caracterização de fluidos – LCF/PUC-Rio). Uma pipeta volumétrica calibrada de 10,00 mL e balões volumétricos calibrados de 100,00 mL e 50,00 mL foram utilizados para o preparo das dispersões-mãe de AuNPs.

Para o pré-tratamento de desnaturação de proteínas em saliva, utilizou-se uma centrífuga (Thermoscientific, modelo Sorwal Biofugue Stratus, EUA) operando a 3000 RPM e um agitador vortéx (Phoenix, AP 56, EUA).

Para as medições de pH, utilizou-se pHmetro modelo mPA 210 (σ pH = 0,01), Tecnopon (Piracicaba, São Paulo, Brasil).

3.3. Procedimentos para o preparo de soluções, dispersões e tratamento de amostras

3.3.1. Análises espectrofotométricas no UV-vis

Soluções estoque foram preparadas diluindo-se quantidades apropriadas de sulfato de AMG (tobramicina, amicacina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, canamicina) para obtenção de soluções finais com concentrações de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (soluções da ordem de concentração superior a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram diluídas duas vezes consecutivas para alcançar a concentração final desejada). Para a análise dos interferentes, também se preparou as soluções padrão estoque em procedimento análogo.

Prepararam-se dispersões diluídas em água usando 40% v/v da dispersão estoque de AuNPs ($3,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) que foram convenientemente nomeadas de “dispersão-mãe”, esta foi utilizada no preparo das dispersões de trabalho.

Para o preparo das dispersões de trabalho, tomaram-se balões volumétricos de 5,00 mL e adicionaram-se 4,00 mL da dispersão-mãe de AuNPs. A concentração de AuNPs nas dispersões de trabalho foi $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$. Para variação da faixa de concentração, adicionaram-se diferentes volumes de solução de AMG $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, avolumando-se cada balão, com água ultra purificada, até a marca de aferição. As amostras foram preparadas de maneira análoga. Foi observado que as dispersões de trabalho não poderiam ser preparados em tubos Falcon® (material plástico), pois as AuNPs adsorvem na superfície dos mesmos, desse modo, fez-se necessário realizar todo o preparo das dispersões balões

volumétricos de vidro. Após o uso, toda a vidraria foi devidamente lavada com detergente Extran e deixada 12 h em solução aquosa de ácido nítrico 15% v/v, posteriormente foram enxaguadas com água destilada e água ultrapura, repetindo-se o processo de lavagem por cinco vezes.

Para validação do método para TBR, os testes de interferência foram feitos sob as mesmas condições de preparo das dispersões de trabalho, adicionando-se volumes determinados de soluções dos possíveis interferentes, fixando-se concentração de TBR no meio em $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Os testes de estabilidade da sonda foram feitos de maneira análoga, variando-se as condições de pH e o tempo de análise (escolhendo-se como referência utilizou-se a dispersão-branco, que é a dispersão de trabalho sem adição de AMG, e uma dispersão de trabalho na presença de TBR em concentração próxima ao meio da faixa de resposta linear de TBR na sonda).

As amostras de saliva foram coletadas de dois voluntários: um indivíduo do sexo masculino com 44 anos de idade (saliva M) e um indivíduo do sexo feminino (Saliva F), com 26 anos de idade e fumante habitual. O fluido biológico foi coletado após três horas de ingestão de comida e após lavagem bucal com aproximadamente 50 mL de água destilada. Posteriormente, os voluntários colocaram uma gota ou duas do medicamento Tobrex em cada olho e a saliva foi coletada antes do uso do colírio (branco) e nos tempos: 5, 30, 60 e 120 min.

As amostras de saliva passaram por um pré-tratamento de desnaturação de proteínas, tomando-se uma alíquota de 300 μL de saliva, e adicionando-se 300 μL de solução aquosa de ácido perclórico (7% v/v), submetendo-se a mistura à agitação Vortex por 5 min e à centrifugação (3000 RPM) por 15 min. Posteriormente, o procedimento seguiu de maneira similar ao preparo das dispersões de trabalho, utilizando-se amostras com e sem o pré-tratamento de desnaturação.

3.3.2.

Análises por Cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras para análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram feitas reproduzindo-se o método de Beulac *et al.* (1996). A derivatização química foi feita adicionando-se 170 μL de padrão de TBR, amostra ou branco a um tubo

de vidro contendo 90 μL de solução de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (180 g por litro de metanol), 60 μL de solução tampão borato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 9,3) e 670 μL de metanol. Submeteu-se a mistura à agitação e aquecimento à 70°C por 30 min. As medições foram feitas após o esfriamento das mesmas à temperatura ambiente. Utilizou-se uma coluna C18 fase reversa (Zorbax SB-C18, 4,6 x 25 cm, partículas de diâmetro médio de 4 μm) e a detecção foi feita por fotometria de absorção em 350 nm. A separação cromatográfica foi realizada em regime isocrático com 66% de fase orgânica (86,67% de acetotitrila/ 13,33% de metanol) e 34% de solução tampão de fosfato de potássio (10 mmol L^{-1} ; pH 3,5) . As injeções da amostra foram feitas com um volume de 50 μL com eluição da fase móvel por um fluxo de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$.

3.3.3.

Análises por microscopia eletrônica por varredura de transmissão (STEM)

As amostras para as análises por STEM não passaram por tratamentos específicos. Foram analisadas as AuNPs colocando-se microalíquotas das dispersões coloidais sobre grades de carbono e deixando-as secar à temperatura ambiente para posterior análise por STEM. O mesmo procedimento foi utilizado para a análise da dispersão-branco, da dispersão de trabalho contendo padrão de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e da dispersão de trabalho contendo padrão de ESP ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), preparadas conforme indicado anteriormente.

As análises por STEM foram feitas considerando-se o procedimento padrão: colocou-se a grade contendo a amostra na cela, fez-se um pré-vácuo na pré-câmara, introduziu-se a amostra na câmara realizando-se um vácuo na mesma. Em seguida, alinhou-se o canhão de elétrons e o detector em relação à amostra, garantindo desse modo que a transmissão eletrônica fosse medida simultaneamente com a varredura do feixe. As imagens foram obtidas ajustando-se as lentes para aproximação e visualização da AuNPs.

3.4. Sínteses de nanopartículas de ouro

Para evitar eventuais erros com relação às massas de citrato de sódio pesadas, decorrentes da hidratação do mesmo, realizou-se uma etapa preliminar de secagem do sal à 100°C por 3h em estufa. Este procedimento foi realizado antes do preparo de todas as soluções de citrato utilizadas neste trabalho (sínteses I, II, III e IV).

3.4.1. Síntese I: ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio monobásico

A síntese foi feita seguindo o tradicional método de Turkevich (Turkevich, 1951). Em um béquer de 600 mL, pesou-se 43 mg de ácido cloroáurico e adicionou-se 475 mL de água ultrapura. Levou-se à solução até o ponto de ebulição e submeteu-se a mesma à agitação magnética (500 RPM). Sob agitação, adicionou-se à solução 25,00 mL de solução de citrato de sódio monobásico (1% m/v), deixando-se o sistema sob as mesmas condições por 5 min.

3.4.2. Síntese II: ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio tribásico

A síntese foi feita seguindo o tradicional método de Turkevich (Turkevich, 1951). Em um béquer de 600 mL, pesou-se 43 mg de ácido cloroáurico e adicionou-se 475 mL de água ultrapura. Levou-se à solução até o ponto de ebulição e submeteu-se a mesma à agitação magnética (500 RPM). Sob agitação, adicionou-se 25,00 mL de uma solução de citrato de sódio tribásico (1% m/v), deixando-se o sistema sob as mesmas condições por 5 min.

3.4.3. Síntese III: cloreto de ouro reduzido por citrato de sódio tribásico

A síntese foi feita a partir de adaptações do tradicional método de Turkevich (Turkevich, 1951). Em um béquer de 600 mL, adicionaram-se 500 mL de água ultrapura para ser aquecida, em banho-maria, até a ebulição (100°C). Colocou-se o sistema sob agitação magnética (700 RPM) e adicionou-se ao béquer,

simultaneamente, 4,00 mL de uma solução de cloreto de ouro (1% m/v) e 20,00 mL de uma solução de citrato de sódio tribásico (0,05 mol L⁻¹). Deixou-se o sistema sob as mesmas condições de agitação e aquecimento por 15 min.

3.4.4.

Síntese IV: cloreto de ouro reduzido por citrato de sódio monobásico

Em um béquer de 600 mL, adicionou-se 500 mL de água ultrapura e submeteu-se à aquecimento em banho-maria, até a ebulição (100°C). Em seguida, ligou-se a agitação magnética (700 RPM) e adicionaram-se, simultaneamente, 4,00 mL de solução de cloreto de ouro (1% m/v) e 20,00 mL de solução de citrato de sódio monobásico (0,05 mol L⁻¹). Deixou-se o sistema sob as mesmas condições de agitação e aquecimento por 15 min.

A Tabela 4 apresenta um quadro de resumo das condições de síntese das AuNPs estudadas neste trabalho.

Tabela 4: Rotas sintéticas para o preparo das dispersões aquosas das AuNPs.

Sínteses ^a	Citrato de sódio	Concentração do citrato (mol L ⁻¹)	pH da dispersão	Procedimento
I ^b	Monobásico	2,3 x 10 ⁻³	3,8	Aquecimento da solução de ouro e posterior adição do sal de citrato. ^d
II ^b	Tribásico	1,9 x 10 ⁻³	6,6	Aquecimento da solução de ouro e posterior adição do sal de citrato. ^d
III ^c	Tribásico	1,9 x 10 ⁻³	6,7	Aquecimento do meio (água) seguido da adição simultânea do sal de ouro e do sal de citrato. ^e
IV ^c	Monobásico	1,9 x 10 ⁻³	3,7	Aquecimento do meio (água) seguido da adição simultânea do sal de ouro e do sal de citrato. ^e

^aConcentração inicial de ouro: 2,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

^bFonte de ouro: HAuCl₄

^cFonte de ouro: AuCl₃

^dAquecimento à 100°C e 5 min de reação com o sistema sob agitação após a adição do citrato.

^eAquecimento à 100°C e 15 min de reação após a adição dos reagentes.

3.5. Desenvolvimento e validação de métodos

O bom desempenho de uma técnica analítica depende da qualidade das medidas instrumentais e da confiabilidade estatística dos cálculos que a envolvem. A aplicabilidade e o alcance de um determinado método podem ser determinados através da estimativa dos parâmetros de mérito, em uma etapa conhecida como validação (Ribeiro *et. al.*, 2008). A validação de um método analítico é, portanto, o processo que demonstra a adequação deste para o uso pretendido, sendo isso parte da garantia da qualidade analítica do resultado. A validação inclui a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validação do método (Barros, 2002).

Os parâmetros de mérito são os indicadores quantitativos do conteúdo e do desempenho das técnicas. A literatura as descrevem como: seletividade, ajuste da curva analítica e determinação da sua faixa de linearidade, sensibilidade do método, representada pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez (Ribeiro *et. al.*, 2008).

3.5.1. Parâmetros analíticos de mérito

O desenvolvimento de um método analítico ou a implementação de um método conhecido, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência, este processo é chamado de validação. O objetivo da validação é demonstrar o quanto determinado método é adequado ao seu propósito (Brito *et. al.*, 2003). Ter validado um resultado significa que o procedimento, que inclui desde as condições de operação do equipamento até toda a sequência analítica, seja aceito como correto. A validação deve ser efetuada após seleção, desenvolvimento e otimização dos métodos (Silva e Alves, 2006).

Segundo a norma NP EM ISSO/IEC 17025, validação é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos. A validação de um método deve ser adaptada ao método, sendo progressivamente mais importante para as seguintes situações: (i) Extensões e/ou modificações de métodos

normalizados; (ii) métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização prevista; (iii) métodos não normalizados; (iv) métodos criados e desenvolvidos pelo próprio laboratório (Mendes, 2010).

Os parâmetros de validação, em geral, seguem os mesmos requisitos, mas, podem sofrer variações com relação à nomenclatura de acordo com o órgão regulamentador escolhido. No presente trabalho, escolheu-se trabalhar conforme as normas do INMETRO, adequando-as às exigências da IUPAC (Danzer e Curie, 1998; Pereira *et al.*, 2011).

3.5.1.1.

Faixa de Trabalho e Faixa Linear

Em um método analítico instrumental, é importante que haja uma função que associe o sinal avaliado à concentração do analito, usualmente, é preferível que a função associada seja linear. Segundo Flávio Leite (2008), *“calibração é o conjunto de operações que estabelece, sob condições específicas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição, valores representados por uma medida materializada, ou um material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidos por padrões”*.

O intervalo do método analítico (faixa de trabalho) corresponde à faixa do maior ao menor nível de concentração do analito que possa ser determinada com precisão e exatidão (Brito *et al.*, 2003). A faixa linear pode ser definida como sendo a faixa de trabalho na qual o método analítico produz resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito (Barros, 2002). Em outra definição mais específica, a faixa linear é considerada a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante (Leite, 2008).

A linearidade da resposta de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico (variável dependente y_i) é linearmente proporcional à sua concentração (variável independente x_i). A equação matemática que descreve esta relação é chamada de curva analítica. O ajuste da equação matemática é usualmente feito pelo método dos mínimos quadrados, no qual a melhor curva será aquela que fornecer o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o

sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (\hat{y}_i), para um conjunto de N pontos experimentais, conforme a equação 18 (Ribeiro *et al.*, 2008).

$$Q = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (18)$$

O ajuste da curva pelo método dos mínimos quadrados fornecerá os coeficientes de regressão, que no caso de um ajuste linear, Equação 19, são os coeficientes linear, Equação 20, e angular, Equação 21 (Ribeiro *et al.*, 2008).

$$(y_i = a_0 + a_1 x_i) \quad (19)$$

$$(a_0 = \bar{y} - a_1 \cdot \bar{x}) \quad (20)$$

$$(a_1 = \Sigma[(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})] / \Sigma(x_i - \bar{x})^2) \quad (21)$$

Uma vez conhecidos, estes coeficientes poderão ser utilizados para encontrar a concentração da espécie de interesse nas amostras analisadas. A adequação do ajuste da curva é fornecida pelo coeficiente de correlação, r, que é a razão da covariância entre a concentração, x, e o sinal analítico, y, com o produto dos desvios padrões de x, conforme a equação 22 (Ribeiro *et al.*, 2008).

$$r = \frac{\Sigma(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\Sigma(x_i - \bar{x})^2 \Sigma(y_i - \bar{y})^2)}} \quad (22)$$

O coeficiente de correlação apresenta uma faixa de magnitude entre $-1 \leq r \leq 1$, sendo que quanto mais próximo de 1 (reta de inclinação positiva) ou -1 (reta de inclinação negativa), menor será o erro em y e, portanto, melhor será o ajuste da função matemática escolhida à curva analítica (Ribeiro *et al.*, 2008).

Apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva analítica. Métodos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de trabalho podem fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que a função linear não seja adequada para descrever a relação entre as variáveis dependentes e independentes. A análise do gráfico de resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva. Uma curva bem ajustada deve apresentar erros com distribuição uniforme, média zero, variância constante (homocedasticidade) e ausência de amostras atípicas (Ribeiro *et al.*, 2008).

3.5.1.2. Sensibilidade do método

A sensibilidade da curva analítica representa a variação no sinal de resposta pela variação da unidade de concentração do analito, sendo, portanto refletida na inclinação da curva analítica. A sensibilidade da calibração não indica quais as diferenças de concentração que podem ser detectadas; faz-se necessário considerar o ruído presente nos sinais de resposta. Por esse motivo, é comum o uso de outro parâmetro: a sensibilidade analítica. Esta é representada pela razão entre a inclinação da curva analítica e o desvio padrão do sinal analítico a uma dada concentração do analito (Skoog, 2006).

A sensibilidade de um método pode ser melhor definida através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O LD é a menor concentração do analito de interesse que pode ser detectada pelo método, ao passo que o LQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método (Ribeiro *et al.*, 2008).

3.5.1.2.1. Limite de detecção (LD)

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas, não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas, constitui o limite de detecção (Brito *et al.*, 2003). Para métodos quantitativos é indicada a utilização do método sinal/ruído, que considera a sensibilidade analítica do método e o desvio padrão das medidas de dispersões-branco (Ribeiro *et al.*, 2008).

De acordo com Skoog *et al.* (2006), “O limite de detecção é a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança. Toda técnica analítica possui um limite de detecção. Para os métodos que empregam uma curva de calibração, o limite de detecção é definido como a concentração analítica que gera uma resposta com um fator de confiança k superior ao desvio padrão do branco, s_b (Equação 23).”

$$LD = (3s_b)/a \quad (23)$$

Onde, a é a sensibilidade da calibração, 3 é o fator de confiança, k , a um nível de confiança de 98,5% e s_b é o desvio padrão obtido a partir de dez medidas do branco (atendendo às normas da ANVISA e do INMETRO).

3.5.1.2.2. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação ou limite de determinação corresponde, na prática, ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco (Pereira *et al.*, 2011). O limite de quantificação do método analítico é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais especificadas (Barros, 2002). Para processos analíticos instrumentais que exibem a linha de base (tal como o espectro de absorção), o procedimento sinal/ruído também pode ser utilizado, entretanto, a constante k passa a ter valor de acordo com a incerteza desejada, que é, em geral 10, conforme a Equação 24.

$$LQ = (10s_b)/a \quad (24)$$

3.5.1.2.3. Seletividade e especificidade

De acordo com Barros (2002), “a especificidade do método analítico refere-se à capacidade de medir com exatidão o analito em presença de outros componentes ou interferentes que possam estar presentes na matriz da amostra.” O método mais usual para determinar a especificidade, é a determinação do analito de interesse em amostras fortalecidas com os interferentes presentes na matriz.

O termo especificidade é utilizado, muitas vezes, como sinônimo de seletividade, entretanto, possuem definições diferentes uma vez que a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias (Brito *et al.*, 2003).

A especificidade e a seletividade estão diretamente relacionadas à detecção do analito: a especificidade refere-se a um método específico para um único analito e a seletividade refere-se a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles (Silva e Alves, 2006).

3.5.1.3. Robustez

A robustez de um método é a capacidade do mesmo em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão (Ribeiro *et al.*, 2008).

A robustez deve ser investigada na etapa de desenvolvimento do método e é feita avaliando-se as variações do sinal analítico em função das alterações feitas nos parâmetros do método (Barros, 2002). Os testes de robustez servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado (Brito *et al.*, 2003).

3.5.1.4. Tendência/Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. A limitação deste procedimento é que o analito não se encontra presente na mesma matriz que compõe amostra (Pereira *et al.*, 2011).

A recuperação é obtida através da relação entre a concentração obtida empiricamente e a concentração prevista para amostras fortificadas, conforme a Equação 25.

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{valor}_{\text{observado}}/\text{valor}_{\text{esperado}}) \times 100 \quad (25)$$

3.5.1.5. Precisão

A precisão é determinada para condições específicas de medição, podendo ser expressa de diferentes formas, no presente trabalho, optou-se por apresentar a precisão sobre a forma de repetitividade e precisão instrumental.

A repetitividade foi avaliada a partir do desvio entre cinco medidas de diferentes padrões com mesma concentração (avaliando-se a dispersão-branco e duas dispersões de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹). A precisão instrumental foi avaliada a partir do desvio entre dez medidas consecutivas de um mesmo padrão (avaliando-se a dispersão-branco e duas dispersões de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹). Repetindo-se a avaliação por três vezes em diferentes dias.

4

Resultados e discussão: Avaliação do potencial analítico de nanopartículas de ouro sintetizadas por diferentes rotas

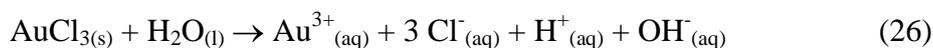
A síntese tradicional de Turkevich tem sido utilizada como referência para preparação de AuNPs, sendo que várias adaptações propostas na rota sintética original são encontradas na literatura visando à obtenção de sistemas adequados às aplicações almejadas.

Ao longo deste trabalho percebeu-se que o tipo do citrato de sódio (monobásico ou tribásico) utilizado como precursor de síntese afeta diretamente as características do complexo de AuNPs formado, já que o pH do meio reacional é influenciado por esta escolha. Desse modo, dois tipos de sínteses baseadas no procedimento de Turkevich foram realizados tanto com o citrato monobásico quanto com o citrato tribásico (totalizando quatro tipos de síntese).

Uma das adaptações da rota sintética de Turkevich difundida na literatura (e utilizada no presente trabalho) consiste na alteração do momento da adição do agente precursor: Turkevich, originalmente, promoveu o aquecimento do sistema com o agente precursor (ácido cloroáurico) presente no meio aquoso, adicionando o agente redutor (citrato de sódio), rapidamente e com agitação vigorosa, quando o sistema atingia 100 °C. Na adaptação testada aqui, adicionou-se simultaneamente o agente precursor e o agente redutor na água apenas quando esta alcançou a temperatura de 100 °C (Melo Jr. *et al.*, 2012; Turkevich *et al.*, 1951). Essa pequena alteração faz com que a nucleação seja mais rápida do que a do método original, alterando o diâmetro final das AuNPs formadas.

No presente trabalho, dois tipos de agentes precursores foram utilizados, o cloreto de ouro (III) e o ácido cloroáurico (ambas as soluções com a mesma concentração de Au). Uma vez que a concentração utilizada do agente precursor é inferior em uma ordem de grandeza à concentração de citrato empregada, o tipo do agente redutor utilizado possui efeito determinante com relação ao pH final do meio reacional. Além disso, uma vez solvatado, o cloreto de ouro se converte em

ácido cloroáurico, em duas etapas conforme indicado na Equação 26 e na Equação 27 (Patnaik, 2002).



Conforme pode-se perceber, a formação do ácido cloroáurico será limitada pela quantidade de íons cloreto advindos da solvatação do cloreto de ouro (III), entretanto, a reação de substituição para formação do complexo metálico (Equação 11) ocorrerá independentemente do complexo quadrado planar de partida $[\text{AuCl}_4]^{-}$, que advêm do ácido cloroáurico. A solubilização do cloreto de ouro (III) gerará os mesmos hidroxí-complexos vistos na Equação 11, com produto final dependente exclusivamente do pH do meio (Paitnaik, 2002).

No procedimento testado conforme a rota de Turkevich, utilizou-se a mesma concentração inicial de Au^{3+} no meio reacional ($2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em conformidade com o procedimento original reportado pelo autor. Contudo, ao converter-se todas as concentrações, relacionando-as com a quantidade de matéria presente no volume total do meio (mol L^{-1}), percebe-se algumas alterações na concentração do agente redutor. Turkevich descreve a concentração do citrato de sódio em termos do percentual de massa de sal em relação ao volume da solução (% m/v), dessa forma, as diferenças entre as massas molares dos diferentes tipos de citrato implicarão em diferentes concentrações iniciais do agente redutor ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para o citrato monobásico e tribásico, respectivamente), entretanto, em ambas a ordem de grandeza é a mesma. No procedimento adaptado que descreve o preparo da solução do citrato de sódio em mol L^{-1} , não houve esse problema, por isso, independentemente do tipo do citrato utilizado, a concentração inicial do agente redutor foi fixada em $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Tabela 4).

Outra diferença importante entre as rotas sintéticas utilizadas diz respeito ao tempo de reação. No método reportado por Turkevich, as condições de aquecimento e agitação do sistema são mantidas por 5 min após a adição do agente redutor, ao passo que, na adaptação aqui apresentada tem-se um tempo de reação de 15 min. Todas estas condições estão resumidas na Tabela 4.

As diferenças entre as AuNPs sintetizadas (mantendo-se constante concentração do precursor de Au) evidenciou alterações em relação ao tipo do agente redutor e à forma de adição dos reagentes (que afeta a nucleação das AuNPs). Com os experimentos realizados não se pode afirmar a mudança de um tipo de fonte de Au para outra teve relevância nas características observadas. As AuNPs obtidas foram avaliadas na presença de um representante dos AMG, a substância TBR, visando se obter o melhor desempenho de resposta óptica da dispersão aquosa de AuNPs (sonda) em função da presença de AMG. Os resultados obtidos para cada abordagem de síntese de AuNPs e o efeito óptico destas em relação à presença de TBR são mostrados a seguir.

4.1.

Síntese I: Ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio monobásico

A síntese I foi feita conforme procedimento original descrito por Turkevich (1951). Conforme mencionado, Turkevich não especificou, em seu trabalho original, o tipo do citrato de sódio utilizado. Tal informação seria importante para saber qual pH seria obtido no meio reacional, tendo em vista que o tipo do agente redutor modificará essa variável do sistema, refletindo na estrutura do complexo formado. A síntese I, utilizando citrato de sódio monobásico, produziu uma dispersão coloidal com pH 3,8.

As imagens de microscopia das AuNPs obtidas por essa abordagem indicaram a formação de nanopartículas que se afastam do formato esférico descrito na literatura, de forma que o alongamento proporciona um formato oval ao produto (Figura 14A). Além disso, percebeu-se que as AuNPs não estão muito separadas, apresentando uma tendência para a aglomeração. Em contraponto, a imagem por microscopia eletrônica apresentada no trabalho de Turkevich (Turkevich *et al.*, 1951) indicaram nanopartículas esféricas e bem dispersas no meio aquoso. Tais diferenças podem ter ocorrido em função de alterações no processo de separação intra-partícula, ou seja, a agitação magnética utilizada pode não ter sido vigorosa o suficiente para promover uma boa separação das nanopartículas no volume de solução coloidal. Uma vez que o meio de síntese I apresentou pH ácido (3,8), o processo de aglomeração aleatória pode não ter sido acompanhado por uma etapa subsequente eficiente na separação das

nanopartículas. Além disso, a baixa eficiência da agitação mecânica pode ter interferido também na primeira etapa de nucleação, implicando em desvios da homogeneidade percebidos nas imagens.

A análise morfológica das imagens foi feita através do programa *Image J* (*FIJI*)⁸ conforme indicado na Figura 14B. O programa faz uma separação entre o plano de fundo da imagem e as AuNPs, facilitando, desse modo, a avaliação quantitativa das dimensões das partículas de forma a se obter informações com relação às dimensões dos eixos, à área e à tendência de circularidade de cada uma das AuNPs num espaço amostral determinado.

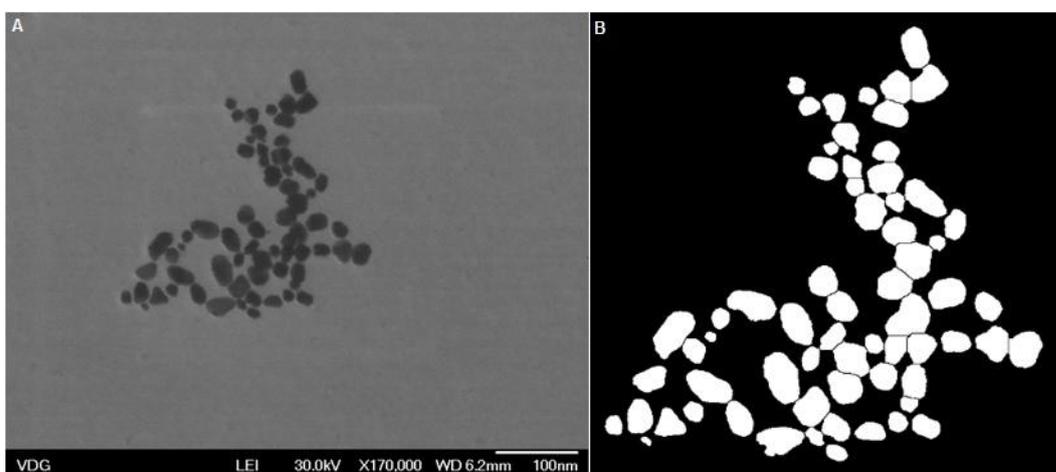


Figura 14. Imagens por STEM das AuNPs obtidos a partir da dispersão coloidal da síntese I: (A) imagem original; B) imagem após processamento através do programa Image J (FIJI).

Na Figura 15 são apresentados os histogramas relacionados à morfologia das AuNPs obtidas a partir da síntese I. Pode-se perceber uma variação das dimensões do eixo maior de 5 a 40 nm, (Figura 15A) e do eixo menor de 5 a 30 nm (Figura 15B), além disso, a maior parte das AuNPs apresentaram um eixo maior, em torno de 25 nm, e um eixo menor, em torno de 12,5 nm. Considerando-se esta faixa obteve-se um diâmetro médio de 17,6 nm, e este valor

⁸ *Image J* (FIJI): O programa é um projeto “open source” com contribuições voluntárias para o desenvolvimento e melhorias do mesmo. É apoiado, direta ou indiretamente por quatro instituições: Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics (Dresden, Alemanha); Institute of Neuroinformatics (University of Zurich, Suíça); European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg, Alemanha); Laboratory for Optical Computational Instrumentation (Wisconsin, EUA). O programa foi aceito como um programa pertencente ao Google Summer of code, estando disponível em rede aberta, em 2009.

foi considerado para a estimativa da concentração da dispersão estoque das AuNPs obtidas na síntese I. Conforme pode ser visto na Figura 15C, a razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), indica que a maior parte das nanopartículas conserva entre si uma boa relação de proporcionalidade, de modo que a maioria possui razão de aspectos entre 1,0 e 1,4. Isso indica a baixa variação de tamanho entre o eixo maior e o eixo menor. Percebe-se também que o eixo maior possui, no máximo, dimensões 2,8 vezes maiores do que o eixo menor. O histograma indica que uma fração importante das nanopartículas conserva boa proporcionalidade entre as dimensões do eixo maior e do eixo menor (ver barra que indica aspecto com valor 1,0 na Figura 15 C).

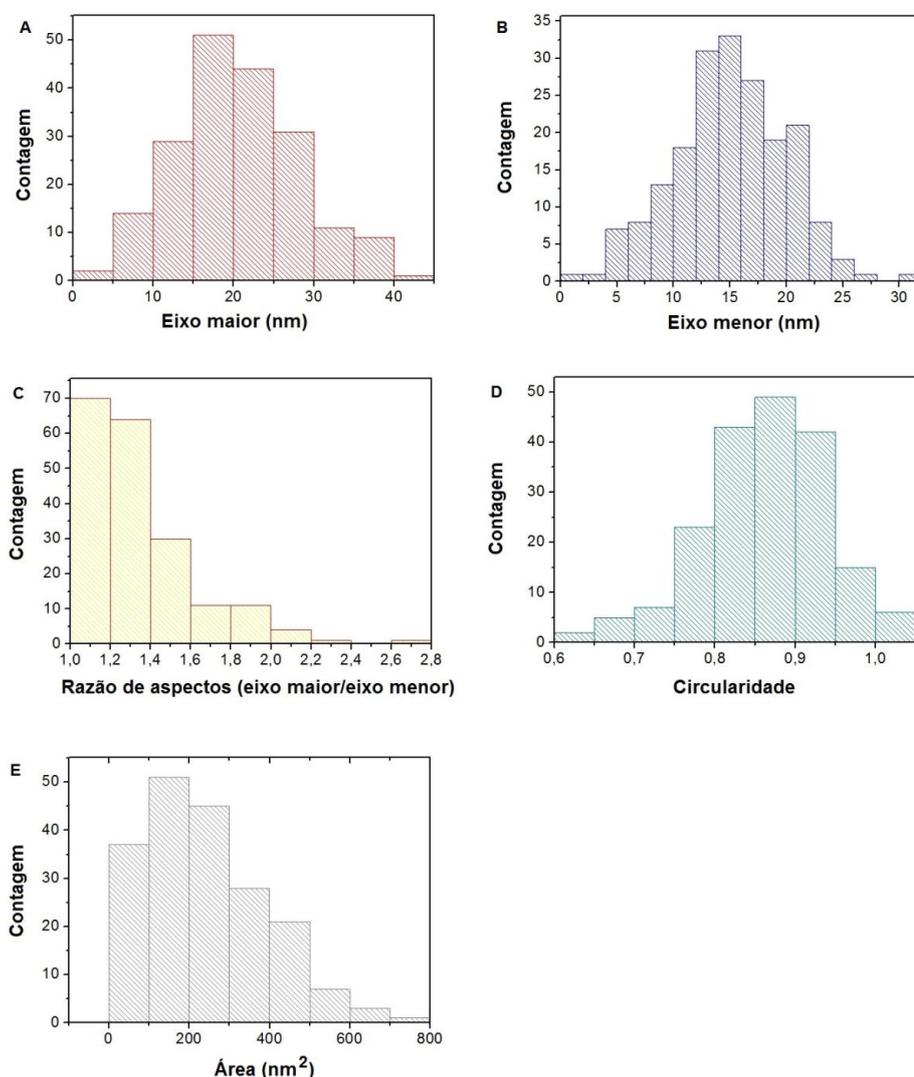


Figura 15. Histogramas referentes ao processamento das imagens da AuNPs (obtidas a partir da síntese I) que relaciona as dimensões das nanopartículas: A) Eixo maior, B) Eixo menor, C) Razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), D) Circularidade; E) Área.

Pelos valores de circularidade, pode-se perceber que as partículas, apesar de alongadas, tendem a apresentar um perfil circular razoável. Isso foi confirmado pela fração das AuNPs com valores de circularidade variando de 0,80 a 0,95 (Figura 15D). É importante ressaltar que partículas totalmente esféricas apresentam circularidade igual a 1. Com relação à área, pode-se verificar que a maior parte das AuNPs apresentou um valor de área de 100 a 300 nm² (Figura 15E). Através dos valores apresentados nos histogramas (Figura 15), obteve-se uma média das dimensões das AuNPs selecionadas no espaço amostral proporcionando um resumo do resultado do processamento das imagens, trazendo uma visão geral a respeito dos tamanhos médios das AuNPs (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados das características morfológicas da AuNPs obtidas a partir da síntese I.

Médias das dimensões da AuNPs					
Eixo maior (nm)	Eixo menor (nm)	Diâmetro médio (nm)	Razão de aspectos	Circularidade Média	Área (nm ²)
20,3 ± 7,7	14,9 ± 5,0	17,6 ± 6,4	1,3 ± 0,2	0,85 ± 0,07	242,2 ± 153,5

Conforme mencionado, a concentração final de AuNPs na dispersão pode ser calculada a partir do diâmetro médio das nanopartículas (Equação 9 e Equação 10), assim sendo, tomando-se o diâmetro médio das AuNPs indicado na Tabela 5, estimou-se a concentração de AuNPs obtida na síntese I em $1,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

Para o estudo da eficiência da dispersão aquosa dessas AuNPs como sonda analítica para determinação espectrofotométrica de TBR, foram preparadas a dispersão- branco (dispersão de trabalho na ausência de TBR) e seis dispersões, cada uma na presença de padrões de TBR de forma que as concentrações finais do AMG variaram de $8,0 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Deste modo, pode-se avaliar a linearidade da resposta óptica (logaritmo da razão entre potência radiante incidente e a potência radiante transmitida; tendo em vista que as contribuições do efeito de espalhamento da radiação são maiores do que as contribuições por absorção, não é coerente denominar o sinal da sonda como absorvância) obtida nessa faixa de concentração. Cada curva analítica foi repetida por três vezes, para se avaliar a repetibilidade dos resultados, resumidos nos perfis dos espectros eletrônicos de um dos ensaios da Figura 16.

Tanto a dispersão-branco quanto as dispersões contendo TBR foram preparados a partir da diluição de alíquotas de uma dispersão-mãe com concentração de $6,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ de AuNPs, proveniente da diluição em 2,5 vezes da dispersão-estoque das AuNPs, mantendo-se assim a concentração de AuNPs constante em $4,8 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ em todas as dispersões cujo sinal óptico foi medido.

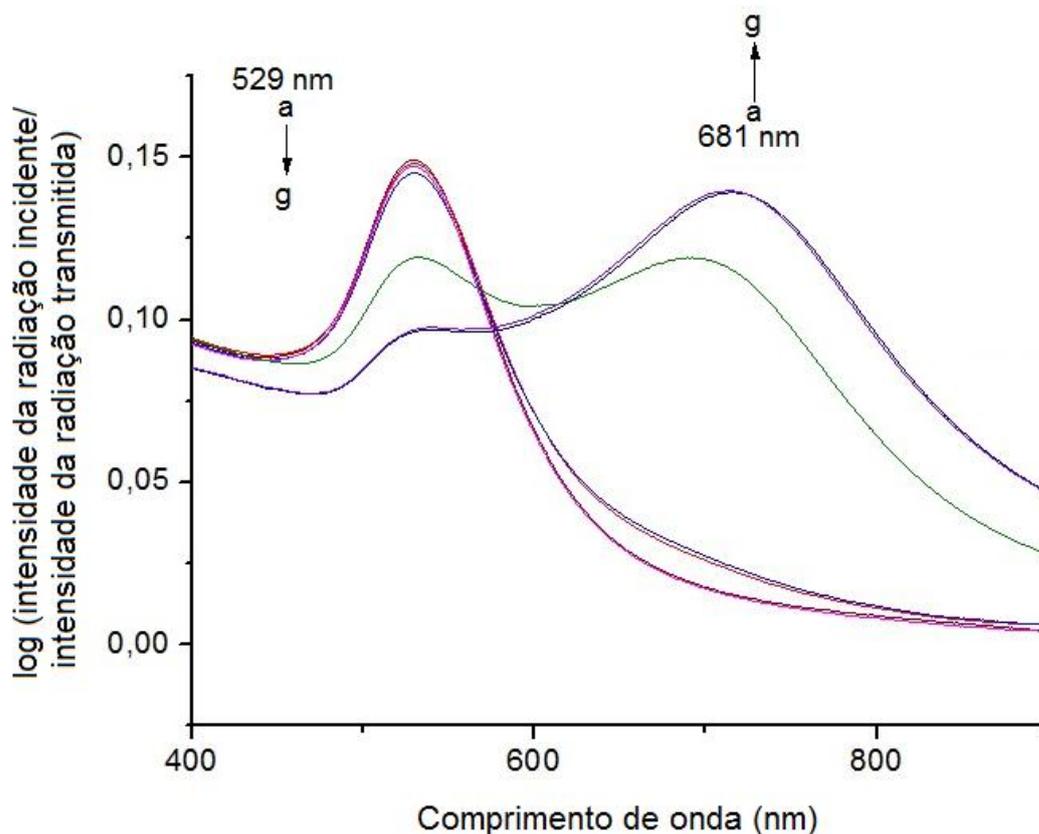


Figura 16. Espectros das dispersões de AuNPs da síntese I na ausência e na presença de diferentes concentrações de TBR. Linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 2,8; 6,0; 10; 16 [$\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$]).

Conforme pode ser visto na Figura 16, a dispersão-branco apresenta um perfil característico para AuNPs com uma banda com máximo em 529 nm, resultante da polarização transversal que ocorre com a incidência da radiação eletromagnética nas AuNPs com diâmetros próximos à 20 nm. Observou-se que o incremento de TBR no meio provoca a diminuição da intensidade dessa banda com faixa nos 500 nm com o concomitante surgimento de uma banda espectral na faixa de 700 nm, cujo aumento de intensidade foi proporcional ao aumento de concentração de TBR no meio. Essa banda foi resultante da formação de um

complexo TBR-AuNPs que provoca a aglomeração das AuNPs. A banda espectral na faixa de 700 nm é resultante da polarização longitudinal que ocorre com a incidência da radiação eletromagnética em AuNPs com diâmetros na faixa de 100 nm, comprovando a aglomeração das AuNPs em presença de TBR. A formação de complexos entre TBR e AuNPs provoca aumento dos diâmetros das nanopartículas, o que implica no deslocamento do comprimento de onda máximo da banda, de maneira que, a cada incremento de concentração de TBR, percebe-se um deslocamento batocrômico da banda. Para efeito de medição de incremento no sinal analítico, escolheu-se o comprimento de onda de 681 nm, onde um melhor perfil linear de resposta foi observado, este comprimento de onda foi padronizado devido aos resultados da síntese IV (que serão apresentados adiante). Pode-se observar que o deslocamento da intensidade máxima na região de 700 nm reflete na perda de linearidade do método ao monitorar-se o sinal da sonda nesta banda.

Na Figura 17A e na Figura 17B apresentam-se as curvas nas quais o monitoramento dos sinais analíticos foram feitos em 529 (Figura 17A) e em 681 nm (Figura 17B). Pode-se perceber que em ambos os comprimentos de onda, os sinais da dispersão contendo padrão de TBR com concentração igual a $2,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (quarto ponto das curvas) encontram-se deslocados com relação à faixa de resposta linear e que na dispersão contendo a concentração mais elevada de TBR ($1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) o sinal tem uma variação contrária (incremento de sinal em 529 nm e decréscimo de sinal em 681 nm) ao esperado em relação à tendência do padrão de resposta das dispersões contendo TBR em concentrações mais baixas. Isso pode ser uma indicação de saturação da sonda. Retirando-se esses dois pontos, obtêm-se um melhor comportamento linear da resposta produzida pelo TBR na sonda, como pode ser visualizado na Figura 17C e Figura 17D.

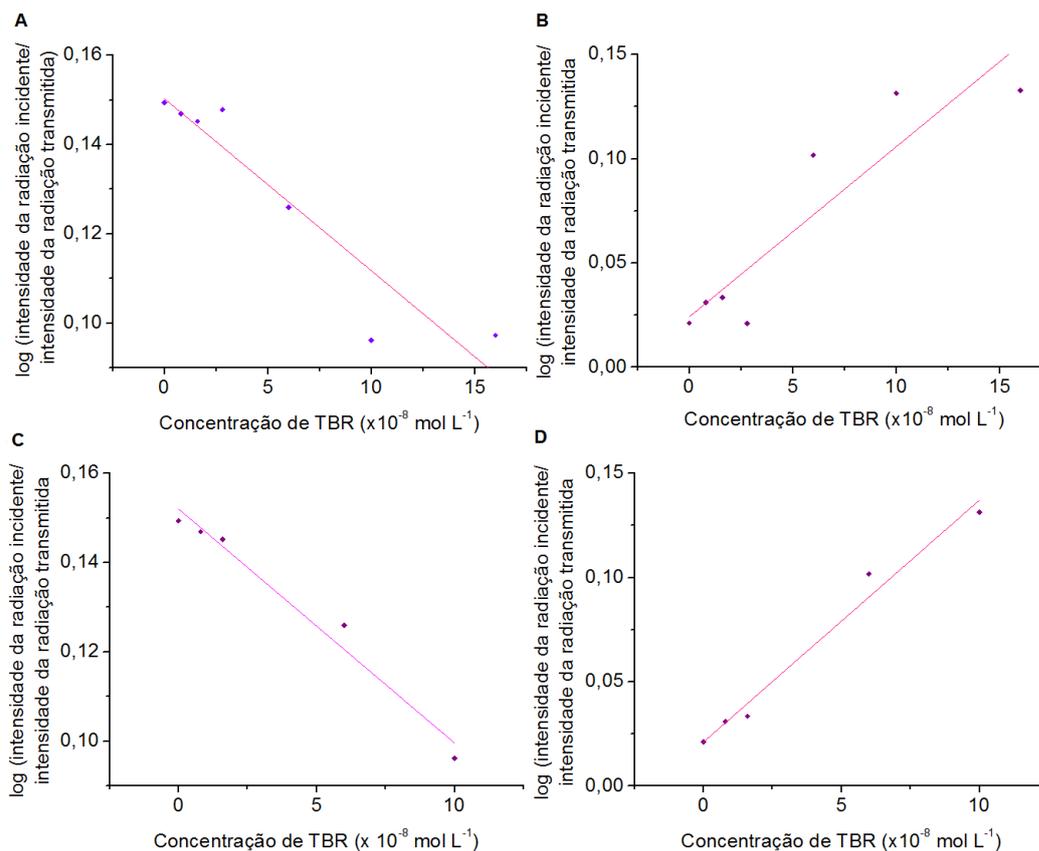


Figura 17. Resposta óptica das dispersões de AuNPs (obtidas a partir da síntese I) em função do aumento da concentração de TBR: A) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm, em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = (0,1503 \pm 0,0047) - (3,8527 \times 10^5 \pm 6,1580 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,8641$); B) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = (0,0241 \pm 0,01219) + (8,1623 \times 10^5 \pm 1,6066 \times 10^5) X$; $R^2 = 0,80527$); C) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm, apenas na faixa linear (equação da curva: $Y = (0,1520 \pm 0,0027) - (5,2397 \times 10^5 \pm 4,8881 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9661$); D) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm apenas na faixa linear (equação da curva: $Y = (0,0210 \pm 0,0050) + (1,1605 \times 10^6 \pm 9,4878 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9738$).

Avaliando-se a repetibilidade da resposta da sonda em função das quantidades crescentes de TBR em três ensaios diferentes, pode-se perceber que houve uma maior variação nos sinais analíticos medidos em 681 nm do que os medidos em 529 nm. Os diagramas do tipo *Box-Plot*, apresentados na Figura 18^a e na Figura 18B trazem uma representação visual desses desvios. Em termos de coeficientes de variação (C.V.), Figura 18C, essa tendência é confirmada já que aqueles para o sinal monitorado em 681 nm chegam a 10% enquanto que aqueles monitorados em 529 nm não passam de 4%. Pode-se observar que há uma tendência de menor repetibilidade para os padrões com concentrações de TBR na região central da faixa linear (Figura 18), tal fenômeno pode ser decorrente da relação entre os sítios das AuNPs disponíveis para a interação e a quantidade de

AMG na dispersão para promover a aglomeração das mesmas, desse modo, a interação pode induzir à formação de diferentes complexos a depender do modo com que os AMG promoverão a aglomeração das nanopartículas.

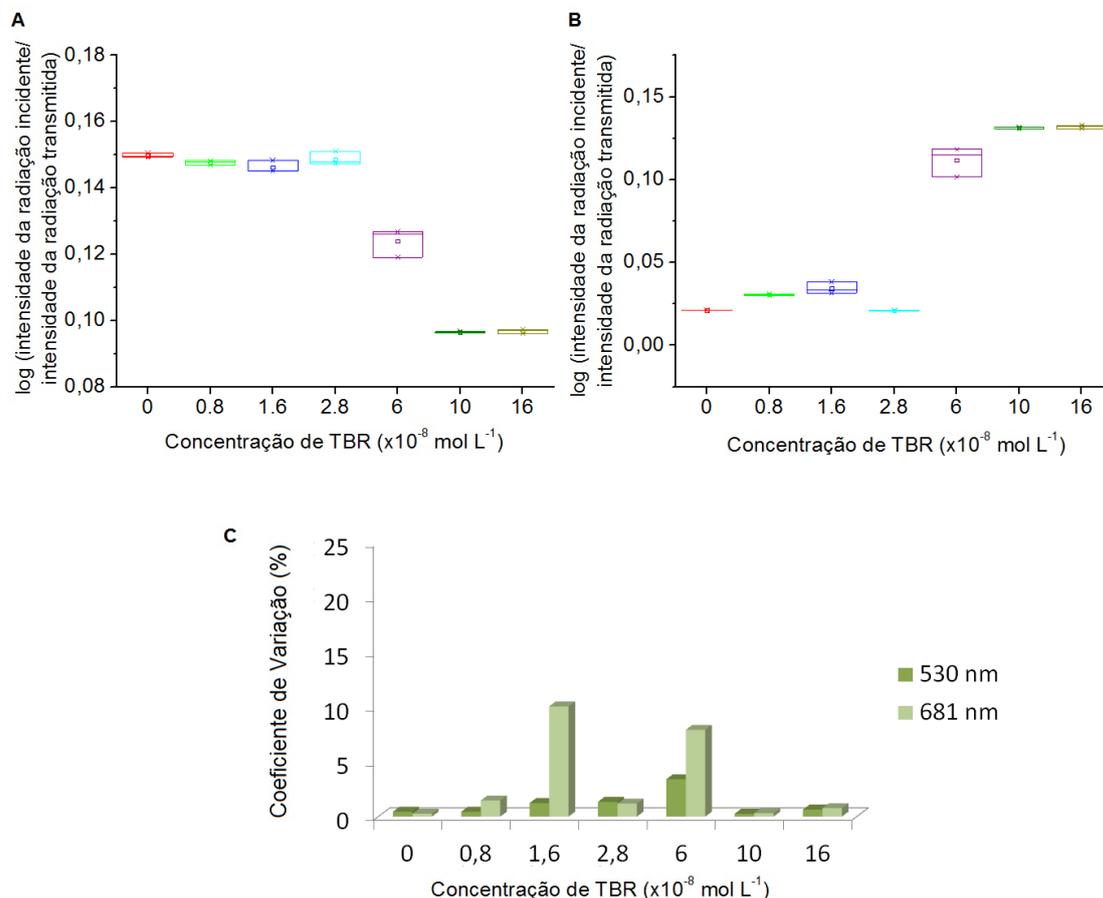


Figura 18. Diagramas *Box plot* avaliando os desvios entre os sinais, $\log(I_0/I)$, da sonda de AuNPs (produzida através da síntese I) na presença de quantidades crescentes de TBR: A) 529 nm; B) 681 nm. C) Coeficientes de variação dos sinais da sonda na presença de concentrações crescentes de TBR levando em consideração três ensaios com monitoramento em 529 nm e 681 nm.

Conforme pode ser visualizado na Tabela 6, considerando-se a faixa linear da curva de $8,0 \times 10^{-9}$ mol L $^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$, e retirando-se o resultado do quarto padrão ($2,8 \times 10^{-8}$), que pode apresentar um erro de concentração decorrente da preparação dessa dispersão de trabalho, confirma-se o panorama apresentado na Figura 20. Isto é, os valores dos coeficientes de determinação foram mais elevados ao monitorar-se o sinal analítico em 529 nm do que em 681 nm, sendo este um indicativo de que, para as AuNPs produzidas na síntese I, há um maior potencial de desenvolvimento de sonda analítica para determinação de TBR ao selecionar-se o comprimento de onda 529 nm.

Tabela 6. Parâmetros das curvas obtidas com a sonda das AuNPs da síntese I na presença de TBR e com monitoramento do sinal em em 529 e 681 nm, considerando-se a faixa de resposta linear.

Parâmetros analíticos:	Equação da curva em 529 nm	R ² (529 nm)	Equação da curva em 681 nm	R ² (681 nm)
Curva 1	$Y=(0,1520\pm 0,0026)-[(5,2397\times 10^5)\pm (4,8881\times 10^4)]X$	0,9661	$Y=(0,02103\pm 0,0050)+[(1,1605\times 10^6)\pm (9,4878\times 10^4)]X$	0,9738
Curva 2	$Y=(0,1537\pm 0,0028)-[(5,3526\times 10^5)\pm (5,3827\times 10^4)]X$	0,9607	$Y=(0,02346\pm 0,0085)+[(1,1934\times 10^6)\pm (1,6158\times 10^5)]X$	0,9305
Curva 3	$Y=(0,1518\pm 0,0012)-[(5,4903\times 10^5)\pm (2,3181\times 10^4)]X$	0,9929	$Y=(0,02163\pm 0,0107)+[(1,2178\times 10^6)\pm (1,9470\times 10^5)]X$	0,9051

Tendo-se como base os resultados obtidos na faixa de resposta linear (considerando a triplicata), avaliou-se a interação das AuNPs com TBR por meio de uma análise estatística simples das variáveis: (i) coeficiente linear R^2 , (ii) o coeficiente angular (m), (iii) coeficiente de determinação (R^2) e (iv) o valor de sinal da dispersão-branco e de duas dispersões centrais da faixa linear (com concentrações de TBR de $1,6 \times 10^{-8}$ e $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). Os resultados (média, desvio padrão e C.V.) dos parâmetros obtidos nos dois comprimentos de onda monitorados estão apresentados na Tabela 7.

A principal análise feita diz respeito aos coeficientes de determinação obtidos, pois estes são bons indicativos da linearidade da resposta analítica. Também foi observado o C.V. para as dispersões-branco (n=3) e para dispersões na presença de TBR em duas concentrações diferentes, apenas como indicação da tendência de repetibilidade da resposta óptica da sonda.

Conforme pode ser visto na Tabela 7, monitorando-se o sinal analítico em 529 nm observaram-se menores valores de R^2 e de C.V. comparando-se com os obtidos ao monitorar-se o sinal em 681 nm. Também pode ser visto que, avaliando-se a resposta analítica em 681 nm, os valores de R^2 e de coeficiente linear apresentam maiores desvios do que em 529 nm, indicando uma baixa tendência de repetibilidade da resposta em 681 nm, tendência essa que é reiterada

pelos altos valores de C.V. entre os sinais medidos para as dispersões-branco e dos padrões em 681 nm.

Tabela 7. Análise dos dados da interação entre a AuNPs (síntese I) e TBR na faixa de resposta linear da sonda usando dados da triplicata das curvas da Tabela 5.

Monitoramento em 529 nm			
Variável	Média	Desvio padrão	C. V. (%)
Coefficiente linear	0,1525	0,0010	0,68
Coefficiente angular	$-5,3609 \times 10^5$	$1,2549 \times 10^4$	2,34
R²	0,9732	0,0172	1,77
log (I₀/I) para a dispersão-branco	0,1497	0,0007	0,44
Sinal da dispersão na presença de TBR 1,6 x 10⁻⁸ mol L⁻¹	0,1462	0,0018	1,24
Sinal da dispersão na presença de TBR 6,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹	0,1240	0,0042	3,41
Monitoramento em 681 nm			
Variável	Média	Desvio padrão	C. V. (%)
Coefficiente linear	0,0220	0,0013	5,74
Coefficiente angular	$1,1906 \times 10^6$	$2,8726 \times 10^4$	2,41
R²	0,9365	0,0347	3,71
log (I₀/I) para a dispersão-branco	0,0212	$5,7735 \times 10^{-5}$	0,27
Sinal da dispersão na presença de TBR 1,6 x 10⁻⁸ mol L⁻¹	0,0344	0,0035	10,07
Sinal da dispersão na presença de TBR 6,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹	0,1118	0,0089	7,93

Por fim, foi feita uma avaliação a respeito da variação do valor de pH da dispersão aquosa na presença de diferentes concentrações de TBR (Figura 19), constatando-se que não houve tendência de variação provocada pela presença de TBR (média do valor de pH igual a $3,82 \pm 0,01$). É válido salientar também que a diferença entre o valor de pH da dispersão-branco (na ausência de TBR) foi de apenas 0,13 unidades em relação ao valor de pH da dispersão-estoque da síntese I, podendo-se considerar, portanto que a diluição não provocou alterações significativas no pH do meio.

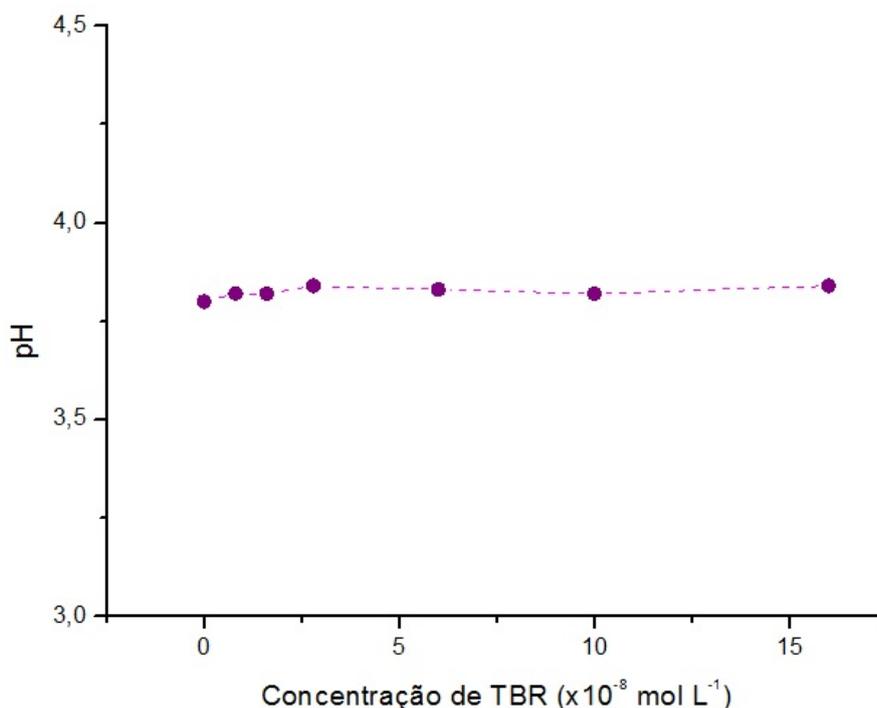


Figura 19. Variação do valor de pH nas dispersões de AuNPs (síntese I) em função do aumento de concentração de TBR.

4.2.

Síntese II: ácido cloroáurico reduzido por citrato de sódio tribásico

A síntese II foi realizada com citrato de sódio tribásico como agente redutor e o ácido cloroáurico como agente precursor. Esta rota sintética seguiu o procedimento original descrito por Turkevich (1951). Ao final da síntese, o pH medido para a dispersão de AuNPs (dispersão original de síntese) foi de 6,67, podendo-se atribuir a mudança do valor de pH para uma outra faixa, em relação ao obtido com a síntese I, à alteração do tipo do agente redutor.

Conforme pode ser observado na Figura 20, as imagens das AuNPs (obtidas de acordo com o procedimento de síntese II) indicaram a formação de partículas aparentemente mais esféricas e mais separadas do que as observadas com a síntese I, entretanto, ao comparar-se com as imagens das AuNPs apresentadas por Turkevich no seu trabalho pioneiro, ainda percebe-se que as partículas se apresentam mais aglomeradas. Tendo em vista que essas AuNPs encontram-se em meio próximo à neutralidade (pH 6,67), o processo de nucleação deve ser diferente do que a que ocorreu na síntese I. Em meio com pH próximo à neutralidade, após a formação do complexo, a nucleação e o crescimento ocorrem mais vagarosamente no meio coloidal (Casanova, 2010). Sendo assim, poder-se-ia

esperar a obtenção de uma dispersão com AuNPs mais homogêneas e com dimensões maiores, entretanto as imagens das AuNPs obtidas pela síntese II não mostram essas diferenças previstas (Figura 20).

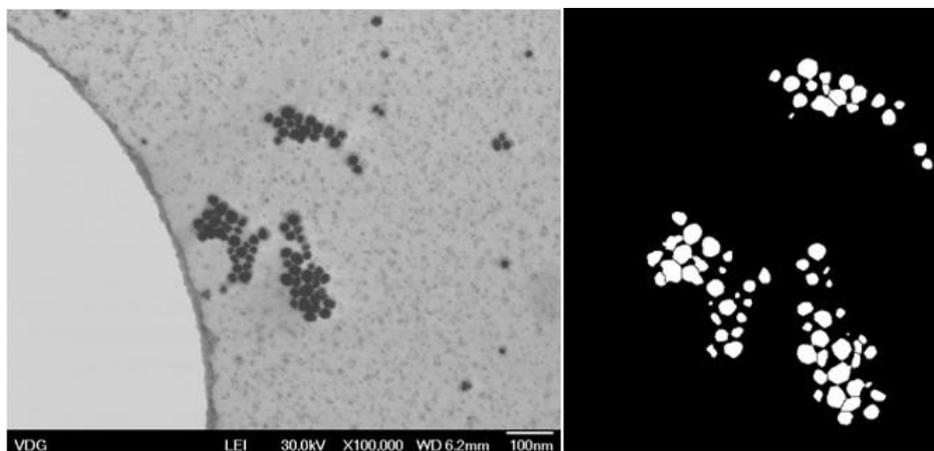


Figura 20. Imagens por STEM das AuNPs obtidos a partir da síntese II: A) imagem original; B) imagem após processamento através do programa *Image J (FIJI)*.

O processamento das imagens (Figura 20B) permite perceber que as partículas, apesar de menores, não apresentam um aspecto visual tão homogêneo quanto o previsto para as condições de síntese. Ainda assim, quando se comparam as informações quantitativas obtidas com as análises morfológicas das AuNPs da síntese I com as da síntese II, percebe-se que as AuNPs dessa última síntese apresentaram maior homogeneidade. A observação dos histogramas deixa essas diferenças ainda mais evidentes. Conforme pode ser visto na Figura 21A, a avaliação das dimensões do eixo maior das nanopartículas indica que maior parte das AuNPs possui dimensões do eixo variando de 15 a 25 nm. Já a análise feita no histograma da Figura 21B (eixo menor) indicou menor população de AuNPs com diâmetros variando de 10 a 25 nm. Todavia atribui-se um diâmetro médio de 17,5 nm às AuNPs obtidas a partir da síntese II.

Apesar das AuNPs da síntese I e da síntese II apresentarem diâmetros médios de 17,60 e 17,55 respectivamente, pode-se observar que o histograma das AuNPs da síntese II apresentam variação ligeiramente menor em relação as dimensões do eixo menor.

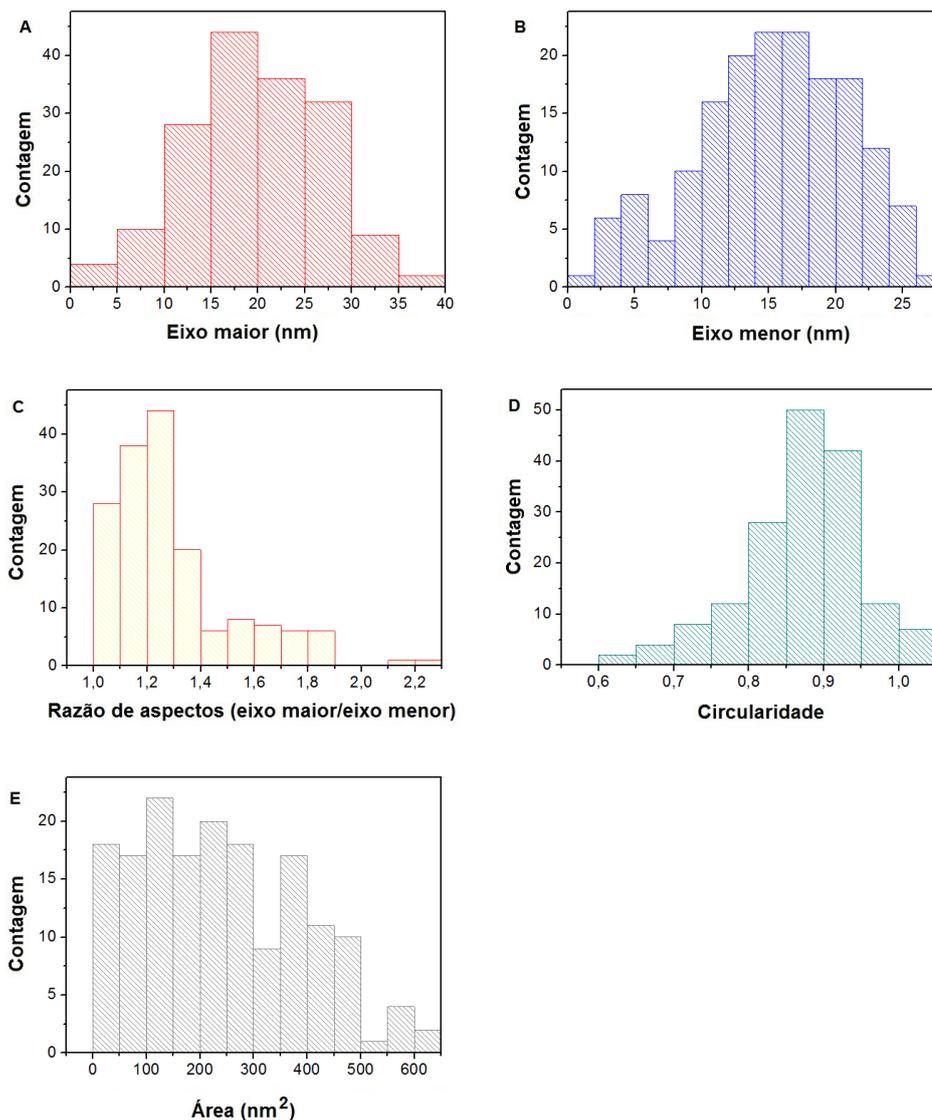


Figura 21. Histogramas referentes ao processamento das imagens da AuNPs (obtidas a partir da síntese II) que relaciona as dimensões das nanopartículas: A) Eixo maior, B) Eixo menor, C) Razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), D) Circularidade; E) Área.

Observando-se o histograma para a razão de aspectos dessas AuNPs (Figura 21C), tem-se que a maior parte das nanopartículas apresenta razão entre o eixo maior e o eixo menor variando de 1,1 a 1,3, e que o eixo maior é, no máximo 2,2 vezes maior do que o eixo menor. Desse modo, pode-se inferir que as AuNPs da síntese II conservam maior proporcionalidade entre as dimensões de seus eixos do que a AuNPs da síntese I.

Com relação à circularidade, o histograma apresentado para essas AuNPs (Figura 21D) indicou que elas possuem formato mais esférico do que o das AuNPs da síntese I. A maior parte das AuNPs da síntese II apresentam circularidade variando de 0,85 a 0,95 ao passo que as AuNPs da síntese I possuem

circularidade entre 0,80 e 0,95. Tendo em vista que a circularidade é uma grandeza que varia de 0 a 1, a diferença de 0,5 unidades é muito significativa com relação à tendência esférica de partículas.

A maior heterogeneidade das AuNPs da síntese II relaciona-se às suas áreas. De acordo com o mostrado na Figura 21E, as nanopartículas possuem uma grande variação de área num intervalo que é consideravelmente maior do que o apresentado para as AuNPs da síntese I, onde claramente a maior parte das nanopartículas tinha área entre 100 e 300 nm². Essas diferenças dimensionais também podem ser atribuídas a uma possível ineficiência da agitação mecânica. Se a rotação aplicada não for rápida e homogênea o bastante para todo o volume da solução coloidal haverá reflexos inevitáveis no processo de nucleação incorrendo no problema de formação de partículas heterogêneas.

As observações com base nos histogramas se tornam menos significativas quando obtêm-se as médias das variáveis analisadas. Conforme pode ser visto na Tabela 8, apesar da percepção das diferenças entre as AuNPs da síntese II com as da síntese I, tem-se outro panorama fundamentando-se na análise dos valores médios, onde os parâmetros avaliados para as duas partidas de AuNPs são muito similares, indicando que a mudança no agente redutor não afetou de maneira significativa o resultado morfológico do material.

Tabela 8. Resultados das características morfológicas da AuNPs obtidas a partir da síntese II.

Médias das dimensões da AuNPs					
Eixo maior (nm)	Eixo menor (nm)	Diâmetro médio (nm)	Razão de aspectos	Circularidade	Área (nm ²)
19,8 ± 7,3	15,3 ± 5,7	17,55 ± 6,5	1,2 ± 0,2	0,86 ± 0,07	240 ± 151,2

A partir do diâmetro médio das AuNPs estimou-se que a concentração das AuNPs na dispersão original da síntese II é aproximadamente $1,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

A avaliação da eficiência da dispersão aquosa de AuNPs da síntese II como sonda em relação à presença de TBR foi realizada tomando-se como base a mesma faixa de concentração de TBR ($8,0 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹). A dispersão-mãe continha $6,06 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ de AuNPs, proveniente da diluição em 2,5 vezes da dispersão-estoque. O estudo foi feito em triplicata e a concentração de AuNPs na dispersão-branco e nas dispersões de trabalho

contendo TBR foram mantidas iguais ($4,9 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$). Os perfis dos espectros obtidos a partir das dispersões na presença de cada padrão da TBR podem ser vistos na Figura 22.

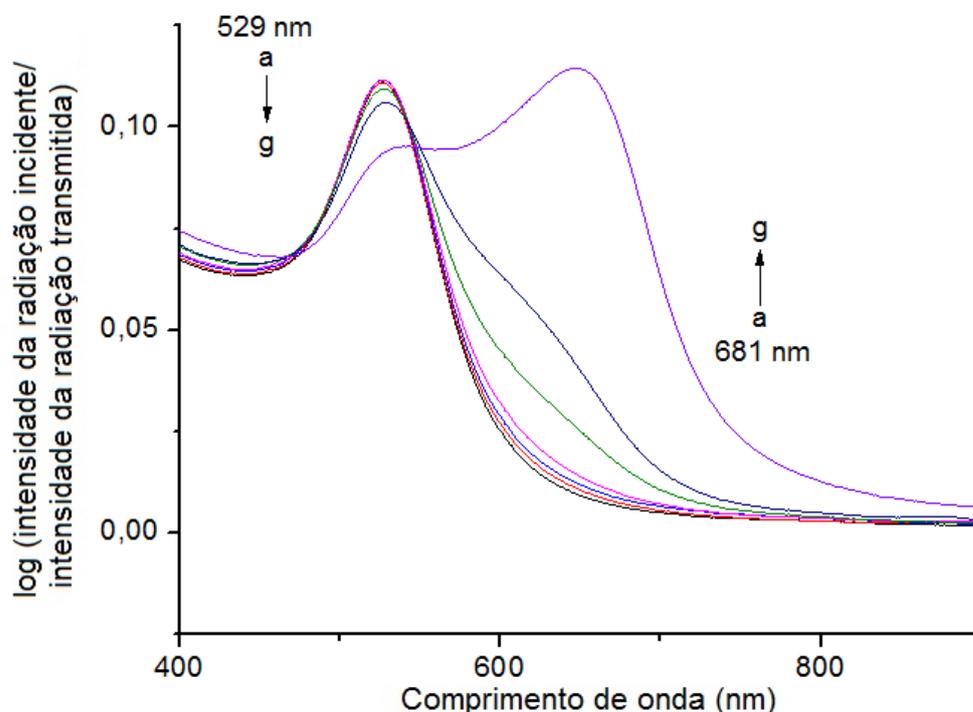


Figura 22. Espectros das dispersões de AuNPs da síntese II na ausência e na presença de diferentes concentrações de TBR. Linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 2,8; 6,0; 10; 16 [$\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$]).

Analisando-se os espectros da Figura 22, pode-se perceber que a dispersão-branco preparada com as AuNPs da síntese II apresenta o perfil previsto na literatura para AuNPs, com máximo espectral em 529 nm (polarização transversal da radiação eletromagnética). Pode-se perceber que o perfil espectral da dispersão-branco é similar ao obtido com as AuNPs da síntese I, entretanto é notória a diferença de perfil de resposta da sonda em função da presença de concentrações crescentes de TBR. Como no caso anterior, os espectros indicam que o incremento de TBR no meio promove a aglomeração nas AuNPs, comprovado pelo surgimento da banda a faixa de 700 nm com a consequente diminuição da intensidade da banda decorrente da polarização transversal (na faixa de 500 nm), porém, quando comparado com a sonda com AuNPs da síntese I, é perceptível a diminuição da tendência de resposta linear, sendo notório o efeito hipsocrômico provocado pelas dispersões de AuNPs da síntese II, quando

comparadas com as AuNPs da síntese I. Isso se deve provavelmente ao valor de pH da dispersão da síntese II, uma vez todos os resultados morfológicos obtidos para as duas sínteses não apresentaram diferenças significativas.

Conforme visto na Figura 23A, não se observou uma resposta óptica linear da sonda, preparada com as AuNPs obtida na síntese II, quando se monitora o sinal em 529 nm, havendo uma tendência de decréscimo cujo comportamento pode ser melhor representado por uma função polinomial de segundo grau. Dessa forma o potencial dessa sonda para aplicações analíticas fica prejudicado quando se visa a determinação de TBR em 529 nm.

Em contrapartida, pode-se perceber que houve uma resposta linear (monitorando-se o sinal em 681 nm) em relação ao incremento de sinal ($\log I_0/I$) em função do aumento da concentração de TBR. De acordo com a Figura 23B é notório o desvio do sinal para o padrão de maior concentração ($1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Tal fato indica que nesta concentração não há mais linearidade no comportamento analítico, podendo-se notar também que a tendência para saturação da sonda analítica é maior para esta sonda do que quando se compara com as AuNPs produzidas na síntese I: o sinal óptico da dispersão contendo maior concentração de TBR ($1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) ao ser monitorado em 681 nm, sofre um aumento brusco. Retirando-se este ponto da curva, percebe-se que a sonda apresenta uma tendência de resposta analítica linear em relação ao aumento de concentração de TBR (Figura 23C).

Assim sendo, a avaliação da resposta do sinal analítico para TBR utilizando-se como sonda a AuNPs da síntese II apresentou uma tendência de resposta linear apenas quando monitorou-se o sinal em 681 nm para a faixa de concentração de TBR de $8,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 23 C).

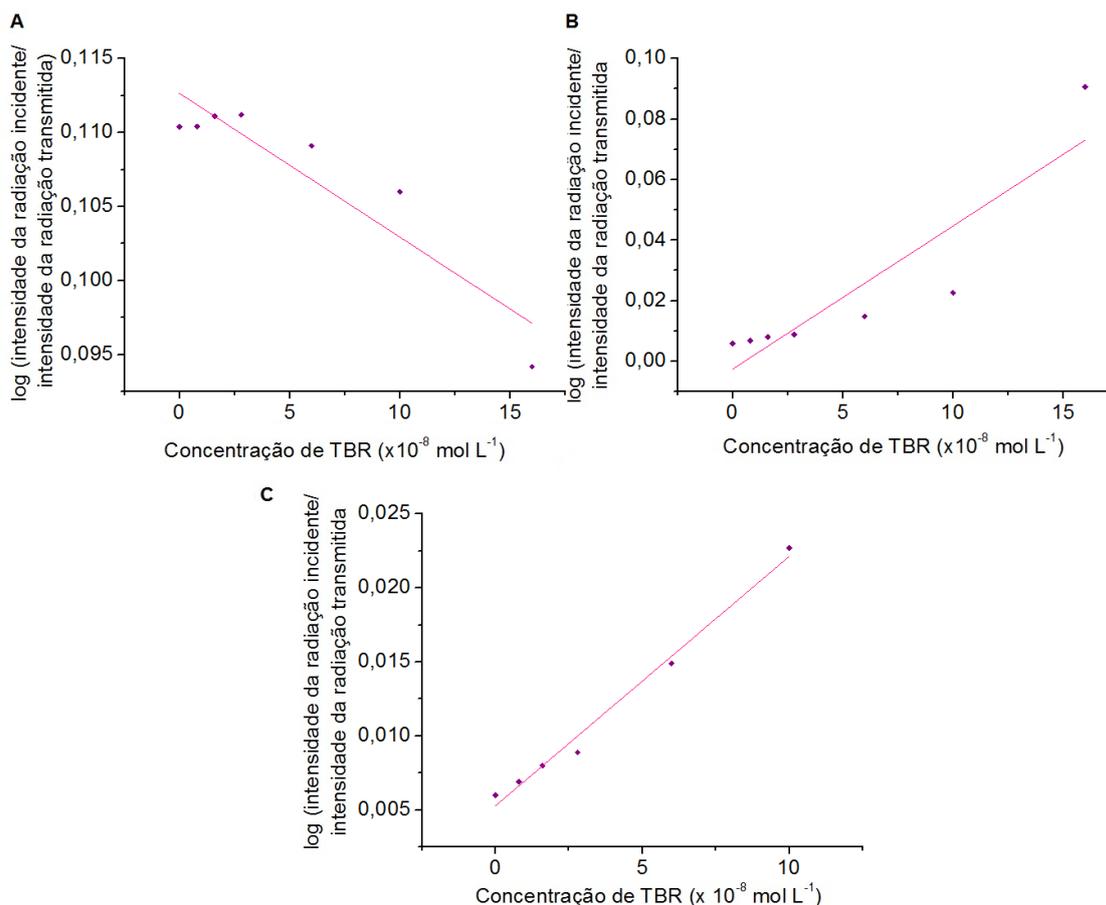


Figura 23. Resposta óptica das dispersões de AuNPs (obtida a através da síntese II) em função do aumento da concentração de TBR: A) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm, em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = (0,1126 \pm 0,0013) - (9,7020 \times 10^4 \pm 1,7620 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,8301$); B) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = -(0,0025 \pm 0,0076) + (4,7216 \times 10^5 \pm 1,0007 \times 10^5) X$; $R^2 = 0,7799$); C) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm apenas na faixa linear (equação da curva: $Y = (0,0053 \pm 0,0004) + (1,6843 \times 10^5 \pm 9,0507 \times 10^3) X$; $R^2 = 0,9857$).

Analisando-se a repetibilidade das respostas obtidas em três ensaios independentes, pode-se perceber que os valores de $\log(I_0/I)$ apresentam maior valor de C.V. quando monitora-se o sinal analítico da sonda em 681 nm (Figura 24C), todavia, essa alta variação é natural em um conjunto de valores muito baixos (tais como o sinal em 681 nm) ou muito altos. Contudo, os diagramas *Box plot* indicam que a variação entre as dispersões é maior quando ocorre o monitoramento do sinal em 529 nm (Figura 24A e Figura 24B).

Pode-se notar também que, ao se fazer o monitoramento em 681 nm, o sinal da sonda (AuNPs), obtida na síntese II, apresenta desvio mais elevado na dispersão com maior nível de concentração de TBR (sendo que esta já não constitui mais a faixa linear de resposta).

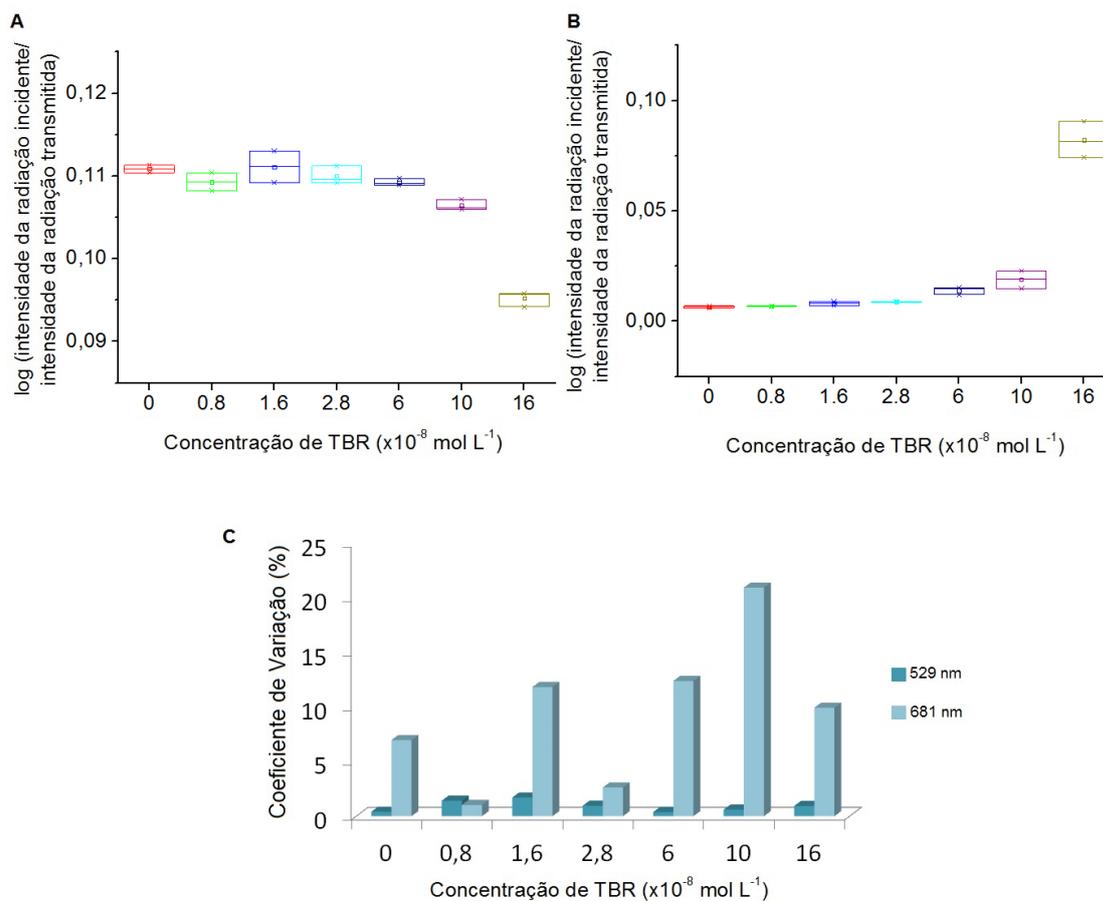


Figura 24. Diagramas *Box plot* avaliando os desvios entre os sinais, $\log(I_0/I)$, da sonda de AuNPs (produzida através da síntese II) na presença de quantidades crescentes de TBR: A) 529 nm; B) 681 nm. C) Coeficientes de variação dos sinais da sonda na presença de concentrações crescentes de TBR levando em consideração três ensaios com monitoramento em 529 nm e 681 nm.

Na Tabela 9, tem-se um panorama geral com relação aos parâmetros das curvas obtidos nos três ensaios com as AuNPs obtidas a partir da síntese II, monitorando-se o sinal tanto em 529 nm quanto em 681 nm em toda a faixa de trabalho e, apenas com o monitoramento do sinal analítico em 681 nm, dentro da faixa linear. Como seria esperado, os grandes desvios entre os sinais analíticos dos padrões refletiram diretamente nos parâmetros da curva, desse modo, pode-se notar que apesar da repetição dos valores de R^2 , os demais parâmetros da curva possuem grandes desvios entre os resultados dos três ensaios. Desse modo, pode-se esperar uma baixa repetibilidade dos resultados ao utilizar-se as AuNPs produzidas na síntese II como sonda analítica para determinação de TBR.

Tabela 9. Parâmetros das curvas obtidas com a sonda das AuNPs da síntese II na presença de TBR e com monitoramento do sinal em em 529 e 681 nm, considerando-se a faixa de trabalho, e a faixa linear.

Parâmetro da curva:	Ensaio:	$\lambda=529$ nm (faixa de trabalho)	$\lambda=681$ nm (faixa de trabalho)	$\lambda=681$ nm (faixa linear)
R^2	1	0,8301	0,7799	0,9857
	2	0,8191	0,7590	0,9757
	3	0,8547	0,7947	0,9706
	C.V. (%)	2,18	2,31	0,79
Coeficiente angular	1	-97019,7010	472164,4000	168428,8354
	2	-78876,3347	368357,6358	86478,7431
	3	-95289,3230	424577,4710	130483,7893
	C.V. (%)	11,08	12,32	31,93
Coeficiente linear	1	0,11264	-0,00252	0,00528
	2	0,1111	-0,0009	0,0063
	3	0,1135	-0,0026	0,0064
	C.V. (%)	1,08	47,80	10,41

Detalhando-se um pouco mais essa análise estatística a partir dos resultados obtidos com o sinal analítico monitorado em 681 nm, pode-se apresentar a mesma relação indicada para as AuNPs produzidas a partir da síntese I. A interação das AuNPs produzidas a partir da síntese II na presença de TBR também foi avaliada de maneira qualitativa a partir dos valores da média, do desvio padrão e dos valores de C.V. entre os resultados da triplicata. As variáveis escolhidas para a análise foram os r , m , R^2 e os valores de $\log(I_0/I)$ da dispersão-branco e os valores de $\log(I_0/I)$ de dispersões na presença de TBR em dois níveis de concentração centrais da faixa linear (concentrações de TBR de $1,6 \times 10^{-8}$ e $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). Os resultados obtidos nos dois comprimentos de onda estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Análise dos dados da interação entre a AuNPs (síntese II) e TBR na faixa de resposta linear da sonda usando dados da triplicata das curvas da Tabela 8.

Monitoramento em 681 nm			
Variável	Média	Desvio padrão	C. V. (%)
Coefficiente linear	0,0060	0,0006	10,41
Coefficiente angular	$1,2846 \times 10^5$	$4,1012 \times 10^4$	31,93
R²	0,9774	0,0077	0,79
log (I₀/I) da dispersão-branco	0,0065	0,0004	6,97
log (I₀/I) da dispersão na presença de TBR $1,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	0,0080	0,0010	11,83
log (I₀/I) da dispersão na presença de TBR $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	0,014	0,0017	12,39

Observando-se os resultados apresentados para o monitoramento do sinal em 681 nm, pode-se perceber que, apesar do valor médio de R² ser aceitável, o alto valor de C.V. para m indica que a resposta analítica da sonda de AuNPs da síntese II em função do incremento de TBR não se reproduz a contento. Isso é uma indicação da tendência de desvio de resposta linear e de baixa repetibilidade do efeito causado pela presença de TBR na sonda. A baixa precisão entre as medidas é confirmada pelos altos valores de C.V. para as dispersões na presença de TBR e para a dispersão-branco, cujos resultados são mostrados na Tabela 9.

Por fim, foi feita uma avaliação da variação do pH da sonda de AuNPs obtidas com a síntese II em função do incremento de concentração de TBR (Figura 25), averiguando-se que houve uma leve tendência de aumento do pH do meio nas primeiras adições de TBR. O valor do pH médio da dispersão foi $6,53 \pm 0,04$. Observou-se que a diluição da dispersão-estoque para as condições da sonda provocou uma diminuição do pH do meio em 0,2 unidades.

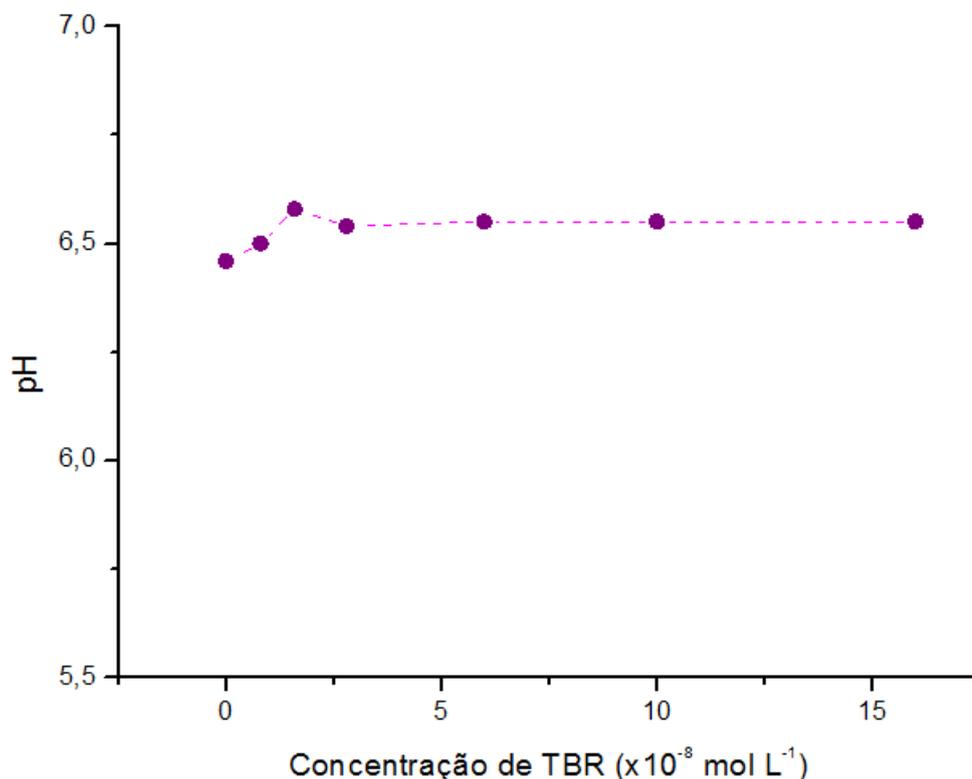


Figura 25. Variação de pH das dispersões preparadas com a AuNPs (síntese II) em função do aumento de concentração de TBR.

4.3.

Síntese III: cloreto de ouro reduzido por citrato de sódio tribásico

As AuNPs obtidas sob as condições da síntese III foram preparadas a partir de uma rota sintética que teve pequenas adaptações da síntese tradicional de Turkevich, utilizando o cloreto de ouro (III) como agente precursor com redução do mesmo por intermédio do citrato de sódio tribásico. Nesse processo a solução de cloreto de ouro (III) e intermediário citrato de sódio foram adicionados simultaneamente a um béquer contendo 250 mL de água ultrapura na temperatura de 100 °C.

As concentrações iniciais de ouro e de citrato na síntese III são as mesmas vistas no procedimento da síntese II (Tabela 4), entretanto, a síntese III apresenta algumas diferenças com relação ao procedimento: (i) apesar de ter sido utilizado o mesmo tipo de citrato nas duas sínteses, a fonte de ouro utilizada na síntese III é diferente da descrita originalmente por Turkevich; ao passo que Turkevich utilizou o ácido cloroáurico como agente precursor, nesta adaptação utiliza-se o cloreto de ouro para a mesma finalidade; (ii) no procedimento de Turkevich o

agente precursor é adicionado ao meio (água) no início da síntese e em seguida adiciona-se o agente redutor, a partir de então o sistema permanece sob aquecimento até atingir a temperatura de 100 °C. Já na rota utilizada na síntese III, o agente precursor e o agente redutor foram adicionados simultaneamente ao meio quando o mesmo se encontrou em ebulição; (iii) Na síntese III faz-se o aquecimento do meio em um sistema de banho-maria ao invés de submeter o sistema diretamente ao aquecimento como na síntese II.

Conforme visto no início deste capítulo, a alteração da fonte de ouro de ácido cloroáurico para o cloreto de ouro não induz a diferenças com relação ao aquocomplexo de ouro III formado em água, entretanto, uma vez que não encontraram-se informações a respeito da cinética de formação de tal complexo, pode-se entender que o aquecimento do agente precursor junto com o solvente (síntese II) tenda a favorecer a ocorrência completa da reação de formação do complexo. Contudo, no procedimento da síntese III é possível que não tenha havido tempo o suficiente para a formação completa e homogênea do complexo, já que os reagentes foram adicionados simultaneamente no meio, após o aquecimento.

A outra diferença que deve ser considerada entre as sínteses II e III diz respeito à forma de aquecimento do sistema: na síntese II o sistema é submetido ao aquecimento através do contato direto entre o recipiente utilizado para a reação (béquer) e a chapa aquecedora, assim, se o equipamento não produzir um aquecimento homogêneo, haverá diferenças de temperatura no meio reacional, pois o solvente, contendo soluto têm suas propriedades coligativas específicas que induz uma elevação na temperatura de ebulição. Já na síntese III o sistema é aquecido em banho-maria, sem a presença de solutos no solvente até a temperatura de ebulição, garantindo-se um aquecimento homogêneo do sistema.

Tendo em vista que os processos de nucleação e crescimento das nanopartículas serão diretamente influenciados pela temperatura, pode-se inferir que na síntese III a nucleação será mais rápida do que na síntese II e o crescimento dos cristais será mais lento e homogêneo, favorecendo a formação de AuNPs com dimensões maiores e mais alongadas na síntese III, quando compara-se com a síntese II.

Com relação à síntese I, além de serem válidas as mesmas considerações feitas na comparação com a síntese II, a previsão de obtenção de partículas

maiores é reforçada devido às diferenças de concentração do agente estabilizante. Isso se deve ao fato da quantidade do agente estabilizador (lembrando-se que o citrato atua como agente redutor assim como de estabilizador) é menor na síntese III. Assim, as nanopartículas formadas terão menor quantidade de moléculas do citrato disponíveis para o capeamento, tornando evidente a indução de um processo de crescimento que levará a formação de AuNPs com maiores dimensões e mais próximas umas das outras.

As AuNPs obtidas com a síntese III encontravam-se em um meio perto da neutralidade, com pH igual a 6,9. Pode-se perceber que a concentração do citrato tribásico, tal como visto para a AuNPs da síntese II, é o fator determinante do pH final da dispersão original da síntese.

Na Figura 26A é apresentada uma imagem das AuNPs obtidas a partir da síntese III. Pela comparação dos resultados obtidos com as sínteses I e II, pode-se perceber que as nanopartículas da síntese III apresentaram-se morfologicamente mais aglomeradas e com maiores dimensões, confirmando as expectativas. A imagem tratada (Figura 26B) mostra mais claramente o perfil alongado com claras variações entre as geometrias das AuNPs.

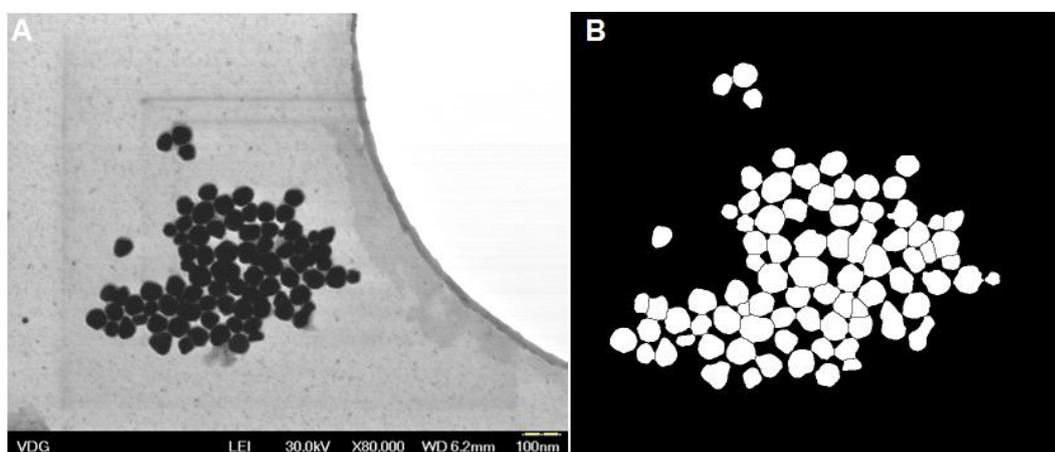


Figura 26. Imagens por STEM das AuNPs obtidos pela síntese III: A) imagem original; B) imagem após processamento através do programa *Image J (FIJI)*.

Considerando-se que ambas as dispersões obtidas, na síntese II e na síntese III, encontravam-se em meio praticamente neutro, a nucleação e o crescimento tendem a ser mais lentos. Tal fator deveria contribuir para a formação de partículas esféricas e mais separadas, porém, pode-se perceber que a temperatura do sistema e o modo de adição dos reagentes foram determinantes para a obtenção

de AuNPs mais aglomeradas e com maiores dimensões na síntese III. As diferenças entre as concentrações do citrato tribásico nos dois sistemas não seria grande o suficiente para que a atuação do agente estabilizador fosse relevante na diferença de resultados obtidos nas duas sínteses, entretanto, essa variável associada às demais condições de síntese estabeleceram a morfologia vista para as AuNPs formadas através da síntese III.

A análise morfológica das AuNPs resultantes da síntese III comprova a previsão feita para a formação de partículas maiores. Conforme indicam os histogramas que relacionam as dimensões do eixo maior e do eixo menor (Figura 27A e Figura 27B), de maneira geral, as dimensões do eixo maior variaram de 10 a 100 nm, com maior parte da amostra apresentando tamanhos entre 50 e 60 nm, ao passo que as dimensões do eixo menor variaram de 5 a 65 nm, tendo-se a maioria das nanopartículas, dimensões entre 50 e 60 nm. A observação comparativa entre os histogramas das AuNPs provenientes das sínteses I e II e da síntese III evidencia que as dimensões dos eixos apresentam-se muito maiores para esta última abordagem.

Analisando-se o histograma de razão de aspectos da AuNPs (Figura 27C), percebe-se que as dimensões do eixo maior e do eixo menor conservam uma boa proporcionalidade, tendo a maioria da população razão eixo maior/eixo menor entre 1,0 e 1,2, sendo as medidas do eixo maior até 2,4 vezes superiores às medidas do eixo menor.

Com relação ao formato das AuNPs, observou-se que estas são menos esféricas do que as das sínteses I e II. Conforme o histograma que relaciona a avaliação de circularidade (Figura 27D), a maior parte das nanopartículas apresentaram circularidade entre 0,80 e 0,90, indicando que apesar da razão de proporcionalidade entre os eixos, a geometria dos complexos formados induziu à obtenção de AuNPs que se afastam do modelo ideal esférico. Tal fato também é decorrente das diferenças nas condições de síntese, pois, o crescimento lento das nanopartículas possibilita a obtenção de AuNPs mais alongadas em uma direção, tendo em vista que o crescimento não ocorre com a mesma taxa em todas as direções. Assim percebe-se que as AuNPs provenientes da síntese III tendem a ser mais alongadas e menos esféricas do que as AuNPs obtidas através das sínteses I e II.

As AuNPs da síntese III apresentaram elevadas áreas superficiais (maioria delas com área entre 1000 e 2000 nm²). Essas grandes áreas são um reflexo direto das dimensões dos eixos encontrados para as AuNPs (Figura 27E).

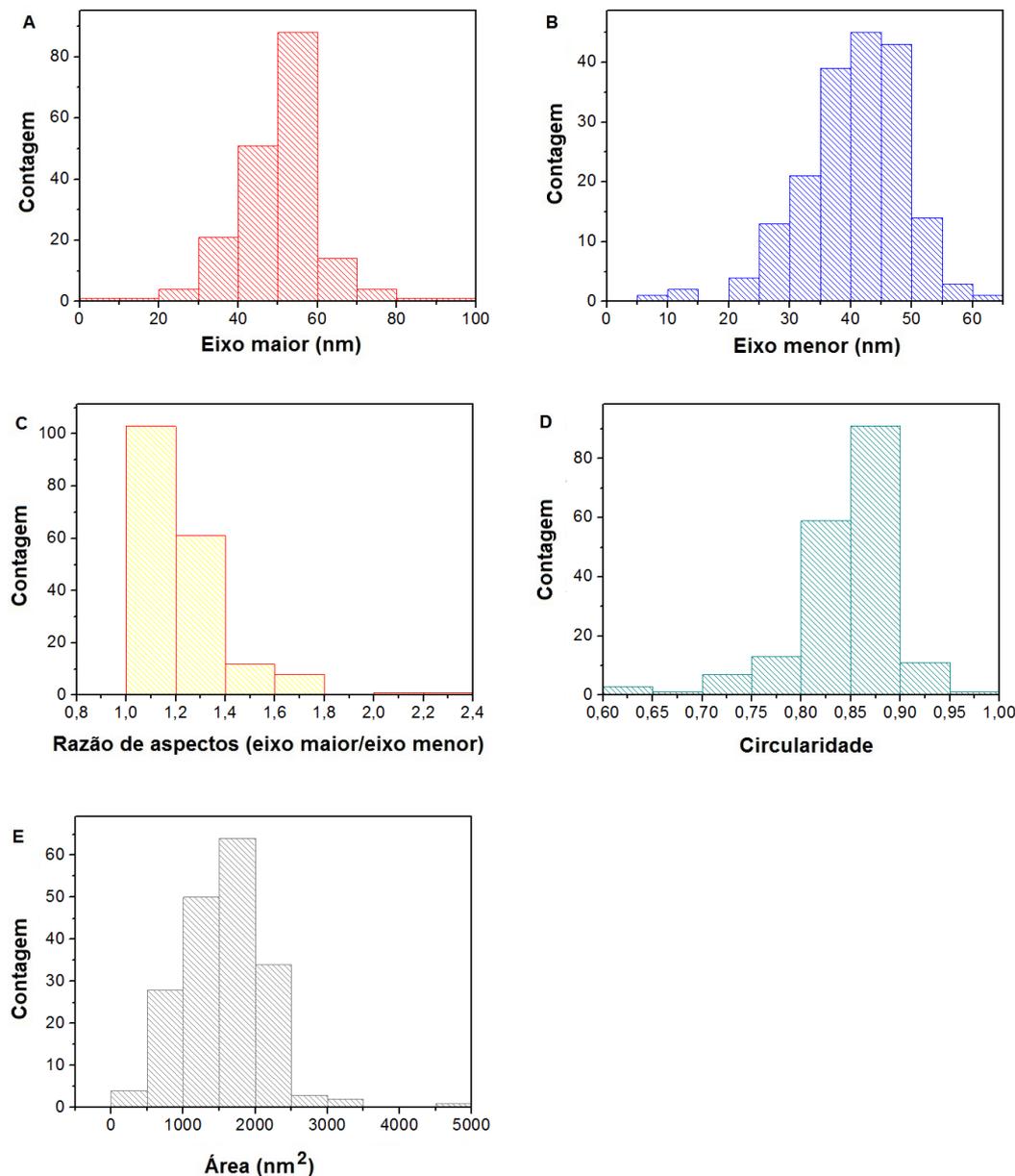


Figura 27. Histogramas referentes ao processamento das imagens da AuNPs (obtidas a partir da síntese III) e que relaciona as dimensões das nanopartículas: A) Eixo maior, B) Eixo menor, C) Razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), D) Circularidade; E) Área.

Na Tabela 11 são apresentados os valores médios obtidos para os parâmetros morfológicos dessas AuNPs. As variáveis que se relacionam diretamente com as dimensões das AuNPs obtidos com a síntese III (eixo maior,

eixo menor, diâmetro médio e área) apresentaram médias com valores de duas a três vezes superiores às médias apresentadas para as AuNPs obtidas nas duas abordagens anteriores de síntese. Em contrapartida, as AuNPs da síntese III conservaram uma boa relação de proporcionalidade entre seus eixos (razão de aspectos) e um valor de circularidade média não muito distantes dos que foram observados para as outras partidas de AuNPs.

Tabela 11. Resultados das características morfológicas da AuNPs obtidas a partir da síntese III.

Médias das dimensões da AuNPs					
Eixo maior (nm)	Eixo menor (nm)	Diâmetro médio (nm)	Razão de aspectos	Circularidade	Área (nm ²)
50,5 ± 10,6	40,7 ± 8,5	45,6 ± 9,5	1,2 ± 0,1	0,83 ± 0,05	1558,7 ± 594,6

A partir do diâmetro das AuNPs estimou-se que a concentração destas na dispersão aquosa original de síntese foi de aproximadamente $8,6 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$. Evidentemente, uma vez que o diâmetro médio dessas AuNPs é maior do que os avaliados para as outras partidas de AuNPs, sua concentração é menor, já que diâmetro das nanopartículas e sua concentração nas dispersões guardam entre si uma relação inversamente proporcional.

A avaliação da interação das AuNPs obtidas com a síntese III com a TBR foi feita da mesma maneira relatada para os casos anteriores, utilizando a mesma faixa de trabalho de concentração do AMG nas dispersões ($8,0 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e a avaliação em triplicata. Os perfis dos espectros obtidos podem ser vistos na Figura 28.

Tanto as dispersões de trabalho das AuNPs quanto a dispersão-branco tinham $2,74 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ AuNPs, sendo estas preparados a partir de uma diluição da dispersão-mãe (com concentração de AuNPs de $3,43 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$).

Os espectros de absorção vistos na Figura 28 indicam que a dispersão-branco conserva o perfil espectral com a banda na faixa de 500 nm. O incremento de TBR no meio continua provocando a aglomeração das nanopartículas com surgimento da banda espectral na faixa de 700 nm, no entanto, pode-se perceber que a intensidade da banda em 529 nm tem uma variação aleatória na presença de concentrações mais baixas de TBR, seguida por uma tendência de decréscimo de

sinal em função da presença de TBR com concentrações superiores a $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

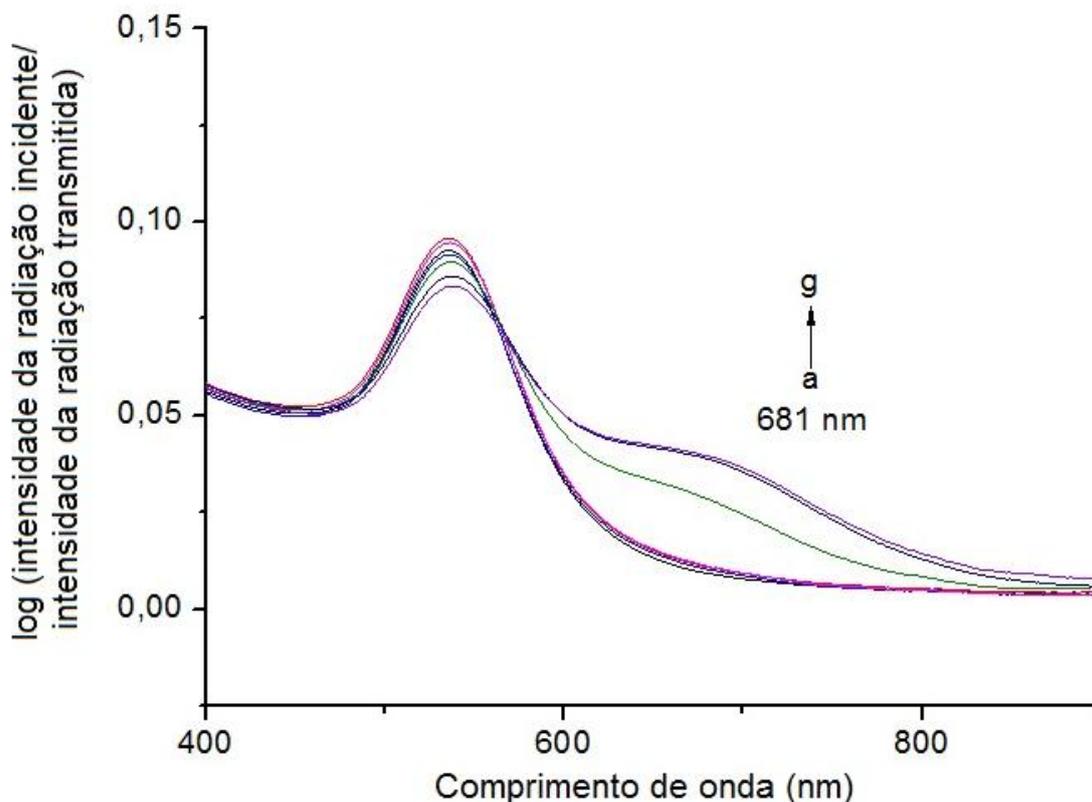


Figura 28. Espectros das dispersões de AuNPs da síntese III na ausência e na presença de diferentes concentrações de TBR. Linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 2,8; 6,0; 10; 16 [$\times 10^{-8}$ mol L⁻¹])

A resposta óptica da sonda em relação aos incrementos de concentração de TBR também foi avaliada, seguindo-se os padrões anteriores, com monitoramento do sinal em 529 nm e 681 nm. Conforme pode ser visto na Figura 29, a resposta medida das dispersões de AuNPs produzidas pela síntese III em relação ao aumento de concentração de TBR é similar aos resultados apresentados para as AuNPs obtida através da síntese II, ao se desconsiderar as concentrações mais baixas de TBR na análise. A Figura 29A traz a representação da curva obtida com o monitoramento do sinal em 529 nm, sendo nítido o comportamento errático da sonda nesse comprimento de onda, de modo que, nem mesmo uma função polinomial de segundo grau poderia descrever tal comportamento.

A linearidade da resposta da sonda das AuNPs obtidas através da síntese III é obtida apenas com o monitoramento do sinal em 681 nm. Neste estudo também percebeu-se que a saturação da sonda ocorre na concentração mais elevada de

TBR, encontrando-se linearidade apenas na faixa de concentração de TBR compreendida entre $8,0 \times 10^{-9}$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (Figura 29B e Figura 29C).

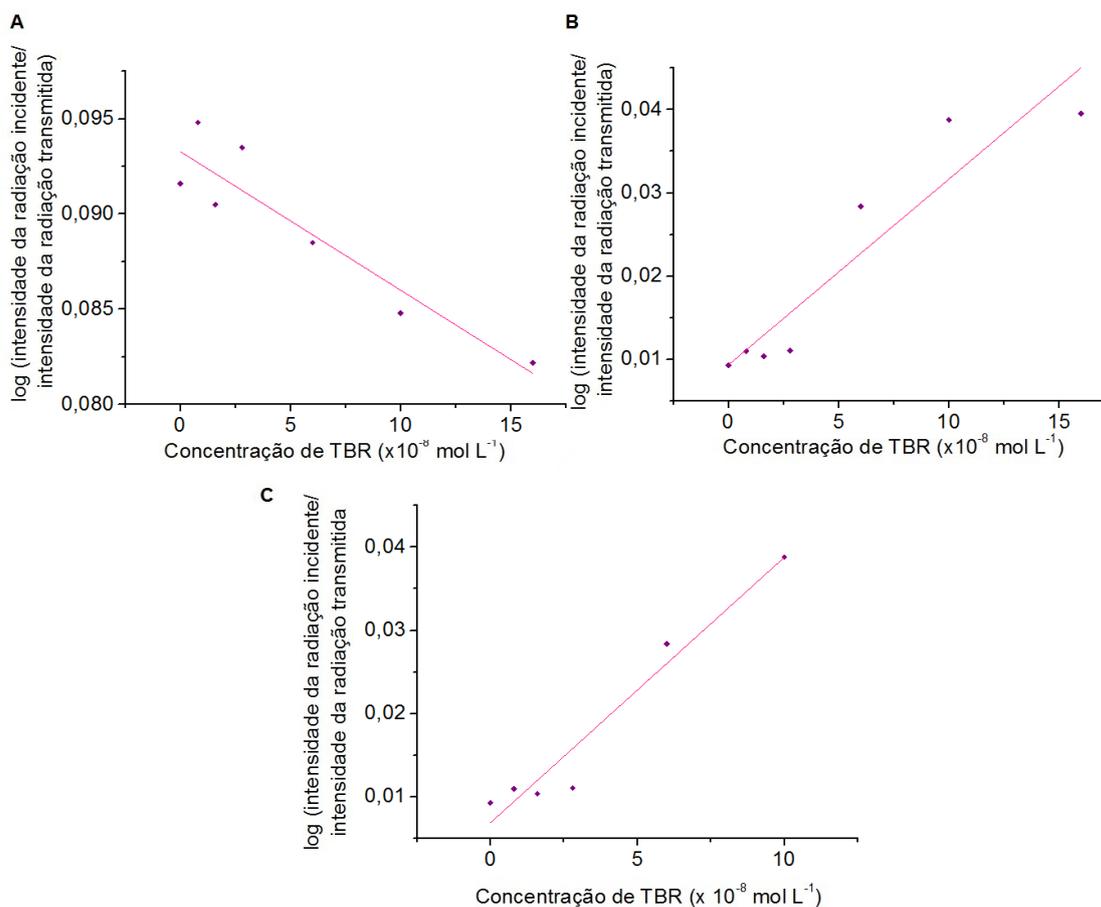


Figura 29. Resposta óptica das dispersões de AuNPs (obtida a através da síntese III) em função do aumento da concentração de TBR: A) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm, em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = (0,09329 \pm 0,0010) - (7,2838 \times 10^4 \pm 1,2824 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,8390$); B) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm em toda a faixa de trabalho (equação da curva: $Y = (0,0094 \pm 0,0028) + (2,2291 \times 10^5 \pm 3,6980 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,8549$); C) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm apenas na faixa linear (equação da curva: $Y = (0,0069 \pm 0,0018) + (3,1856 \times 10^5 \pm 3,6618 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9373$).

Avaliando-se a repetibilidade da resposta, percebe-se que os valores de C.V. encontrados para os valores de $\log(I_0/I)$ para as dispersões na presença de TBR são menores do que os vistos nas duas sínteses anteriores (Figura 30C). Nota-se que apenas dois dos padrões apresentaram valor de C.V. maiores que 2%. Pelo diagrama *Box-plot* que relaciona os desvios entre os sinais medidos das dispersões em 529 nm observa-se que a tendência de repetibilidade é muito baixa nesse comprimento de onda, indicando que o monitoramento de sinal nesse comprimento de onda não produzirá uma resposta analítica satisfatória (Figura 30A).

Na Figura 30B tem-se o diagrama *Box-plot* que indica os desvios dos valores de $\log(I_0/I)$ para as dispersões na presença de TBR com monitoramento da resposta em 681 nm. Percebe-se um baixo desvio entre os resultados indicando boa repetibilidade.

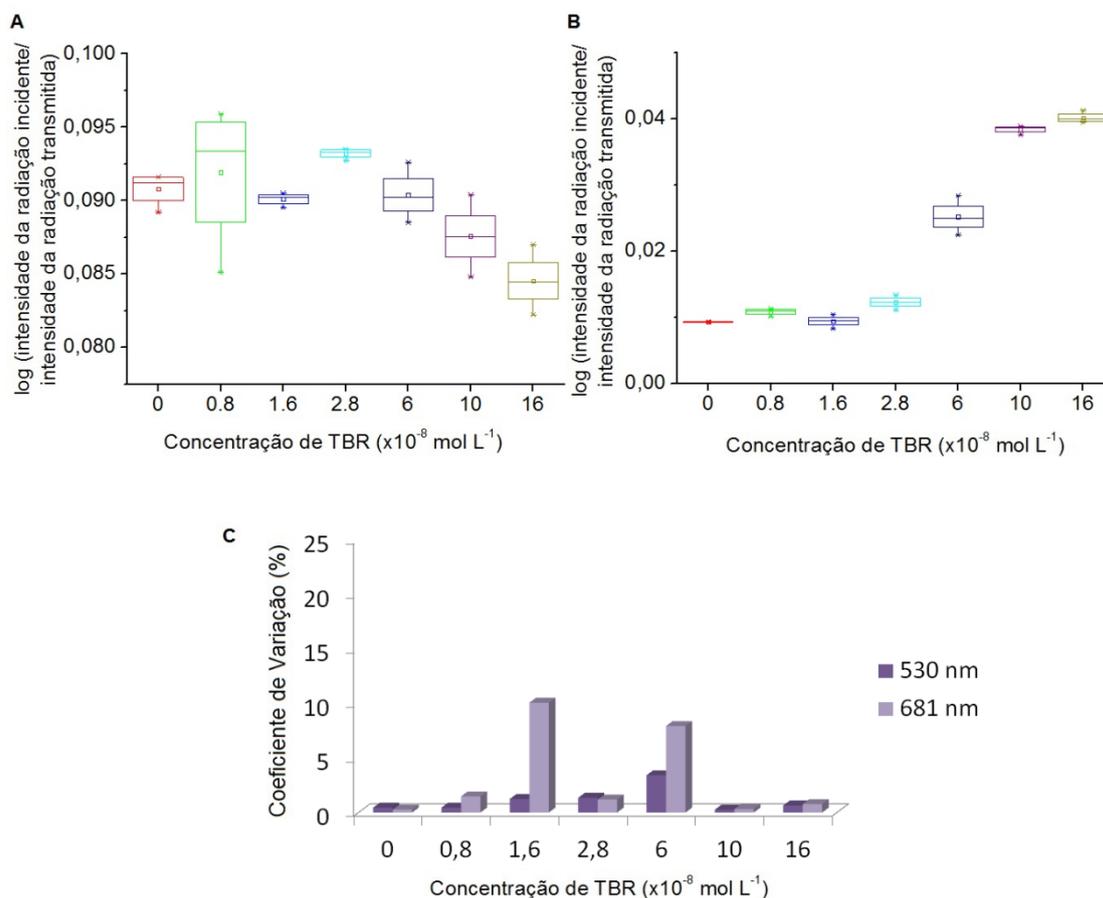


Figura 30. Diagramas *Box-plot* avaliando os desvios entre os sinais analíticos da sonda obtida através da síntese III monitorando-se a intensidade de $\log(I_0/I)$ em: A) 529 nm; B) 681 nm. C) Coeficientes de Variação encontrados entre os sinais analíticos para os padrões dos três ensaios com monitoramento em 529 nm e 681 nm.

A tendência de repetibilidade das dispersões na presença de TBR se reflete nos parâmetros das curvas, desse modo, analisando-se toda a faixa de trabalho confirmou-se o comportamento errático do sinal monitorado em 529 nm implicando valores baixos para R^2 nos três ensaios: -0,1189; 0,3608; 0,8390. A dispersão de maior concentração de TBR apresentou-se fora da faixa linear também para os três ensaios com monitoramento do sinal da sonda em 681 nm, assim os valores de R^2 nos três ensaios considerando-se toda a faixa linear (eliminando a concentração mais elevada) foram: 0,8548; 0,9317; 0,9138. Assim

sendo, a resposta da sonda foi avaliado apenas dentro da faixa linear, com monitoramento do sinal em 681 nm. A Tabela 12 apresenta os parâmetros da curva referentes à avaliação da triplicata na faixa linear nesse comprimento de onda.

Tabela 12. Parâmetros das curvas obtidas com a sonda das AuNPs da síntese III na presença de TBR e com monitoramento do sinal em 681 nm.

Parâmetros analíticos:	Equação da curva	R ²
Curva 1	$Y = (0,0069 \pm 0,0018) + (3,1856 \times 10^5 \pm 3,6618 \times 10^4) X$	0,9373
Curva 2	$Y = (0,0087 \pm 0,0021) + (2,2910 \times 10^5 \pm 2,7736 \times 10^4) X$	0,9181
Curva 3	$Y = (0,0084 \pm 0,0023) + (2,2465 \times 10^5 \pm 2,7737 \times 10^4) X$	0,8966

Considerando-se apenas a faixa linear com monitoramento em 681 nm, analisaram-se as mesmas variáveis da triplicata da curva de resposta óptica da sonda indicadas anteriormente (C.V., m, R², os sinais medidos da dispersão-branco e os sinais medidos das dispersões na presença de TBR nas concentrações da faixa central da faixa linear da curva, ou seja, $1,6 \times 10^{-8}$ e $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). Na Tabela 13 os resultados são apresentados, sendo válido salientar que os padrões escolhidos para a análise foram os que apresentaram maiores os desvios entre os resultados (Figura 30).

Os resultados mostraram que há uma tendência para a linearidade da resposta que relaciona a concentração de TBR e o sinal da sonda, porém, os valores de C.V. não são satisfatórios indicando falta de precisão das respostas produzidas nessas sondas, quando comparadas as dispersões de AuNPs vistas na síntese I.

Tabela 13. Análise dos dados da interação entre a AuNPs (síntese III) e TBR na faixa de resposta linear da sonda usando dados da triplicata das curvas da Tabela 11.

Variável	Média	Desvio padrão	C. V. (%)
Coefficiente linear	0,0080	0,0009	11,78
Coefficiente angular	$2,5744 \times 10^5$	$5,2978 \times 10^4$	20,58
R²	0,9173	0,0203	2,22
log (I₀/I) da dispersão-branco	0,0093	0,00005	0,62
log (I₀/I) da dispersão na presença de TBR 1,6 x 10⁻⁸ mol L⁻¹	0,0094	0,0011	11,84
log (I₀/I) da dispersão na presença de TBR 6,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹	0,0025	0,0003	11,98

O monitoramento do pH nas dispersões contendo quantidades diferentes de TBR (Figura 31) indicou que as adições de TBR não causaram impacto relevante, já que se observou um valor médio de pH igual a $6,73 \pm 0,02$, com coeficiente de variação de 0,37% entre os resultados. De acordo com esses dados, a variação de pH não deveria ser um fator determinante para as variações percebidas no comportamento na resposta da sonda, entretanto, é inevitável perceber que as duas sondas cujas dispersões de AuNPs encontram-se em meio próximo à neutralidade não apresentaram uma resposta satisfatória do ponto de vista analítico mesmo selecionando-se apenas a faixa linear no comprimento de onda que melhor habilitou a atuação dessas sondas. Tendo em vista que o pH do meio não é afetado pelo aumento de concentração de TBR, pode-se inferir que o pH mais elevado do meio deve impedir que as moléculas de TBR promovam uma aglomeração das AuNPs, pelo menos com a mesma velocidade de reação vista em AuNPs de meio ácido, assim, a resposta analítica das AuNPs na presença de de TBR não mostrou-se viável considerando-se meios próximos à neutralidade.

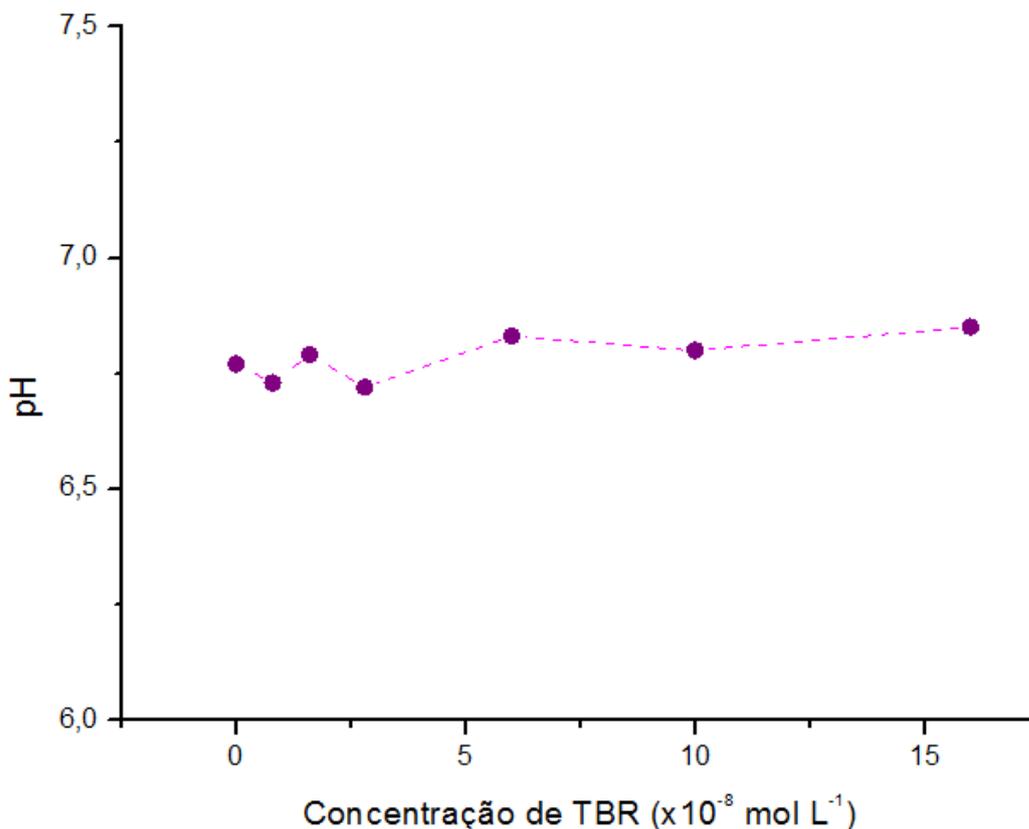


Figura 31. Variação do valor de pH nas dispersões de AuNPs (síntese III) em função do aumento de concentração de TBR.

4.4.

Síntese IV: cloreto de ouro reduzido por citrato de sódio monobásico

A síntese das AuNPs pela abordagem IV foi realizada com a redução do cloreto de ouro intermediada pelo citrato de sódio monobásico. Assim como na síntese III, a rota sintética IV é uma adaptação do procedimento descrito por Turkevich cuja modificação principal foi a adição simultânea do cloreto de ouro e do citrato.

No procedimento original de Turkevich, a concentração do agente redutor é reportada em unidades percentuais massa/massa. Conforme mencionado, a falta de indicação do tipo de citrato usado implica na obtenção de diferentes concentrações molares do agente redutor no cálculo de conversão. Considerando-se a utilização do citrato de sódio monobásico, a síntese de Turkevich emprega concentrações iniciais do agente precursor e do agente redutor iguais a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ e $2,3 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ respectivamente. Desse modo, a síntese IV foi realizada com a mesma concentração inicial do agente precursor proposta por

Turkvich, porém com uma concentração de citrato ligeiramente inferior à relatada para as AuNPs produzidas pela síntese I (Tabela 4), dessa forma, assim como visto para a síntese III pode haver uma tendência maior de aglomeração das AuNPs devido a menor concentração de citrato para atuar como agente estabilizante das nanopartículas.

A síntese IV preserva as mesmas peculiaridades mencionadas para a síntese III no que diz respeito à fonte de ouro, ao momento de adição dos reagentes do meio e à forma de aquecimento do sistema. Assim sendo, são válidas as mesmas considerações comparativas com as sínteses I e II: a fonte de ouro não alterará a formação do hidroxicomplexo de ouro III, mas, a adição simultânea dos reagentes pode incorrer na reação incompleta dos complexos proporcionando maior heterogeneidade no meio, em função disso e do aquecimento mais homogêneo do sistema, pode-se esperar que as AuNPs obtidas na síntese IV também apresentem maiores dimensões do que as obtidas nas síntese I e II.

Ao final da síntese IV, verificou-se que o pH apresentado pelas AuNPs era ácido, com valor igual a 3,77. Desse modo, o mecanismo de formação das AuNPs ocorre da mesma maneira vista para as AuNPs da síntese I: a nucleação é rápida, seguida da redução e aglomeração das AuNPs e, posteriormente da separação intra-partícula (Figura 11). Uma vez que as AuNPs estão em meio ácido, o mecanismo de reação se processa conforme ilustrado na Figura 12.

Conforme mencionado, a espontaneidade da reação de formação das AuNPs está diretamente relacionada com o pH do meio, sendo que o aumento do pH diminui a espontaneidade do processo. Quando a energia livre de Gibbs do processo indica a espontaneidade da formação das AuNPs, uma quantidade maior de sítios de nucleação serão formados implicando na obtenção de nanopartículas com menores dimensões. Portanto, dentre as sínteses estudadas no presente trabalho, as sínteses I e IV são as que apresentam maior espontaneidade para a formação das AuNPs, devido ao pH ácido do meio induzido pelo uso do citrato de sódio monobásico. Apesar das similaridades entre o pH do meio, as demais peculiaridades apresentadas para a síntese IV permitem prever a formação de AuNPs maiores do que as vistas na síntese I, todavia, o favorecimento do pH permite afirmar que as AuNPs produzidas na síntese IV apresentarão menores dimensões do que as AuNPs produzidas na síntese III.

Na Figura 32 tem-se uma das imagens obtidas para as AuNPs produzidas a partir da síntese IV. Pode-se perceber que ao se comparar com as AuNPs obtidas nas sínteses I e II, partículas mais aglomeradas e com maiores dimensões foram formadas, entretanto são menores e mais separadas do que as AuNPs da síntese III, tal como previsto pelo processo de síntese.

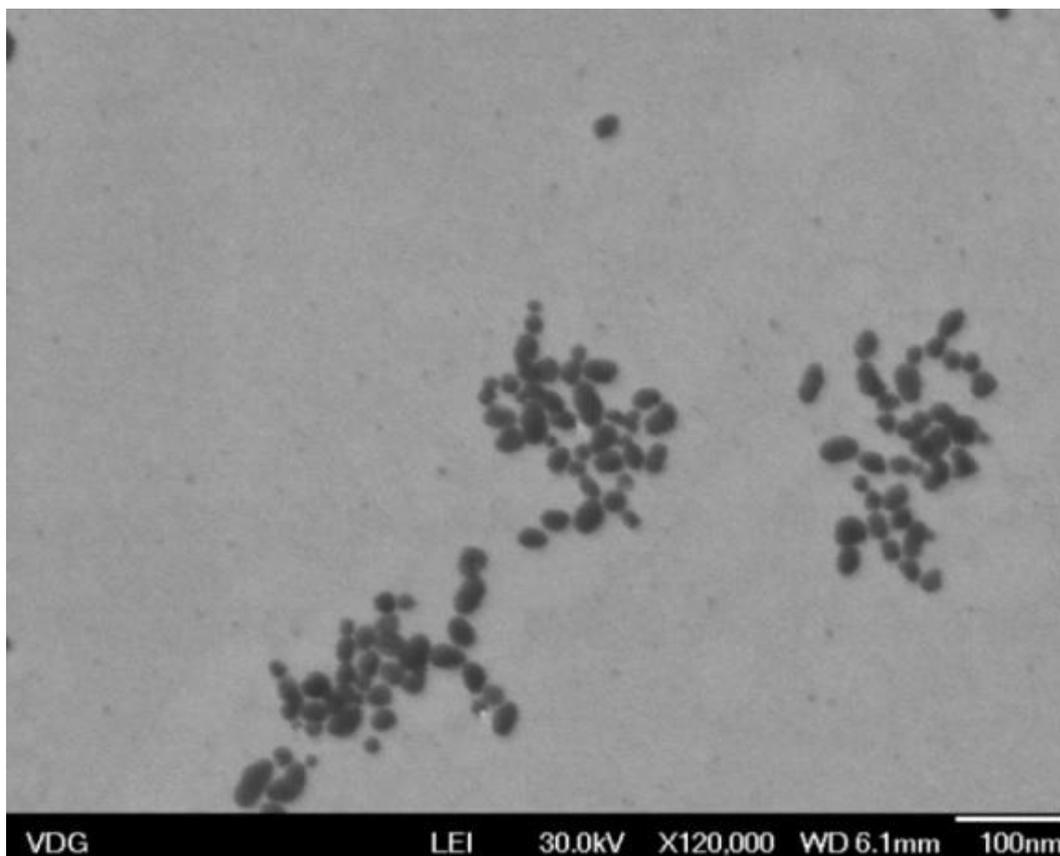


Figura 32. Imagens por STEM das AuNPs obtidas a partir da síntese IV.

Os histogramas apresentados na Figura 33 relacionam as dimensões encontradas para as AuNPs produzidas na síntese IV, após o processamento das imagens, possibilitando a análise morfológica quantitativa dessas AuNPs no espaço amostral selecionado. Os resultados comprovam as previsões feitas para os tamanhos das partículas formadas.

Conforme pode ser visto na Figura 33 A e Figura 33B, as AuNPs da síntese IV, os tamanhos do eixo maior variam de 0 a 50 nm, com a maior parte das nanopartículas tendo esse eixo com dimensão entre 20 e 30 nm (Figura 33A). As dimensões do eixo menor variaram de 10 a 32,5 nm com a maior parte das nanopartículas tendo esse eixo com dimensão de 15 a 20 nm (Figura 33B).

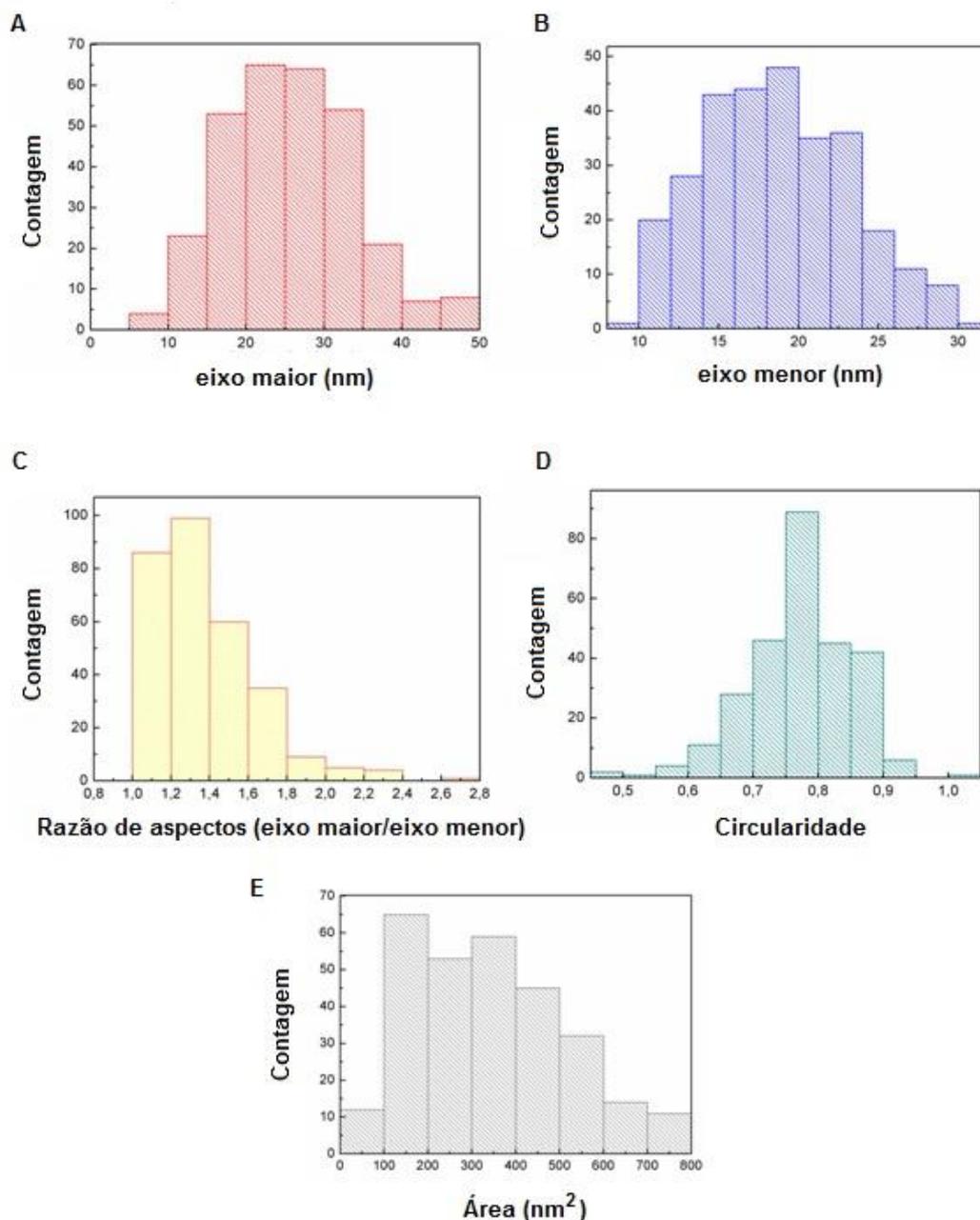


Figura 33. Histogramas referentes ao processamento das imagens da AuNPs (obtidas a partir da síntese IV) e que relaciona as dimensões das nanopartículas: A) Eixo maior, B) Eixo menor, C) Razão de aspectos (eixo maior/eixo menor), D) Circularidade; E) Área.

Observando-se o histograma da razão de aspectos das AuNPs preparadas na síntese IV (Figura 33 C), nota-se que as nanopartículas possuem formatos alongados, encontrando-se que o eixo maior é no máximo 2,8 vezes maior do que o eixo menor e que a maior parte das nanopartículas possuem razão de aspectos variando de 1,0 a 1,4. O histograma que mostra a circularidade (entre 0,75 e 0,80) das AuNPs desta síntese (Figura 33D) reafirma o formato alongado das mesmas e seu distanciamento do formato esférico.

Analisando-se o histograma que se refere à área das AuNPs obtidas na síntese IV (Figura 33E), nota-se que a maior parte da população possui uma área entre 100 e 400 nm², entretanto, pode-se perceber que as partículas possuem dimensões heterogêneas, com grande variação entre os tamanhos de área. Tais características são decorrentes de um processo de nucleação pouco homogêneo. Idealmente, os sítios de nucleação deveriam ser quimicamente, estruturalmente e energeticamente homogêneos, todavia sempre haverá algum tipo de defeito, inclusões sólidas, impurezas, superfícies estranhas, entre outras variáveis que afetam o processo e ocasionam a variabilidade nos sítios no sistema (Somasundaran *et al.*, 2002). Aliado a isso, a adição simultânea dos reagentes pode ter sido um fator que contribuiu para o crescimento heterogêneo das nanopartículas através do capeamento das mesmas por diferentes quantidades de espécies do agente estabilizante (o citrato).

Na Tabela 14 são apresentados os valores médios das variáveis apresentadas nos histograma da Figura 33. Pode-se perceber que os tamanhos das AuNPs, preparadas de acordo com os parâmetros da síntese IV, são maiores do que os das AuNPs obtidas nas sínteses I e II, mas, são menores do que os das AuNPs da síntese III. Observando-se o valor do diâmetro médio (22,2 nm), nota-se que as AuNPs da síntese IV são, aproximadamente, 1,26 vezes maiores do que as AuNPs das sínteses I e II e 2,05 vezes menores do que as AuNPs da síntese III. Assim, torna-se nítido que a relação entre essas dimensões é decorrente das diferenças dos processos de síntese e da espontaneidade dos processos.

O valor médio de circularidade igual a 0,76 indica que as AuNPs, obtidas na síntese IV, possuem geometrias muito distantes da esférica. A elevada espontaneidade da reação em pH ácido traria um perspectiva contrária à percebida através do valor de circularidade das AuNPs. Contudo, a taxa de nucleação e o crescimento das nanopartículas são processos altamente dependentes da temperatura, assim sendo, o processo de aquecimento em banho-maria pode ter imposto uma velocidade de formação dos cristais mais lenta, incorrendo na formação de AuNPs mais alongadas, devido ao crescimento desigual nas direções do sítio de nucleação.

Tabela 14. Resultados das características morfológicas das AuNPs obtidas a partir da síntese IV.

Médias das dimensões das AuNPs produzidas na síntese IV					
Eixo maior (nm)	Eixo menor (nm)	Diâmetro médio (nm)	Razão de aspectos	Circularidade	Área (nm ²)
25,8 ± 8,2	18,6 ± 4,6	22,2 ± 6,4	1,37 ± 0,26	0,76 ± 0,07	341,28 ± 174,64

Com base nos dados morfológicos, a concentração das AuNPs na dispersão obtidas a partir da síntese IV tiveram valor estimado de aproximadamente, $7,43 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$. Uma vez que o diâmetro das nanopartículas é inversamente proporcional à concentração das AuNPs, é nítido que as AuNPs da síntese IV estão em um nível de concentração superior às da síntese III e inferior às das síntese I e II.

A avaliação do potencial analítico das AuNPs produzidas na síntese IV para determinação de TBR foi feita da mesma maneira relatada para as demais AuNPs, isto é, preparando-se três curvas com dispersões com concentrações crescentes de TBR de $8,0 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros obtidos para uma das curvas podem ser vistos na Figura 34.

Tanto a dispersão-branco quanto as dispersões contendo TBR foram preparados a partir de uma diluição de uma solução-mãe (concentração de $2,97 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ de AuNPs obtidas com a síntese IV) tendo concentração de AuNPs igual a $2,38 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$.

Conforme pode ser visto na Figura 34, a dispersão-branco produziu espectro característico, com a banda espectral com máximo em 529 nm. Pode-se perceber também que o aumento de concentração de TBR nas demais dispersões provoca a aglomeração das AuNPs, o que implica em uma diminuição da intensidade da banda na faixa de 500 nm e aparecimento seguido de incremento de intensidade da banda na faixa de 700 nm. Apesar de todas as AuNPs avaliadas apresentarem a mesma tendência de aglomeração com o aumento da concentração de TBR, pode-se perceber que as AuNPs obtidas na síntese IV têm melhor desempenho como sonda analítica para determinação de TBR. Apenas a visualização dos espectros já permite perceber que a tendência linear da resposta é muito melhor ao utilizar-se as AuNPs produzidas sob as condições da síntese IV.

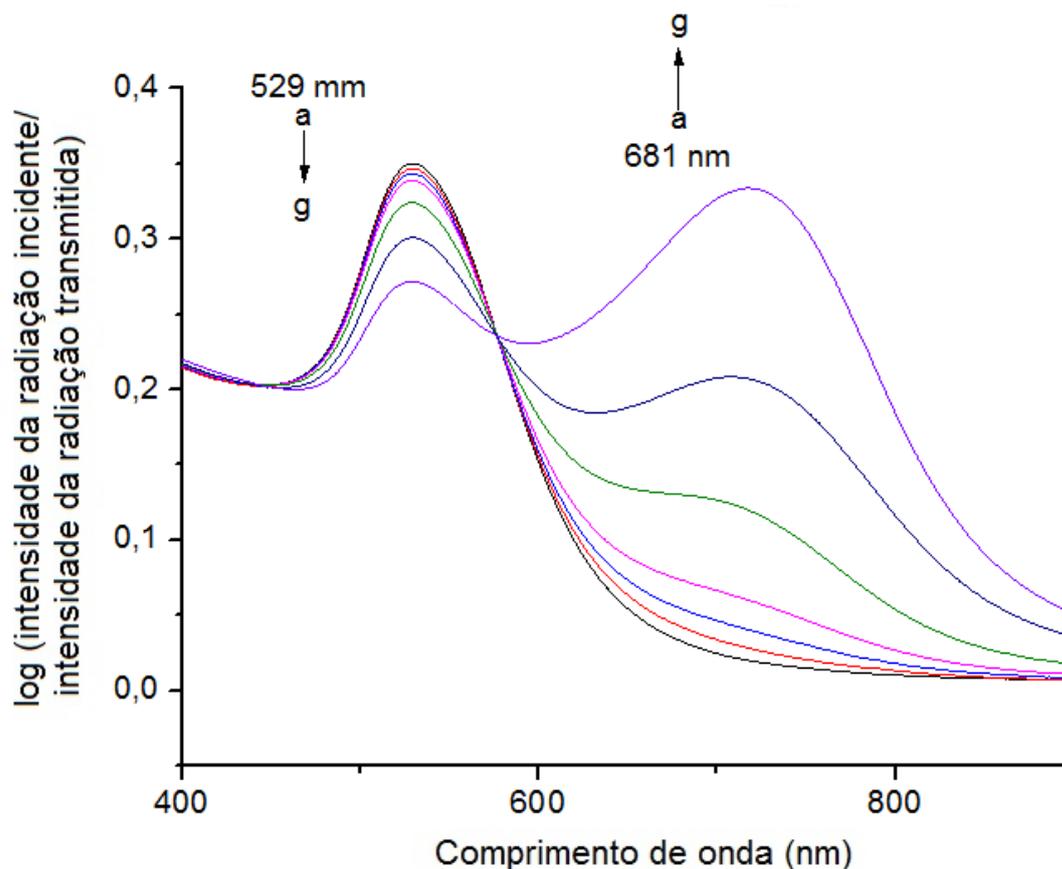


Figura 34. Espectros para das dispersões de AuNPs da síntese IV na ausência e na presença de diferentes concentrações de TBR. Linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 2,8; 6,0; 10; 16 [$\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$]).

A resposta óptica das sondas, preparadas com as AuNPs da síntese IV, em função da presença de TBR (faixa de concentração de $8,0 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$) foi feita monitorando-se o sinal tanto em 529 nm quanto em 681 nm. A Figura 35 apresenta as curvas obtidas com medições em triplicata. Observou-se que, ao contrário do que foi visto nos outros casos, o comportamento linear da resposta da sonda é evidente nos dois comprimentos de onda e em toda a faixa de trabalho estudada. De fato, o ajuste dos pontos na curva é notável.

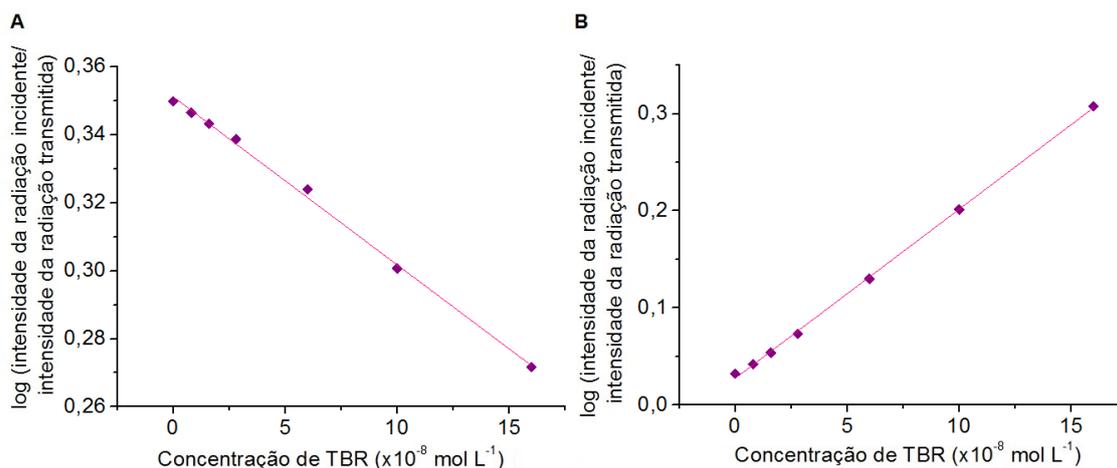


Figura 35. Resposta óptica das dispersões de AuNPs (obtida a através da síntese IV) em função do aumento da concentração de TBR: A) avaliando-se o decréscimo do sinal em 529 nm (equação da curva: $Y = (0,3510 \pm 0,0009) - (4,8753 \times 10^5 \pm 1,9209 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9929$); B) avaliando-se o incremento de sinal em 681 nm (equação da curva: $Y = (0,0282 \pm 0,0017) + (1,7153 \times 10^6 \pm 3,4060 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9980$).

Na Figura 36A e a Figura 36B são apresentados os diagramas *Box-plot* que relacionam os desvios entre os sinais analíticos da triplicata de cada dispersão preparada com as AuNPs da síntese IV. Pode-se notar que dentre todas as AuNPs, as obtidas por meio da síntese IV foi a que produziu maior repetibilidade. É válido ressaltar que apesar de alguns valores de C.V. serem maiores que 2% para algumas das dispersões, no contexto geral, a variação não ultrapassou 4% (Figura 36C), o que confirma a maior tendência de repetibilidade dessa sonda.

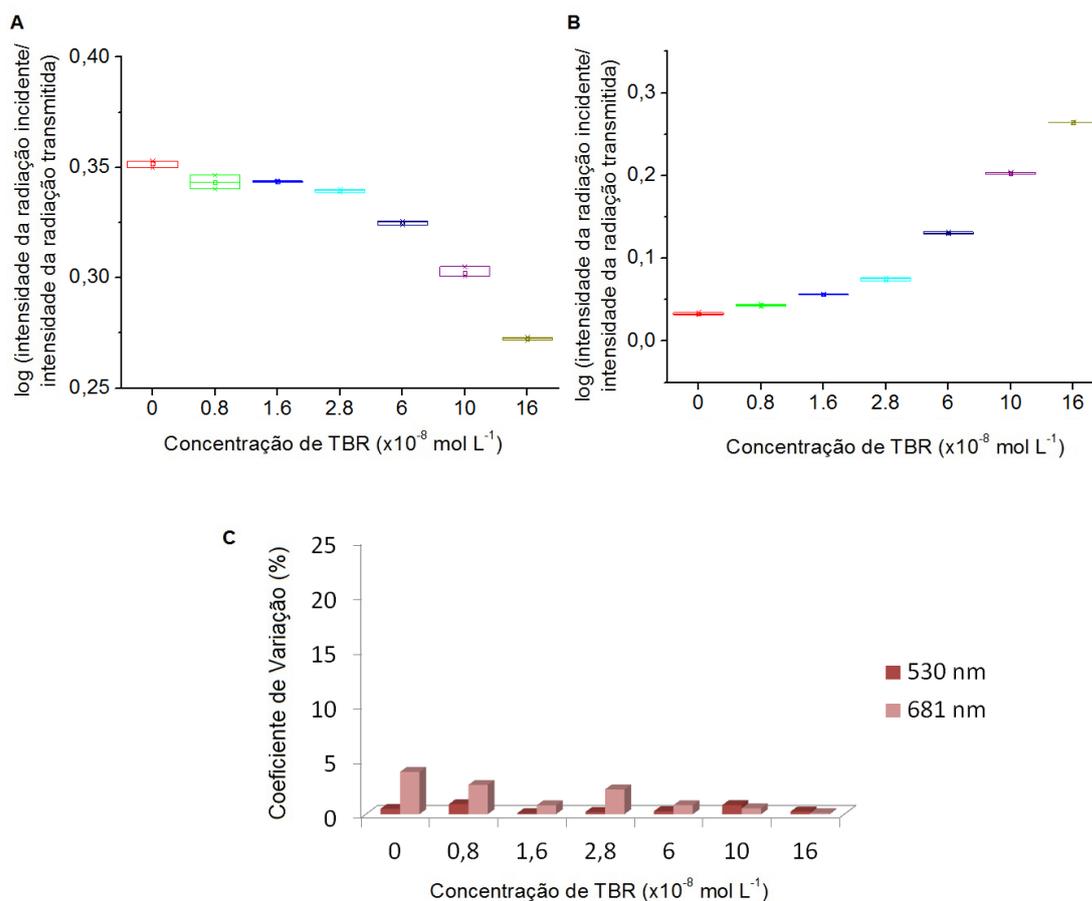


Figura 36. Diagramas *Box plot* avaliando os desvios entre os sinais analíticos da sonda obtida através da síntese IV monitorando-se a intensidade de $\log(I_0/I)$ em: A) 529 nm; B) 681 nm. C) Coeficientes de Variação encontrados entre os sinais analíticos para os padrões dos três ensaios com monitoramento em 529 nm e 681 nm.

Os parâmetros das curvas estão apresentados na Tabela 15 e diferentemente do que foi obtido para as curvas com dispersões das outras AuNPs, obteve-se uma resposta com perfil mais linear nos dois comprimentos de onda monitorados (529 e 681 nm) nas dispersões feitas com AuNPs produzidas com o método da síntese IV. Os valores de R^2 foram superiores a 0,99, indicando adequação para relacionar os sinais medidos nas sondas com a concentração de TBR de maneira efetiva usando o modelo matemático da equação da reta. Apesar de outras AuNPs também apresentarem uma boa resposta óptica em 681 nm, não conseguiu-se perceber um perfil robusto na distribuição dos pontos sobre a melhor reta ajustada no modelo matemático bem como não houve uma relação satisfatoriamente linear que habilitasse o monitoramento do sinal em 529 nm.

Tabela 15. Parâmetros das curvas obtidas com a sonda das AuNPs da síntese IV na presença de TBR e com monitoramento do sinal em em 529 e 681 nm.

Parâmetros analíticos:	Equação da curva em 529 nm	R ² (529 nm)	Equação da curva em 681 nm	R ² (681 nm)
Curva 1	$y=(0,3510\pm 0,0010)-$ $(4,8753\times 10^5\pm$ $1,9210\times 10^4)x$	0,9923	$y=(0,02821\pm 0,0017)+$ $(1,7153\times 10^6\pm$ $3,4060\times 10^4)x$	0,9980
Curva 2	$y=(0,3562\pm 0,0024)-$ $(4,8668\times 10^5\pm$ $3,3826\times 10^4)x$	0,9917	$y=(0,0248\pm 0,0044)+$ $(1,8120\times 10^6\pm$ $6,3158\times 10^4)x$	0,9928
Curva 3	$y=(0,34022\pm 0,0006)-$ $(4,4699\times 10^5\pm$ $8,1512\times 10^3)x$	0,9960	$y=(0,0242\pm 0,0025)+$ $(1,6797\times 10^6\pm$ $2,8796\times 10^4)x$	0,9965

A avaliação da eficiência das AuNPs, obtidas na síntese IV, como sonda para determinação de TBR foi feita a partir dos valores da média, dos valores de C.V. das medidas das triplicatas. Para que fosse possível uma comparação lógica com os resultados obtidos com as demais AuNPs, foram mantidas as variáveis de análise utilizadas anteriormente (r , m , R^2 , as medidas de sinal da dispersão-branco e as medidas de sinal de dois padrões centrais da faixa linear da curva (concentrações de TBR de $1,6 \times 10^{-8}$ e $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) Os resultados obtidos nos dois comprimentos de onda estão apresentados na Tabela 16.

Uma observação inicial dos resultados apresentados na Tabela 16 (bem como dos gráficos da Figura 36) deixa evidente o quanto a interação entre as AuNPs da síntese IV e TBR é mais viável para fins analíticos do que as demais AuNPs avaliadas. Pode-se notar que os valores dos coeficientes de variação são os menores, dentre todos apresentados anteriormente.

Pode-se perceber que os sinais medidos tanto nas dispersões na presença de TBR quanto na dispersão-branco apresentam baixos valores de C.V. para a triplicata, indicando a melhor repetibilidade. Observou-se também que a resposta óptica das sondas dessas AuNPs foi a mais homogênea, visto que os valores de R^2 praticamente se repetem, com pequenas variações, e que os parâmetros r e m das curvas (em ambos os comprimentos de onda) também possuem baixos desvios e são similares para as três curvas, indicando que uma resposta analítica seria mais confiável com essa sonda do que com as demais.

Tabela 16. Análise da repetibilidade, por estatística simples, da sonda analítica com as AuNPs obtidas a partir da síntese IV para a determinação de TBR, a partir da avaliação dos desvios encontrados entre as variáveis.

Monitoramento em 529 nm			
Variável	Média	Desvio padrão	C. V. (%)
Coeficiente linear	0,3492	0,0082	2,33
Coeficiente angular	$4,7374 \times 10^5$	$2,3161 \times 10^4$	4,89
R²	0,9933	0,0023	0,24
log (I₀/I) da dispersão-branco	0,5318	0,0017	0,49
log (I₀/I) da dispersão na presença de TBR $1,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹	0,3436	0,0003	0,09
log (I₀/I) da dispersão na presença de TBR $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹	0,3248	0,0008	0,23
Monitoramento em 681 nm			
Variável	Média	Desvio padrão	C. V. (%)
Coeficiente linear	0,02572	0,0022	8,49
Coeficiente angular	$1,7357 \times 10^6$	$6,8459 \times 10^4$	3,94
R²	0,9957	0,0027	0,27
log (I₀/I) da dispersão-branco	0,0329	0,0013	3,87
log (I₀/I) da dispersão na presença de TBR $1,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹	0,0562	0,0004	0,82
log (I₀/I) da dispersão na presença de TBR $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹	0,1306	0,0011	0,83

A avaliação da variação de pH nos padrões (Figura 37) indicou que a adição de TBR às dispersões de AuNPs da síntese IV não provocou alterações significativas no pH do meio, não sendo percebida nenhuma tendência de aumento ou decréscimo dos valores de pH. Os padrões apresentaram, em média, pH $3,71 \pm 0,01$, observando-se uma variação entre as medidas dentro do erro instrumental do equipamento.

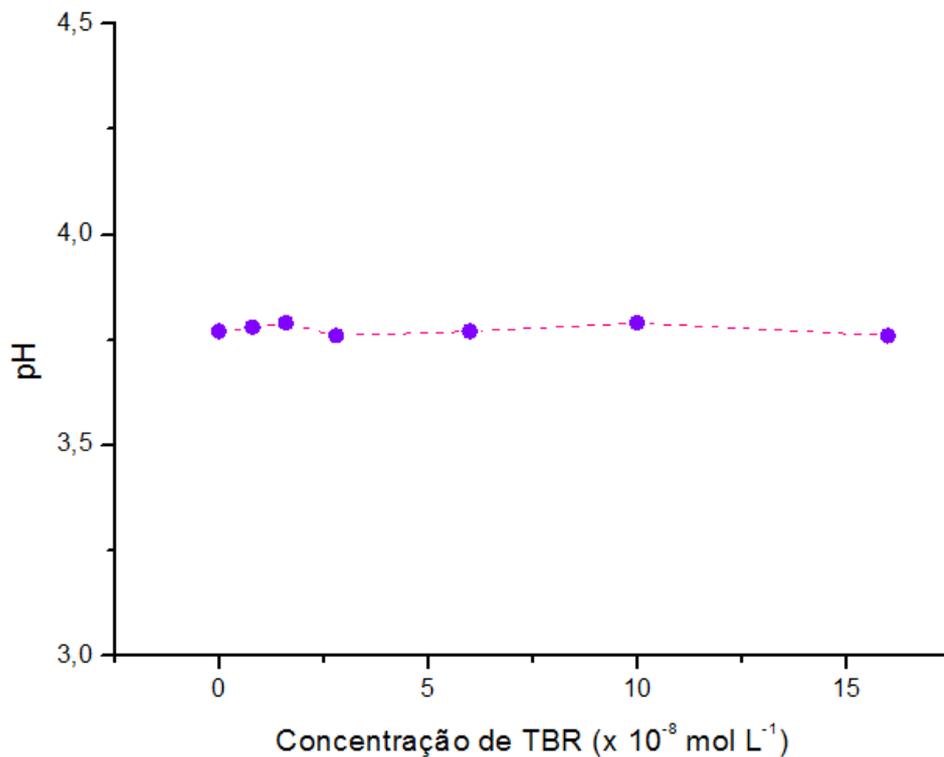


Figura 37. Variação de pH nas dispersões de AuNPs da síntese IV, em função do aumento de concentração de TBR.

Considerando-se a Lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon bC$) pode-se calcular o coeficiente de extinção molar (ϵ) de cada uma das AuNPs, através dos valores de $\log(I_0/I)$ (nesse caso o valor numérico de A foi referente ao valor de $\log(I_0/I)$), do caminho óptico percorrido pela luz na dispersão (b) e da concentração de AuNPs nas dispersões (C). Assim, tomando-se os valores médios das medidas da dispersão-branco e associando-os à concentração das AuNPs em cada sonda, foram calculados os valores dos coeficientes de extinção molar de cada uma delas (Tabela 17). Vale lembrar que o coeficiente de extinção tem duas componentes: a capacidade do sistema em absorver e em espalhar a luz que o atravessa, sendo esse conjunto de efeitos o responsável pela atenuação da luz e que se reflete diretamente na radiação transmitida. Uma vez que o coeficiente de extinção molar é uma propriedade intrínseca do sistema em cada comprimento de onda, eles foram calculados tanto em 529 nm quanto em 681 nm.

Tabela 17. Concentração de dispersões-branco de AuNPs, diâmetros médios e coeficientes de extinção das AuNPs avaliadas.

Síntese das AuNPs:	I	II	III	IV
Concentração de AuNPs (mol L⁻¹)	4,8 x 10 ⁻¹⁰	4,9 x 10 ⁻¹⁰	2,7 x 10 ⁻¹¹	2,4 x 10 ⁻¹⁰
Diâmetro médio (nm)	17,60	17,55	45,60	22,20
Coeficiente de extinção em 529 nm (L cm mol⁻¹)	3,21 x 10 ⁻⁹	4,37 x 10 ⁻⁹	3,02 x 10 ⁻¹⁰	4,48 x 10 ⁻¹⁰
Coeficiente de extinção em 681 nm (L cm mol⁻¹)	2,27 x 10 ⁻⁸	7,46 x 10 ⁻⁸	2,95 x 10 ⁻⁹	7,23 x 10 ⁻⁹

Observa-se que para todas as AuNPs, os coeficientes de extinção em 681 nm são maiores em uma ordem de grandeza com relação aos coeficientes em 529 nm. Pode-se perceber também que, em ambos os comprimentos de onda, existe uma ordem crescente de magnitude dos coeficientes de extinção, que segue a seguinte ordem: síntese III < síntese IV < síntese I < síntese II, ou seja, os coeficientes de extinção são inversamente proporcionais aos diâmetros das nanopartículas, sendo estes indicativos do efeito de dispersão da radiação na superfície das AuNPs.

As AuNPs da síntese IV apesar apresentar menor quantidade do agente estabilizante no meio com relação às duas outras AuNPs sintetizadas, conforme a metodologia de Turkevich, apresentaram diâmetros pequenos, comparáveis aos obtidos nas sínteses via Turkevich. Assim, apesar da baixa diferença de concentração pode-se inferir que, em dimensões nanométricas, este é um fator relevante no que diz respeito ao capeamento das nanopartículas (que será menor do que nas AuNPs das sínteses I e II), podendo-se perceber que haverá mais sítios disponíveis para a interação com TBR nas AuNPs da síntese IV; devido aos espaços que não foram ocupados pelo agente estabilizante haverá a possibilidade de adsorção da molécula de TBR, facilitando sua interação com as AuNPs.

As AuNPs obtidas na síntese III, apesar de terem sido sintetizadas pela mesma rota da síntese IV (diferenciando-se apenas com relação ao tipo do citrato), apresentou nanopartículas com diâmetros muito maiores do que as demais AuNPs. Tal fato é decorrente da aglomeração das nanopartículas por ineficiências no processo de nucleação e estabilização, desse modo, quando as partículas se aglomeram para atingir diâmetros maiores, perde-se área de superfície de contato e, conseqüentemente, de sítios disponíveis para a adsorção de TBR. Desse modo,

torna-se plausível a melhor resposta analítica das AuNPs da síntese IV também com relação às da síntese III

Tendo em vista os resultados apresentados, pode-se inferir que as AuNPs produzidas através do procedimento da síntese IV apresentou melhor resposta analítica como sonda para determinação de TBR do que as demais AuNPs, desse modo, selecionou-se esse procedimento de síntese como padrão para o desenvolvimento do método analítico que será apresentado no capítulo 5.

Na tabela 18 é apresentado um panorama geral e resumido das condições de síntese, bem como os valores de pH das dispersões estoque das AuNPs, os diâmetros médios e circularidade média, esses dois últimos obtidos através das análises morfológicas. Como dito anteriormente, quando utiliza-se citrato tribásico, o pH das dispersões de AuNPs é 6,67 e 6,90 (para as síntese II e III respectivamente). Tais valores são críticos para a interação com TBR e inabilitam a obtenção de uma resposta linear robusta da sonda na presença de TBR. Considerando-se os valores médios de diâmetros e circularidade dessas AuNPs, constata-se uma diferença significativa referente a morfologia dessas nanopartículas que possuem diâmetros médios de 17,4 e 45,6, com uma diferença na circularidade de 0,03. Por outro lado, o pH das dispersões obtidas com citrato monobásico apresenta-se em meio ácido com valores de pH de 3,80 e 3,77 (para as síntese I e IV respectivamente). De acordo com os resultados obtidos anteriores observou-se que nesses valores de pH, a resposta da sonda à presença de TBR é melhor quando comparada com as dispersões das AuNPs que possuem pH maior que 6. Contudo o melhor comportamento linear foi obtido para sonda das AuNPs da síntese IV, que possui nanopartículas com morfologia mais alongada (menor circularidade) e um diâmetro médio de 22,2 nm.

Tabela 18. Rotas sintéticas para o preparo de dispersões aquosas de AuNPs.

Síntese ^a	Citrato de sódio	Concentração de citrato de sódio (mol L ⁻¹)	pH da dispersão	Procedimento	Média dos diâmetros das AuNPs (nm)	Circularidade media das AuNPs ^f
I ^b	Monobásico	2,3 × 10 ⁻³	3,80	Aquecimento da solução de ouro seguido de adição do citrato ^d	17,6 ^g	0,85
II ^b	Tribásico	1,9 × 10 ⁻³	6,67	Aquecimento da solução de ouro seguido de adição do citrato ^d	17,5 ^g	0,86
III ^c	Tribásico	1,9 × 10 ⁻³	6,90	Aquecimento da água seguido da adição simultânea de sal de ouro e citrato ^e	45,6 ^h	0,83
IV ^c	Monobásico	1,9 × 10 ⁻³	3,77	Aquecimento da água seguido da adição simultânea de sal de ouro e citrato ^e	22,2 ⁱ	0,76

^aConcentração de ouro: 2,5 × 10⁻⁴ mol L⁻¹.

^bFonte de ouro: H₂AuCl₄.

^cFonte de ouro: AuCl₃.

^dAquecimento a 100°C e tempo de reação de 5 min após adição do citrato.

^eAquecimento da água a 100°C e tempo de reação de 15 min após adição dos reagentes.

^fDesvio padrão máximo: 0,07

^gConcentração da dispersão: 1,5 × 10⁻⁹ mol L⁻¹

^hConcentração da dispersão: 8,6 × 10⁻¹¹ mol L⁻¹

ⁱConcentração da dispersão: 7,4 × 10⁻¹⁰ mol L⁻¹

5

Resultados e discussão: determinação de tobramicina por espectrofotometria usando o efeito de ressonância plasmônica na superfície das AuNPs

Após a avaliação da resposta de TBR na presença das sondas obtidas a partir das sínteses I a IV, ficou claro que a que apresentou melhor desempenho como sonda analítica foram as AuNPs obtidas na síntese IV. Portanto a dispersão aquosa dessas AuNPs foi escolhida para determinação de TBR em amostras simuladas e reais.

A resposta analítica da sonda também foi testada na presença dos AMG: NEO, GENTA, AMIC, CANA e STP, verificando-se a possibilidade da utilização da sonda analítica das AuNPs para a determinação de todos os AMG, excerto STP (que só interage com as nanopartículas em concentrações mais elevadas). Apesar da interação satisfatória, do ponto de vista analítico, entre as AuNPs e cinco os diferentes AMG, escolheu-se trabalhar com TBR devido à algumas vantagens percebidas com relação à este AMG: (i) dentre todos os AMG estudados, a TBR foi a que apresentou maior faixa linear utilizando-se as sondas analíticas de AuNPs; (ii) ao planejar-se a forma de aplicação como análise da amostra real (em remédios), verificou-se que os demais AMG são comercialmente mais disponíveis na composição de medicamentos encontrados como comprimidos ou cremes e que a TBR é um princípio ativo muito utilizado em soluções oftálmicas, considerando-se então que a matriz de uma solução oftálmica é menos complexa do que as matrizes de comprimidos e cremes, encontrou-se mais uma vantagem com relação à TBR; (iii) Os medicamentos contendo os demais AMG, para uso em humanos, normalmente são vendidos sob forma de associação entre dois AMG indicando a necessidade de uma etapa prévia de separação antes da análise da amostra real na sonda das AuNPs; (iv) a TBR, além de ser comercializada na forma de colírios, pode ser encontrada na composição de outros medicamentos de matrizes pouco complexas como soluções parenterais, o que torna o método proposto plenamente aplicável diretamente nessas amostras.

Para o desenvolvimento do método analítico para determinação de TBR, fez-se necessário estudar condições de síntese que implicariam em um sinal analítico da sonda adequado, otimizar os parâmetros experimentais do método, estabelecer os parâmetros analíticos de mérito, e, finalmente, realizar a aplicação do método em amostras simuladas e reais. Os resultados desses estudos serão apresentados nas seções que compõem este capítulo.

5.1. Estudos preliminares

5.1.1. Condições de síntese e estabilidade das dispersões de AuNPs em função da diluição

Os estudos preliminares para o ajuste fino das condições da síntese foram feitos a partir do procedimento descrito na rota da sintética IV com e sem banho de aquecimento (banho-Maria e banho de glicerina). As variáveis monitoradas para este estudo foram: (i) a temperatura da síntese; (ii) a forma de aquecimento do sistema; (iii) o tempo de reação; (iv) agitação do sistema. Mantiveram-se constante as concentrações e os volumes dos reagentes, tornando possível uma melhor avaliação das variáveis estudadas. Esses estudos foram feitos avaliando-se o perfil espectral das AuNPs, desse modo, as análises morfológicas não foram feitas nesses estudos preliminares uma vez que estas não fazem parte da rotina analítica proposta.

Existem na literatura muitos artigos que mencionam essas variáveis na produção de dispersões coloidais de ouro (inclusive o manuscrito original de Turkevich *et al.*, 1951), todavia, a maioria desses estudos contemplam a relação com o aspecto morfológico das AuNPs, sendo que a avaliação espectroscópica foi encontrada para algumas rotas sintéticas, porém, não encontrou-se nenhum estudo desse tipo com relação às condições da síntese IV para produção das AuNPs.

Para o ajuste final das condições de síntese, fez-se necessário estabelecer o tempo exato de reação, pois, o procedimento descrito na literatura estabelece o final da síntese como o momento no qual a dispersão coloidal atinge uma coloração avermelhada (Melo Jr. *et al.*, 2012). No entanto, essa informação é muito vaga, pois o controle de outras condições experimentais é importante para aplicações analíticas quantitativas, quando se faz necessário assegurar que a

intensidade de sinal da sonda se reproduza a cada batelada de síntese realizada. Assim, de modo a se garantir a qualidade da sonda realizou-se um ajuste com relação à agitação (rotação da barra magnética), temperatura do meio reacional e do tempo de reação. Para acompanhar o efeito do ajuste dessas condições, monitorou-se o sinal da sonda original em 529 nm. No entanto, tendo em vista que a dispersão aquosa da síntese IV apresentava sinal (logaritmo razão entre a potência radiante incidente e a potência radiante transmitida) muito elevado, impossibilitando o registro de intensidade do sinal, decidiu-se por diluições, que serão descritas a seguir no decorrer desse capítulo.

De acordo com o estudo empírico de Turkevich, a elevação da temperatura de síntese faz com que sejam produzidas AuNPs mais dispersas no meio e de dimensões menores (Turkevich *et al.*, 1951), assim estabeleceu-se partir de uma primeira condição de síntese, usando aquecimento a 170°C (com béquer de síntese em contato direto com a placa de aquecimento) e agitação em 500 RPM com a adição simultânea do precursor e do agente redutor/estabilizante ao meio ao se estabelecer a ebulição à 100°C, verificando-se um aumento gradual da temperatura até 130°C após a adição dos reagentes (condição 1). Alíquotas dessa dispersão foram coletadas a cada 10 min, com a última verificação em um intervalo de 5 min (até 35 min) essas alíquotas foram diluídas em água de forma a habilitar as medições espectrofotométricas (uma parte da dispersão-estoque diluída em duas partes de água ultrapura: 33,3% v/v de AuNPs). Conforme pode ser observado na Figura 38, uma tendência de aumento do sinal ocorreu até 20 min de reação, e a tendência de decréscimo foi confirmada em tempos maiores de reação. Devido à grande variação de temperatura (30°C) imposta pela elevada temperatura da placa de aquecimento no sistema durante o período de observação, minimizaram-se as temperaturas aplicadas no sistema nas condições subsequentes e o monitoramento do sinal foi feito em um intervalo de tempo menor para melhor acompanhamento da variação do sinal.

Repetiu-se o experimento com uma temperatura menor (140°C ajustada no controle da placa e com béquer de síntese em contato direto com a placa de aquecimento), sob a mesma condição de agitação (condição 2). As alíquotas dessa dispersão foram coletadas a cada 5 min até 20 min (a partir deste ponto verificou-se apenas uma tendência de decréscimo do sinal) com subsequente diluição conforme mencionado. Percebeu-se que com 10 min de reação, a alíquota diluída

apresentava a mesma intensidade de sinal da sonda da condição 1 (considerando o mesmo tempo), porém, a partir desse instante, contrariamente ao que se viu na situação anterior, o sinal apresentou tendência de queda (Figura 38). Nessas condições, observou-se que a temperatura do sistema variou entre 100 e 118°C.

Por fim, realizou-se a síntese na mesma condição de temperatura descrita por Melo Jr. *et al.* (2012), isto é, sob aquecimento à 100°C (ajustada no controle da placa e com béquer de síntese em contato direto com a placa de aquecimento) e agitação de 500 RPM (condição 3). Percebeu-se que nessas condições, a dispersão de trabalho apresentou intensidade de sinal muito menor do que o obtido com as outras duas condições de síntese (Figura 38). A temperatura do sistema nessas condições apresentou uma variação entre 92 e 102°C, induzindo dúvidas a respeito da homogeneidade do aquecimento no sistema. Desse modo, tornou-se nítida a importância da temperatura de síntese na qualidade do sinal produzido pela sonda.

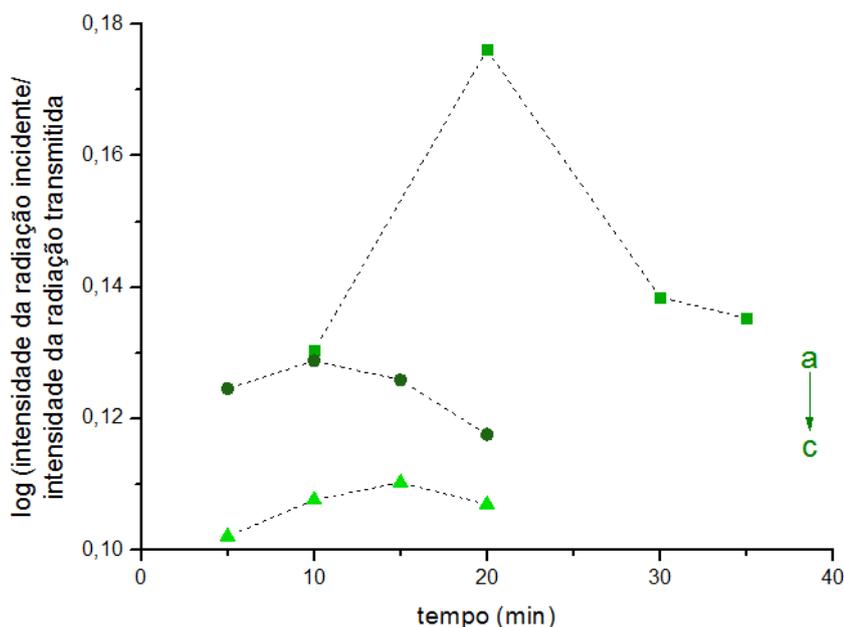


Figura 38. Monitoramento do sinal da sonda (após diluição) em função do tempo das alíquotas provenientes das sínteses obtidas seguido o procedimento da síntese IV (sem banho-maria) sob diferentes temperaturas. Linhas a-c: condição 1, condição 2 e condição 3.

Tendo em vista a importância do controle da temperatura no resultado da síntese, fez-se necessário estabelecer uma condição na qual a temperatura permanecesse constante do início ao fim da reação. Inicialmente, testou-se a utilização de um banho de glicerina, mas, além da morosidade no processo de

aquecimento, percebera-se que a coluna de glicerina alterou o efeito de indução magnética na barra de agitação, diminuindo seu efeito em relação ao ajuste dos experimentos anteriores. Assim, ajustou-se o sistema para o preparo da dispersão em um banho-maria, ajustando-se a chapa de aquecimento para a temperatura de 250°C, desse modo, garantia-se a maior taxa de aquecimento do sistema até a temperatura de ebulição, a partir da qual, garante-se a homogeneidade de aquecimento à 100°C (condição 4). Verificou-se que ajustando essa temperatura no controle da placa a temperatura da água contida no béquer mantinha-se à 100°C. Nessa condição, tentou-se ajustar a velocidade da agitação para uma situação similar com as anteriores (aplicando um valor nominal do agitador de 700 RPM), já que o efeito de indução magnética na barra de agitação também foi afetado pela coluna de água.

Reavaliou-se então a condição de aquecimento da água a 100°C, sob a garantia do aquecimento uniforme do sistema. Na Figura 39 se apresentam os resultados obtidos nessa condição, podendo-se perceber que se obteve uma maior intensidade do sinal da dispersão das AuNPs utilizando-se o aquecimento em banho-Maria, quando comparada as outras três condições. Tendo em vista que não são elevadas as diferenças entre os sinais da sonda monitorados em diferentes tempos de reação, escolheu-se uma escala conveniente no eixo das ordenadas para tornar nítida a leve tendência de aumento da intensidade do sinal com 15 min de reação, observando-se o padrão de decréscimo após esse tempo, deixando evidente a importância do aquecimento homogêneo do sistema. Com base nesses resultados, a condição 4 (para a síntese IV) foi escolhida para a realização dos estudos subsequentes, sendo estabelecida como condição padrão para a síntese das AuNPs. Vale salientar que a condição 4, nada mais é do que o procedimento tal qual descrito na sessão experimental (síntese IV), decidiu-se por se chamar de condição 4 (apenas nessa parte da dissertação), somente para diferenciação entre as outras sínteses (condição 1,2 e 3) que foram obtidas seguindo parcialmente a metodologia descrita na síntese IV, com a diferença atribuída somente a forma de aquecimento do meio reacional.

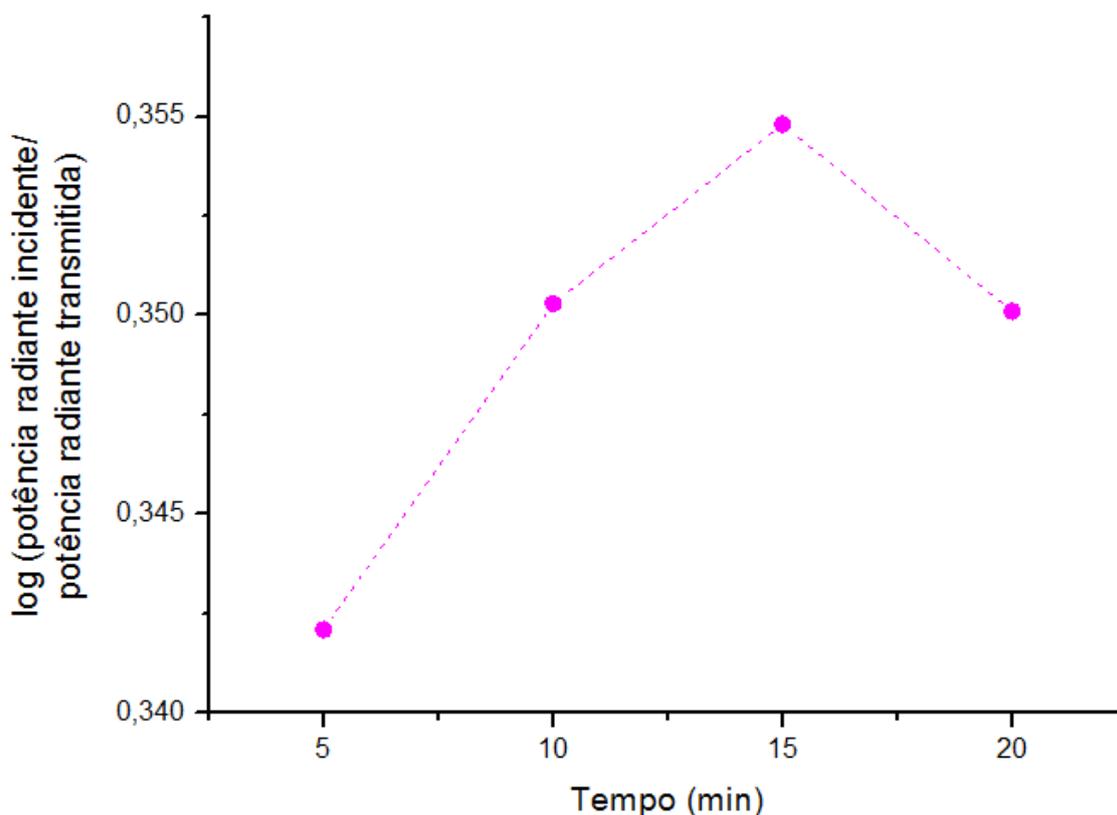


Figura 39. Monitoramento do sinal analítico em função do tempo de alíquotas provenientes da síntese IV feita em banho-maria, chamada de condição 4.

O procedimento, tal qual descrito na síntese IV (denominado aqui de condição 4) foi repetido por três vezes padronizando-se o tempo de reação para 15 min (após adição dos reagentes ao meio). Para avaliação dos sinais das alíquotas dessas sondas, aumentou-se a proporção de AuNPs nas dispersões aquosas (diluídas) para 1 parte de AuNPs (dispersão obida em cada síntese sem diluição) e 1,5 partes de água, desta forma as dispersões diluídas foram formadas por 40% v/v de AuNPs. Tal escolha foi tomada com o objetivo de melhorar a visualização do sinal na medição instrumental, essa alteração foi feita pensando-se na etapa subsequente de avaliação da interação entre as dispersões e TBR, pois um sinal analítico de maior intensidade (mesmo com pequenas diferenças entre as intensidades) permitiria uma melhor percepção da interação e melhor faixa de resposta analítica. Conforme pode ser observado na Figura 40, os perfis espectrais obtidos em três repetições da síntese IV (condição 4) foram muito similares tanto com relação ao perfil quanto em relação à magnitude da banda em torno de 530 nm referente à intensidade máxima de sinal, o que indica robustez na condição de síntese e repetibilidade das características do produto da síntese.

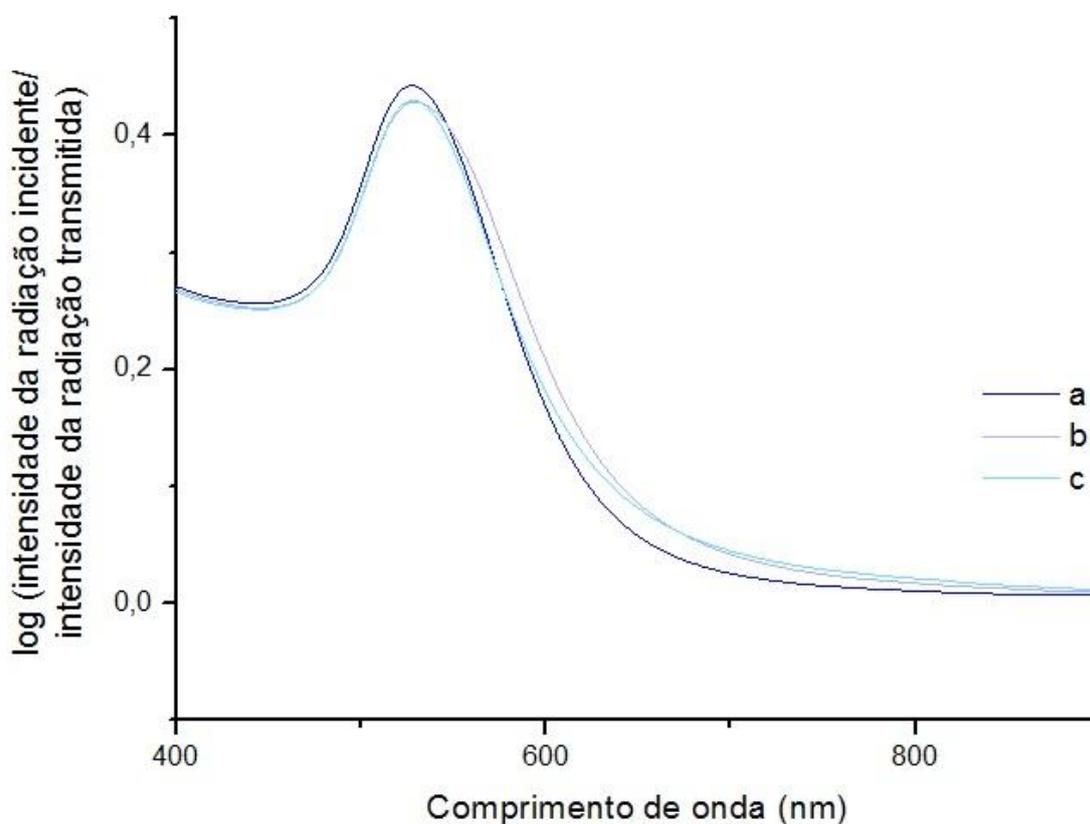


Figura 40. Perfis espectrais de três dispersões diluídas (40% v/v de AuNPs referente ao volume total da dispersão) obtidas a partir de três sínteses independentes na condição 4 (síntese IV). Conforme a legenda, a, b e c representam a primeira, segunda e terceira repetições, respectivamente.

Para averiguar se as sondas obtidas a partir das três sínteses independentes respondiam de maneira similar à presença de TBR, avaliou-se a resposta analítica das dispersões diluídas (40% v/v de AuNPs referente ao volume total da dispersão) na presença de dois níveis diferentes de concentração de TBR ($2,0 \times 10^{-8}$ e $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ monitorando-se a variação de sinal em 529 e em 681 nm.

Conforme pode ser visto na Figura 41, as três sondas responderam de maneira similar à presença de TBR. A partir do monitoramento dos sinais no comprimento de onda de 529 nm, obteve-se intensidades de sinais de $0,4337 \pm 0,0076$ (C.V. = 1,75%), $0,4050 \pm 0,0111$ (C.V. = 2,74%) e $0,3434 \pm 0,0168$ (C.V. = 4,89%), referentes as dispersões constituídas por 40% v/v de AuNPs na ausência de TBR e as dispersões constituídas por 40% v/v de AuNPs na presença de TBR nos níveis de concentração $2,0 \times 10^{-8}$ e $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ respectivamente. Já no monitoramento em 681 nm obtiveram-se os sinais de

$0,0474 \pm 0,0120$ (C.V. = 25,39%), $0,1836 \pm 0,0205$ (C.V. = 11,78%) e $0,3639 \pm 0,0069$ (C.V. = 1,88%), referentes às dispersões constituídas por 40% v/v de AuNPs na ausência de TBR e dispersões constituídas por 40% v/v de AuNPs na presença de TBR nos níveis de concentração $2,0 \times 10^{-8}$ e $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.

Observou-se uma maior variação entre os sinais da sonda com monitoramento em 681 nm, entretanto, o comportamento da sonda com relação ao incremento de TBR foi o mesmo na triplicata das sínteses (Figura 41), indicando grande similaridade entre as nanopartículas obtidas. Desse modo, resolveu-se misturar o conteúdo das três dispersões sintetizadas de modo a obter um volume total de 2,0 L de material homogêneo e garantir dispersão estoque suficiente para a preparação das dispersões diluídas e de trabalho necessárias para a realização de todo o trabalho experimental.

Portanto a partir deste ponto, quando houver referência ao termo dispersão estoque, este indica que é a dispersão original gerada pela homogeneização de três partidas de síntese (obtidas pelo procedimento da síntese IV).

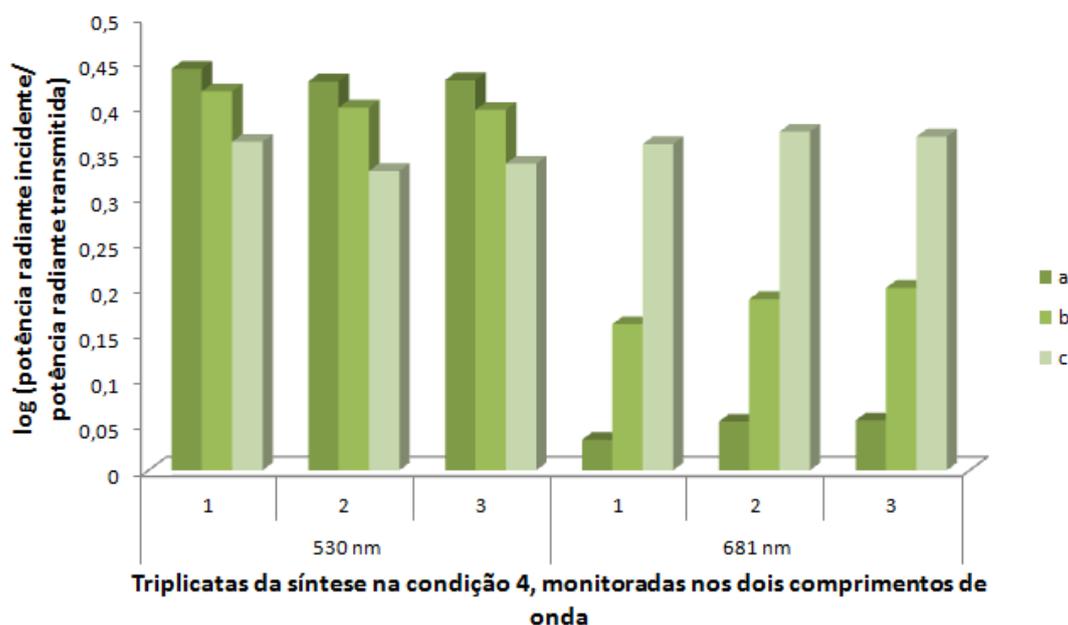


Figura 41. Avaliação dos sinais das sondas em dispersões diluídas constituídas por 1 parte de dispersão estoque de AuNPs e 1,5 partes de água (40% v/v de AuNPs no volume total), a partir das três sínteses independentes 1, 2 e 3 (procedimento da síntese IV); (a) Dispersões de AuNPs na ausência de TBR, (b) dispersões de AuNPs na presença de TBR ($2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e (c) dispersões de AuNPs na presença de TBR ($5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹).

Para avaliar a estabilidade da resposta analítica das dispersões diluídas obtidas a partir da dispersão estoque de AuNPs, testaram-se diluições da dispersão estoque de AuNPs preparadas com dois fatores de diluição: 1,5 e 5 (partes de água para 1 parte de dispersão estoque), de modo a avaliar se o fator de diluição alteraria a estabilidade do sinal em função do tempo. Desta forma essas dispersões diluídas foram compostas por 40% e 16,7% v/v, respectivamente, de dispersão estoque das AuNPs. Tal avaliação foi feita, sabendo-se que a concentração das AuNPs nas dispersões diluídas altera a intensidade do sinal da sonda. Portanto, fez-se necessário verificar se a variação na concentração das AuNPs poderia alterar a estabilidade do sinal da sonda.

Na Figura 42A são apresentados os perfis espectrais dessas duas sondas diluídas com medidas após 10 min da preparação, mostrando intensidades de sinal que condizem com os fatores de diluição aplicados e indicando o sinal da linha mais estável entre 650 e 900 nm.

Nas Figuras 42B e 42C são mostrados os gráficos de estabilidade para essas sondas (sinal monitorado em 530 nm a cada 5 min até o tempo de 10 min, aumentando-se o intervalo de tempo de observação para cada 10 min até 30 min, alterando-se essa verificação para o intervalo de tempo de 30 min até 360 min) indicando que a estabilidade do sinal diminuiu na sonda cuja diluição foi maior. O sinal da sonda preparada com um fator de diluição menor permaneceu estável de 5 a 120 min, apresentando um valor de sinal igual a $0,4642 \pm 0,0008$, com C.V. de 0,18% entre os resultados (Figura 42B), ao passo que a sonda mais diluída manteve-se estável apenas até 60 min apresentando sinal igual a $0,2279 \pm 0,0012$, com C.V. de 0,53% entre os resultados (Figura 42C). Em ambos os casos, percebeu-se que são necessários pelo menos 5 min (após preparação) para a estabilização do sinal das sondas. A análise em todo o intervalo demonstrou ainda que a sonda com menor diluição, apesar de indicar uma tendência de decréscimo de sinal após 120 min, manteve-se estável durante os 360 min com coeficiente de variação de 0,68% entre os resultados de todo o intervalo, ao passo que esse

desvio para os resultados da sonda com maior diluição aumenta para 2,44% em todo o intervalo.

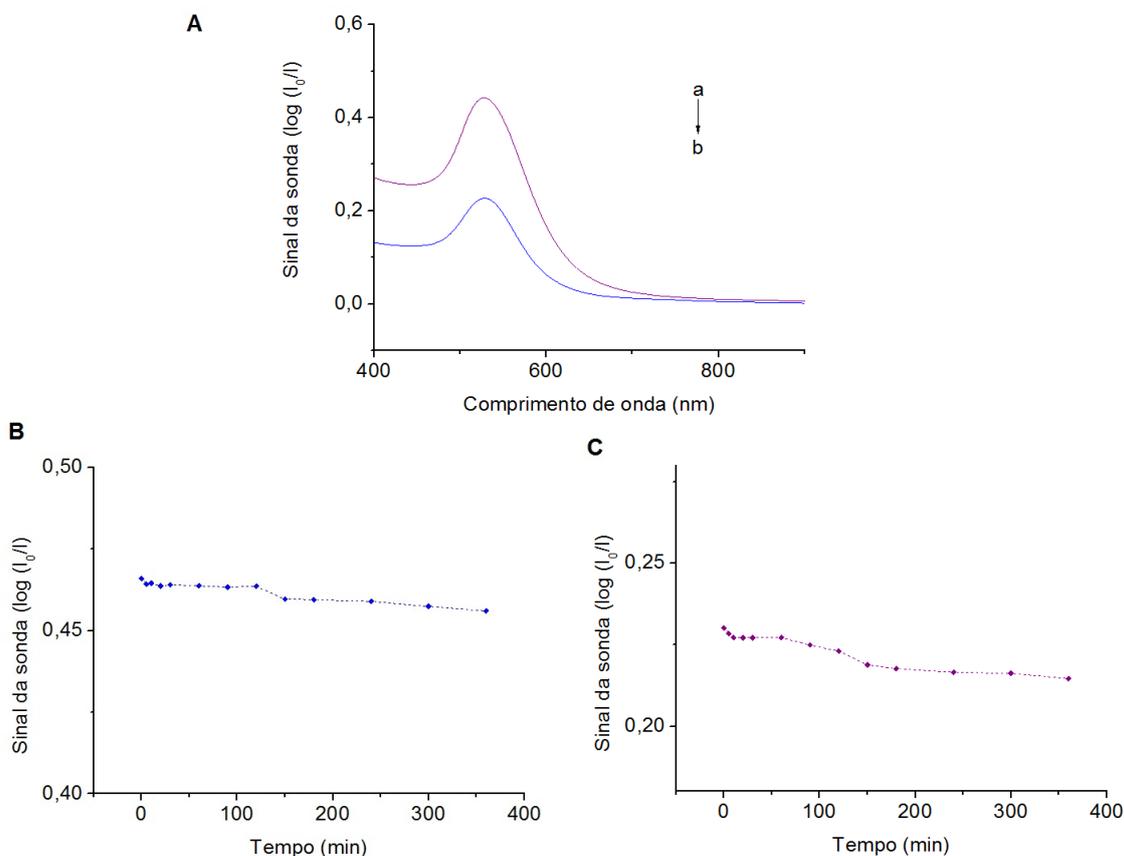


Figura 42. A) Perfis espectrais das dispersões diluídas de AuNPs, linha a dispersão composta por 40% v/v de AuNPs, linha b dispersão composta por 20% v/v de AuNPs (B) Estabilidade do sinal em função da dispersão composta por 40%v/v de AuNPs (C) Estabilidade do sinal em função da dispersão composta por 20%v/v de AuNPs, ambas com monitoramento em 530 nm.

Baseado nos resultados de estabilidade descritos acima, decidiu-se preparar as dispersões de trabalho (em balões volumétricos de 5,00 mL) a partir da dispersão contendo 40% v/v de dispersão estoque de AuNPs. Portanto, essa dispersão diluída, foi preparada em volume maior e foi chamada de dispersão-mãe, contudo manteve-se a proporção de 40% v/v de dispersão estoque de AuNPs no meio. Assim a concentração em mol por litro da dispersão-mãe foi estimada em $3,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$.

A partir dessa dispersão-mãe foram preparadas as dispersões de trabalho na ausência (dispersão-branco) e na presença de padrões de TBR (ou outro AMG), desta forma todas as dispersões de trabalho foram constituídas por 4,0 mL de

dispersão-mãe e um volume adicional (máximo) de 1,0 mL, este último referente a alíquotas de água ultrapura e/ou soluções padrões de TBR (ou outro AMG). A partir dessa condição em todas as dispersões de trabalho tem-se uma concentração em mol por litro de AuNPs estimada em $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$.

A partir dessa condição estabelecida, foi feito um novo estudo, e este continuou confirmando a estabilidade do sinal da dispersão-mãe de AuNPs com monitoramento em 529 nm durante 120 min, tempo mais do que necessário para a realização das análises com a sonda. Conforme visto na Figura 43 (linha b), o sinal analítico da dispersão-mãe foi estável e apresentou um C.V. de 0,21%. No mesmo gráfico, observa-se (linha a) o sinal analítico da dispersão de trabalho na ausência de AMG (dispersão- branco), este também é estável e apresentou um C.V de 0,09%.

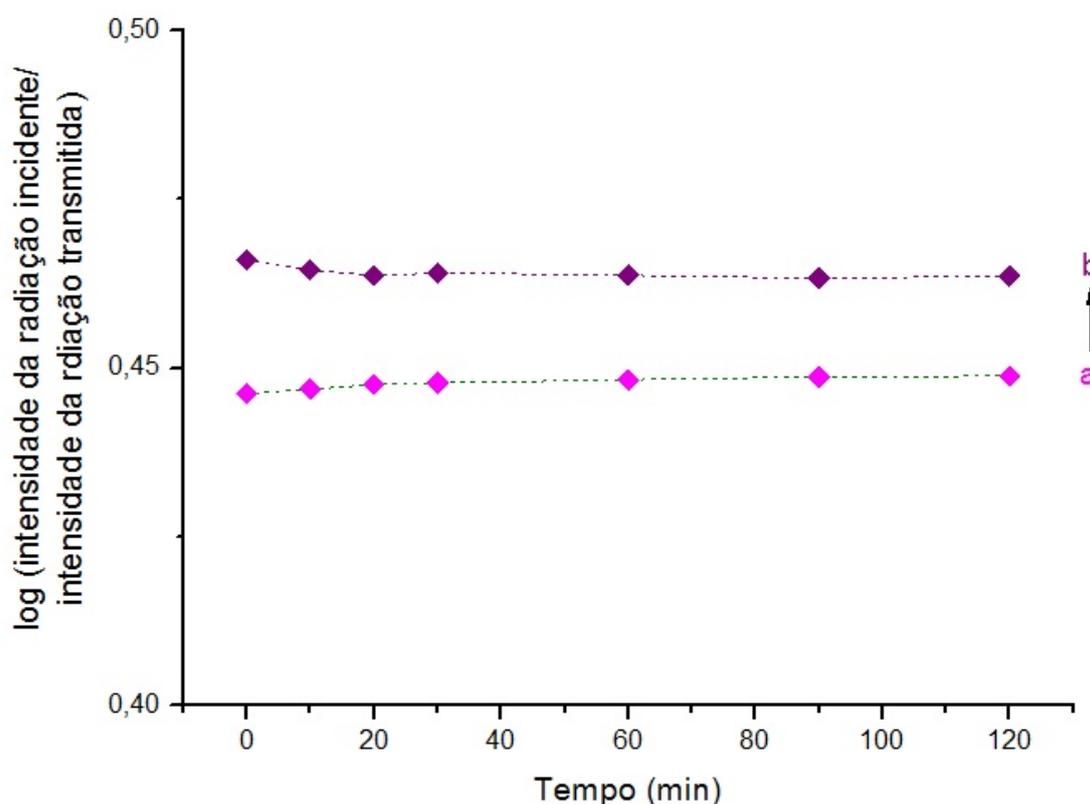


Figura 43. Estabilidade do sinal da sonda em função do tempo: (A) dispersão de trabalho (na ausência de AMG) contendo AuNPs na concentração estimada de $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) dispersão-mãe de AuNPs na concentração estimada de $3,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$. Ambas com monitoramento do sinal em 529 nm.

5.1.2. Avaliação do pH das dispersões de trabalho

As otimizações iniciais visando a aplicação analítica foram feitas testando-se a estabilidade do sinal sonda com relação à variação de pH nas dispersões. Como visto, no pH da dispersão estoque é 3,7, este se mantém quando são preparadas tanto as dispersões-mãe quanto as dispersões de trabalho. Contudo, um estudo complementar foi feito avaliando a estabilidade do sinal das dispersões de trabalho na ausência de AMG (dispersões branco) na faixa de pH entre 2,6 e 9,7, com intervalos de 1 unidade (feito através de ajuste pela adição de HCl ou NaOH concentrado). Tal avaliação foi feita por um período de 2 h com medições de sinal em intervalos de 30 min, sendo o ponto inicial (zero) a medição feita após 5 min da preparação da sonda.

Conforme pode ser observado na Figura 44A, observou-se maior estabilidade do sinal no intervalo de pH entre 2,6 e 4,5 (faixa que inclui o pH original da dispersão estoque e da dispersão-branco), sendo que o C.V. entre as médias dos sinais, monitorados em 529 nm, nessa faixa não foi maior que 0,90%. Pode-se perceber que houve uma tendência de incremento do sinal da sonda com o aumento do pH da dispersão, sendo notada uma grande variação do sinal em pH 5,5. Ainda assim, o desvio entre as médias dos sinais em toda a faixa de pH estudada pode ser considerado baixo uma vez que os valores de C.V. não são superiores a 2,7%. Uma outra maneira de avaliar o resultado é indicada no diagrama Box plot da Figura 44B, onde não se observa variações relevantes de sinal no conjunto de sinais coletados no intervalo de tempo estabelecido para cada valor de pH estudado.

Uma vez observado que o sinal das dispersões-branco não variava significativamente em função do pH, dentro da faixa de tempo estabelecida no estudo, avaliou-se como o pH da dispersão afeta o sinal da sonda após a adição de TBR. Tal estudo foi feito de maneira análoga ao estudo com as dispersões-branco, porém na presença de um padrão de TBR cuja concentração final nas dispersões de trabalho foi $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Em cada conjunto de dados de uma mesma faixa de pH, percebeu-se que não há variação significativa do pH em função do tempo com monitoramento do sinal em 529 e 681 nm (máximo de C.V. de

0,74%), com exceção da dispersão ajustada para pH 2,6 que apresentou C.V. de 4,61% e 1,96%, com monitoramento em 529 e 681, respectivamente.

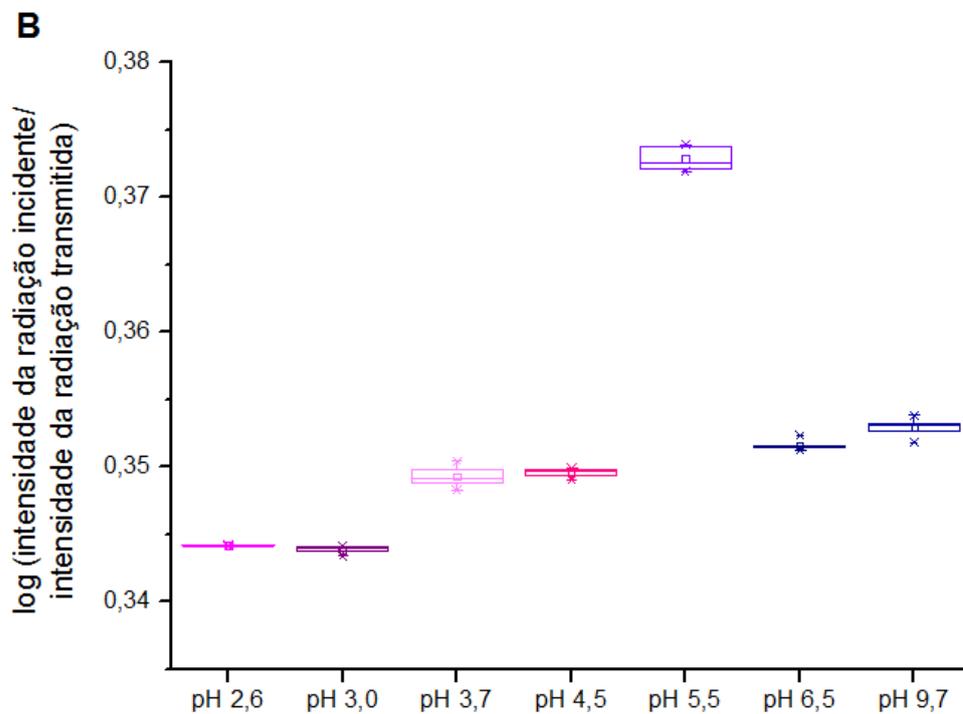
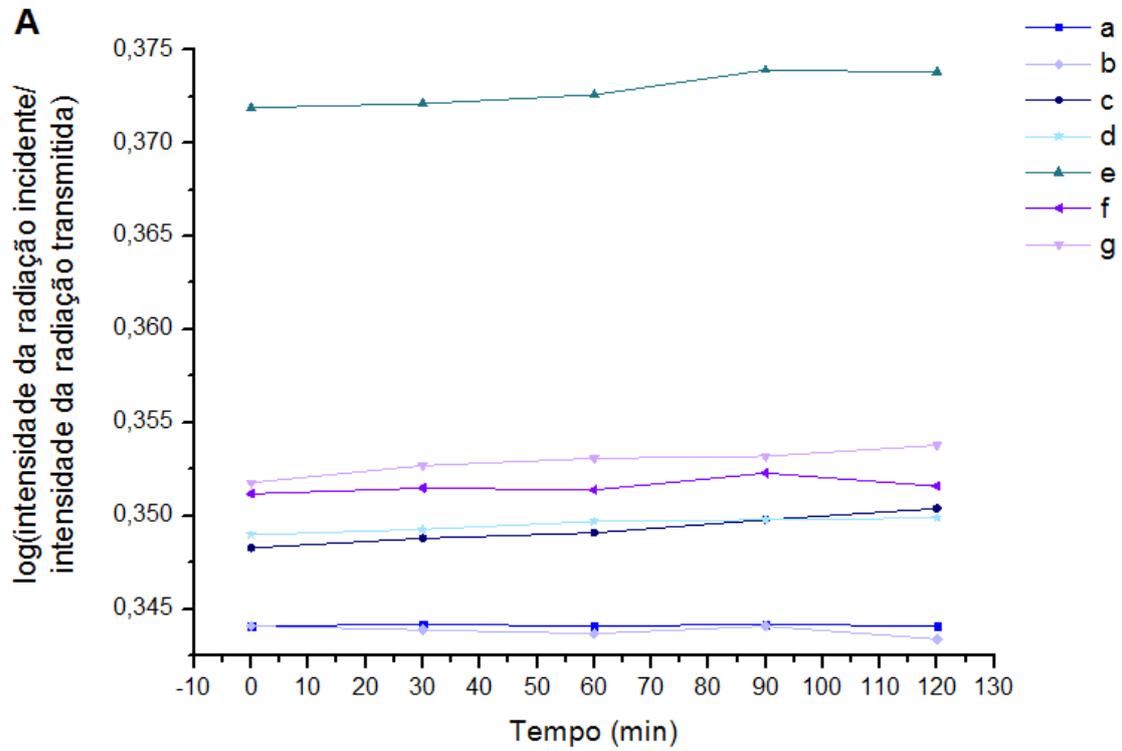


Figura 44. Estudo de estabilidade das dispersões-branco em diferentes valores de pH. A) sinal das dispersões-branco em função do tempo (em diferentes valores de pH (linhas de a-g representando valores de pH de 2,6 a 9,7, com incrementos de, aproximadamente, 1 unidade de pH), monitorados em 530 nm); B) Diagrama Box plot para a variação de sinal em um mesmo pH.

Ao se avaliar as magnitudes dos sinais em função do pH, notou-se que em valores de pH acima de 4,5 (nas dispersões contendo TBR) ocorreu um aumento na intensidade do sinal da sonda observado claramente em 529 nm e consequente uma diminuição na intensidade do sinal observado a partir do monitoramento em 681 nm (Figura 45). Dentre as médias dos sinais obtidas nos 120 min para as dispersões com pH ajustado entre 2,6 e 4,5 tem-se valores de C.V. de 0,88% e 2,77%, para o monitoramento em 529 e 681 nm, respectivamente. A avaliação em toda a faixa de pH estudada (2,6 a 9,7) indica um erro muito maior no comparativo das médias, apresentando C.V. de 4,38% e 36,49%, para o monitoramento do sinal em 530 e 681 nm, respectivamente. Esse resultado indica que o aumento do valor de pH induz um menor efeito da TBR no comportamento óptico da sonda. Esse fato pode ser justificado considerando-se que a interação entre a sonda e TBR é de natureza eletrostática. Uma vez que a estrutura de TBR apresenta grupos amino protonados estes são capazes de interagir com as cargas negativas do agente capeante das AuNPs (citrato), considerando o aumento no valor do pH (faixa básica) os grupo amino tendem a desprotonar, e como consequência têm-se o decréscimo na interação com a sonda. Na Figura 46 encontram-se os espectros das dispersões trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) na faixa de pH de 2,6 a 9,7. É possível observar claramente que a intensidade da banda em torno de 700 nm diminui em função do aumento do valor de pH, evidenciando o decréscimo da interação eletrostática entre as espécies.

Portanto, escolheu-se trabalhar no pH original da sonda (que se encontra na faixa de pH entre 2,6 e 4,5) onde se tem o maior resposta do analito na presença da sonda e uma faixa robusta para medição de sinal.

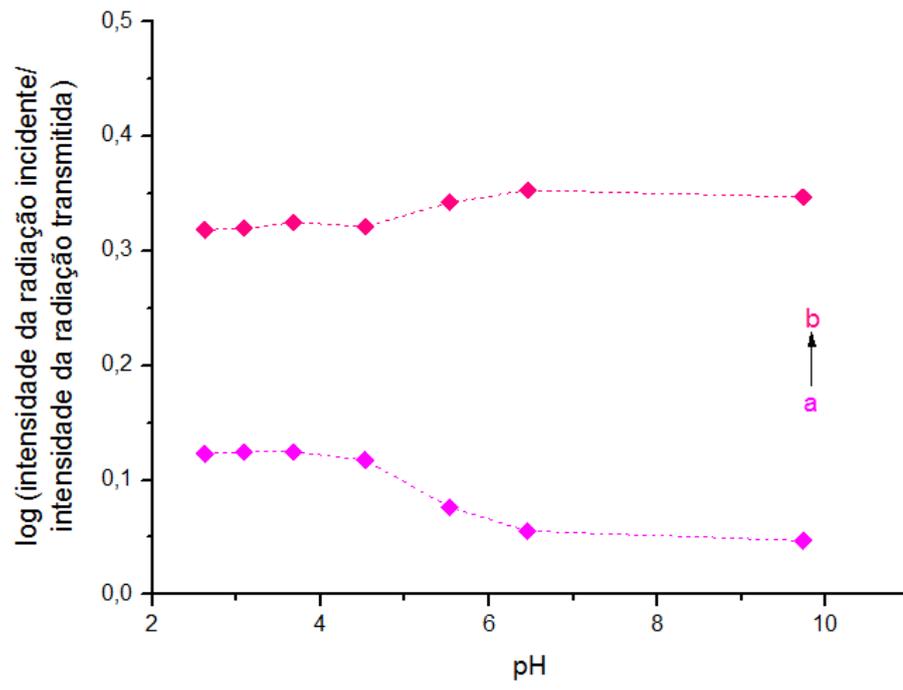


Figura 45. Intensidade de sinal analítico de dispersões de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) na faixa de pH de 2,6 a 9,7, com monitoramento em (a) 530 nm e (b) 681 nm.

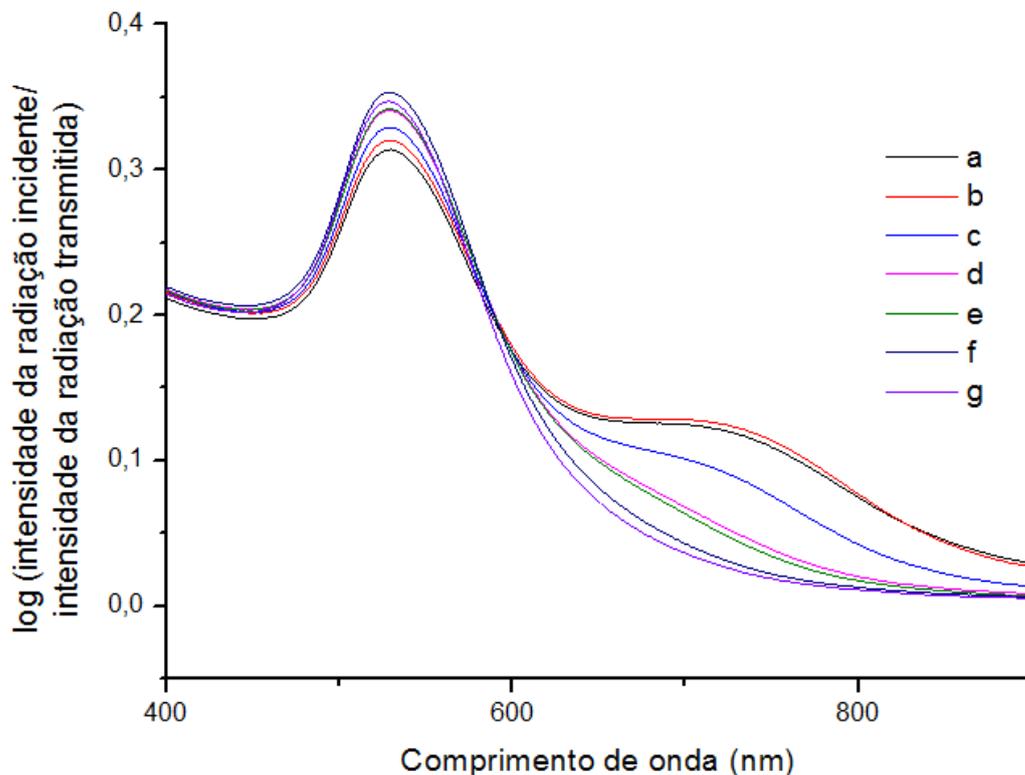


Figura 46. Espectros das dispersões de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), com ajustes no pH do meio na faixa de 2,7 a 9,7; obtidos logo após o preparo das dispersões (tempo 0); pH das dispersões conforme as linhas de a-g: 2,62; 3,09; 3,68; 4,53; 5,53; 6,46 e 9,73.

Para averiguar a estabilidade do valor do pH da sonda em relação ao incremento de analito, foram preparadas dispersões na presença de padrões de TBR com concentrações entre $4,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O valor do pH dessas dispersões aquosas foi monitorada conforme indicado a Figura 47, e o resultado foi a variação aleatória do valor de pH (média de 3,76 com C.V. de 0,36%), Assim, foi possível confirmar que o valor de pH da sonda se mantém estável em função da presença de TBR.

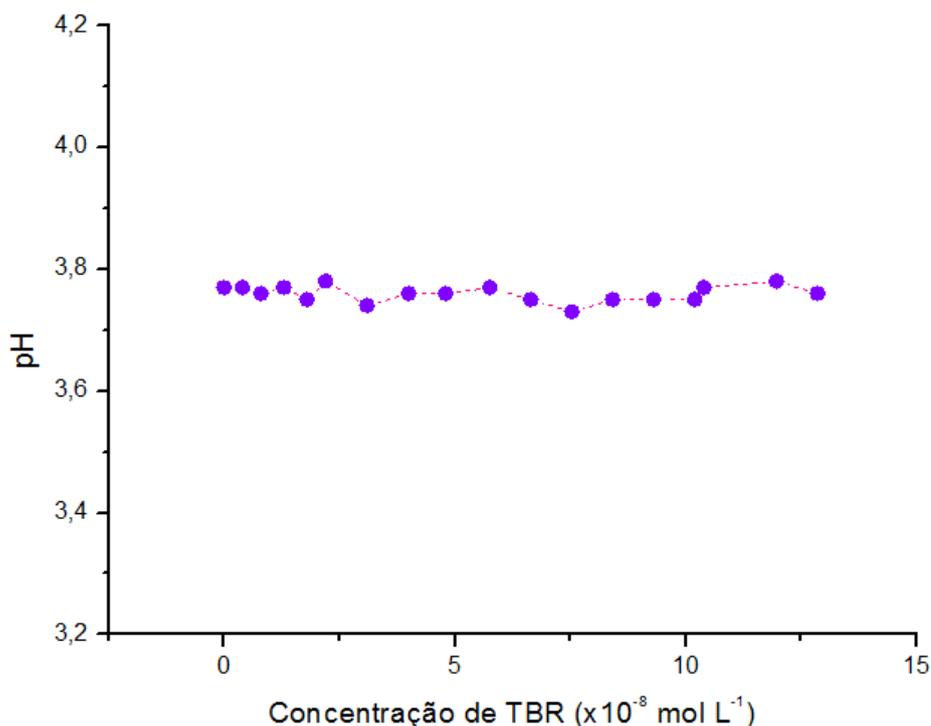


Figura 47. Monitoramento do valor do pH em dispersões de trabalho de AuNPs em função do aumento da concentração de TBR (0,0; 0,4; 0,8; 1,3; 1,8; 2,2; 3,1; 4,0; 4,8; 5,8; 6,7; 7,5; 8,4; 9,3; 10,2; 10,4; 12,0; 12,9 ($\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$)).

Tendo em vista esses resultados, percebeu-se que o próprio meio aquoso resultante da síntese de AuNPs (que utiliza um sal citrato) já exerce um efeito de tamponamento de modo a manter o pH constante frente a adição de padrões de TBR e, possivelmente das amostras que serão analisadas. Isso é importante, pois variações de pH da sonda potencialmente provocadas pela adição de amostras ou padrões podem contribuir para a variação de sinal medido que conseqüentemente acarretará em erro sistemático da análise.

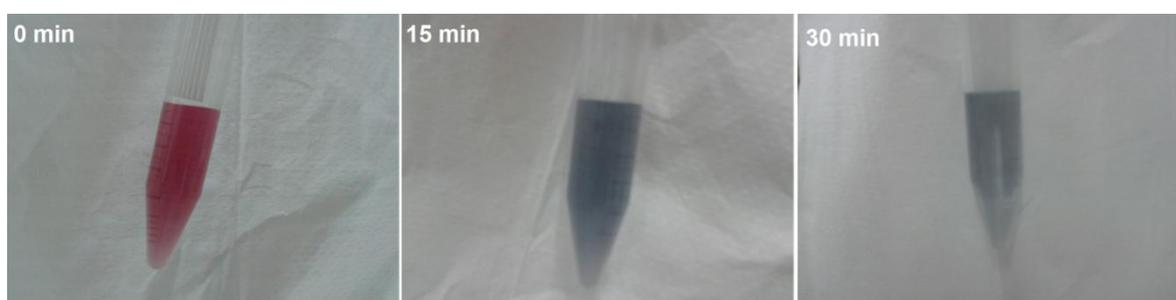
A capacidade tamponante do sistema em relação à adição de ácido forte ou de base forte foi estudada. Verificou-se que para promover a alteração de uma unidade de pH (2,8 para a adição de ácido e 4,8 para a adição de base) foram necessários respectivamente a adição de 0,25 mmol de HCl e 0,05 mmol de NaOH o que indicou uma resistência menor à adição de soluções básicas.

Tendo em vista esses resultados, foi possível estabelecer as condições da sonda para a aplicação analítica quantitativa de determinação de TBR. As variáveis otimizadas encontram-se na Tabela 19 (variáveis estas que dizem respeito ao pH da sonda, ao tempo de análise e à diluição das AuNPs para obtenção das dispersões de trabalho na ausência e na presença de TBR).

Tabela 19. Condições estabelecidas para a sonda de AuNPs para determinação de AMG.

Variável	Condição estabelecida
pH da sonda	3,8 (pH original da sonda, sem adição de tampão)
Tempo máximo de análise	120 min (intervalo de tempo no qual garante-se a estabilidade das dispersões)
Concentração de AuNPs na dispersão-mãe	$3,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$
Concentrações de AuNPs nas dispersões de trabalho	$2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$

Durante o desenvolvimento do procedimento, percebeu-se que todo o preparo das dispersões de AuNPs (mãe e dispersões de trabalho) exigia o uso de materiais de vidro, pois ao utilizar-se tubos de polipropileno (tipo tubos Falcon®) na preparação notou-se um descoramento das dispersões de AuNPs após cerca de 5 min de contato com o recipiente, tornando-se evidente que as AuNPs adsorvem na superfície do polímero, o que inviabiliza prática a utilização desses tubos (Figura 48). Outra observação importante diz respeito à limpeza das vidrarias, pois apesar das superfícies de vidro não apresentarem uma interação tão intensa com as AuNPs, como a percebida para com os materiais de polipeopileno, a possibilidade de adsorção de resíduos geraria um efeito de memória das análises, por isso, fez-se necessário estabelecer um padrão de limpeza específico a partir do uso de um detergente (Extran, 5%) e de um agente oxidante (HNO_3 , 20%, em contato prolongado com as superfícies (24 horas)), conforme descrito no Capítulo 3.

**Figura 48.** Descoloramento, em função do tempo, das dispersões de AuNPs devido à adsorção das mesmas em tubos Falcon®.

5.2. Parâmetros analíticos de mérito

Tendo em vista a resposta analítica da sonda na presença de AMG, decidiu-se desenvolver um método analítico para determinação indireta de TBR por meio da resposta da sonda de AuNPs (obtidas pela síntese IV) que é decorrente da alteração do efeito de ressonância plasmônica na superfície das nanopartículas como consequência da presença do TBR. Para tal, primeiramente se avaliou os parâmetros analíticos de mérito do método.

5.2.1. Faixa de trabalho e faixa linear

Como mostrado, a presença de TBR nas dispersões de trabalho provoca dois efeitos ópticos característicos da polarização das AuNPs. Primeiro, a banda espectral na faixa de 500 nm (polarização transversal) sofre um decréscimo de intensidade com o aumento da concentração de TBR. Concomitantemente, a banda espectral na faixa de 700 nm aparece e sofre um incremento, com o aumento da concentração de TBR, devido ao efeito de polarização longitudinal característica da aglomeração de AuNPs. Esses dois efeitos podem ser visualizados nos espectros da Figura 49. Do ponto de vista macroscópico, verificou-se que a medida em que a concentração de TBR aumenta na dispersão aquosa, ocorre uma variação de coloração no meio que vai do mais avermelhado (ausência de TBR) até o mais azulado (Figura 50).

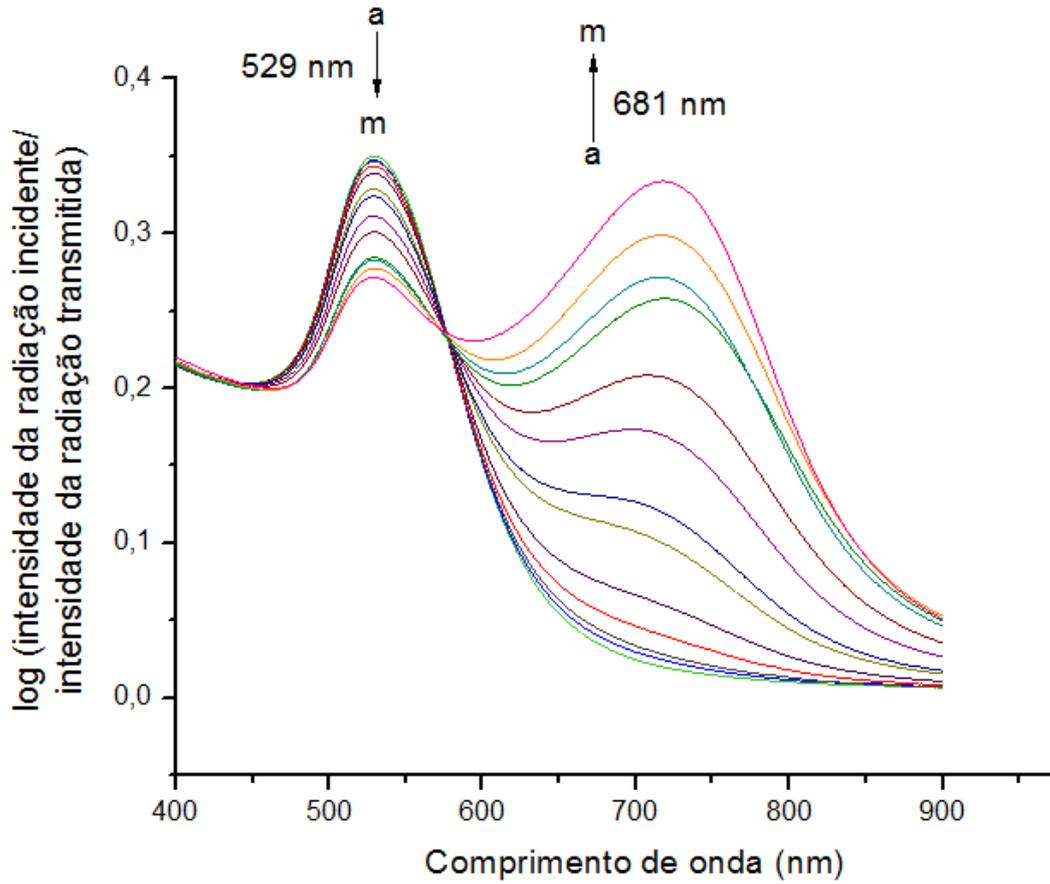


Figura 49. Espectros das dispersões de trabalho de AuNPs ($2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência e e na presença de concentrações crescentes de TBR. Linhas de a-m: concentrações de TBR (0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 2,8; 5,2; 6,0; 8,4; 10; 11; 12; 14; 16 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)).

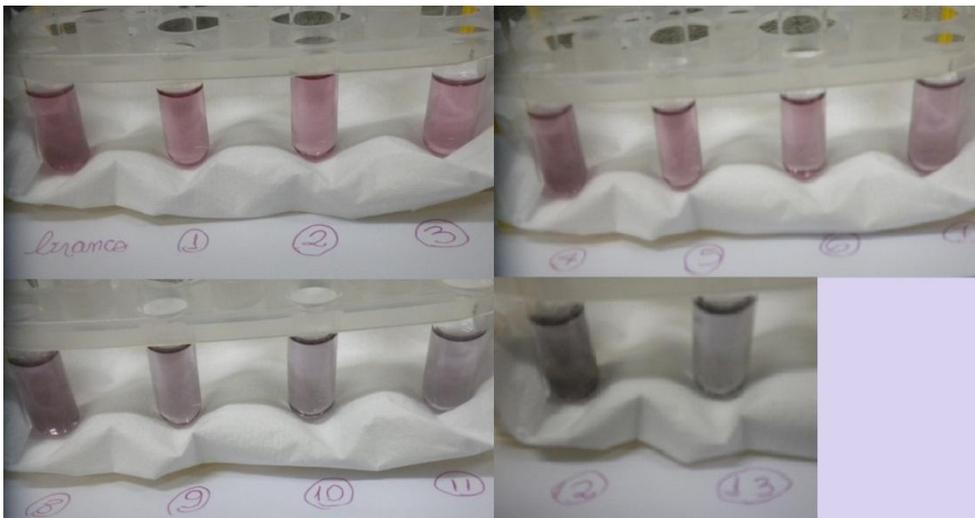


Figura 50. Alterações macroscópicas da coloração da sonda (concentração de AuNPs de $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) em decorrência do incremento de TBR. Concentrações de TBR nas dispersões de 1 a 13: (0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 2,8; 3,2; 5,2; 6,0; 8,4; 10; 11; 12; 14; 16 ($\times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)).

Os três artigos encontrados na literatura utilizando-se dispersões coloidais de ouro como sonda para determinação de AMG reportam a avaliação do sinal através de uma correção relativa entre o sinal da banda com polarização longitudinal e o sinal da banda com polarização transversal, contudo, essa abordagem gera uma curva de resposta com um perfil sigmoidal de maneira que a faixa linear é obtida a partir da assíntota vertical encontrada. Com este perfil de resposta, a faixa linear do método é composta apenas pelas concentrações do AMG que encontram-se na assíntota vertical, assim, a resposta analítica é distorcida em concentrações mais baixas ou mais elevadas do AMG (Wang *et al.* 2013; Apyari *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). De acordo com o método proposto no presente trabalho, a resposta analítica da sonda para o aumento de concentração da TBR foi avaliada a partir de comprimentos de ondas fixos associados ao decréscimo de intensidade do sinal da banda espectral na qual ocorre a polarização transversal (529 nm) e a partir do incremento de sinal na banda espectral onde ocorre a polarização longitudinal (681 nm). A escolha de comprimentos de ondas fixos evita o erro associado ao deslocamento das bandas espectrais para o vermelho, decorrentes da formação dos complexos entre as AuNPs e as moléculas de TBR, aumentando a faixa linear de resposta quando comparado aos encontrados na literatura (Tabela 20).

Associado ao fato da escolha de comprimentos de onda fixos para monitoramento do sinal analítico, percebeu-se que a sonda de AuNPs aqui avaliada promoveu uma resposta com menor deslocamento dos máximos das banda com polarização longitudinal, apresentando uma variação entre 719 e 686 nm (variação de 33 unidades), ao passo que as variações vistas nos espectros apresentados na literatura são de 650-600 nm (Wang *et al.*, 2013) e 700-630 nm (Apyari *et al.*, 2013).

Além da forma de avaliação do sinal, outra diferença entre esses trabalhos e o método aqui proposto reside na concentração de AuNPs das dispersões de trabalho, conforme indica a Tabela 20, a literatura relata o uso de dispersões com concentrações de AuNPs superiores em cinco ou seis ordens de grandeza à

concentração proposta no presente trabalho, logo, o método aqui proposto apresenta uma vantagem também com relação ao custo.

É válido salientar que no método descrito por Apyari *et al.* (2013) os autores aumentaram a concentração de AuNPs nas dispersões de trabalho a fim de estender a faixa linear, entretanto, associou-se a isso uma perda da capacidade de detecção do AMG. Já no método proposto por Wang *et al.* (2013), os autores separaram as concentrações maiores, do AMG, das concentrações menores para obtenção de linearidade do método.

O método aqui proposto é mais sensível e apresenta uma faixa linear mais extensa do que as reportadas na literatura para outros AMG que estão indicados na Tabela 20, utilizando uma concentração de AuNPs inferior às vistas na literatura em até seis ordens de grandeza.

Tabela 20. Métodos reportados por ¹Apyari *et al.* (2013) e ²Wang *et al.* (2013) para a determinação de NEO e KANA através de sondas de AuNPs, comparados com o método proposto do presente trabalho³ para a determinação de TBR através de sondas de AuNPs.

Concentração de AuNPs nas dispersões (mol L ⁻¹)	AMG determinado	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	Faixa linear (x10 ⁻⁸ mol L ⁻¹)
¹ 7,0 x 10 ⁻⁵	NEO	30 a 40	3,3 a 4,4
¹ 2,0 x 10 ⁻⁴	NEO	60 a 100	6,6 a 11,0
¹ 5,0 x 10 ⁻⁴	NEO	70 a 150	7,7 a 16,5
² 2,11 x 10 ⁻⁴	KANA	3,8 a 42,5	0,6 a 7,3
² 2,11 x 10 ⁻⁴	KANA	4,4 a 98,8	7,6 a 16,9
³ 2,4 x 10 ⁻¹⁰	TBR	1,9 a 74,8	0,4 a 16

A avaliação da faixa de resposta do método (monitorando-se o sinal da sonda em comprimentos de onda fixos: 529 e 681 nm) foi feita tomando-se uma faixa de trabalho com concentrações de TBR entre 10⁻⁹ e 10⁻⁷ mol L⁻¹. Observou-se que em concentrações de TBR acima de 1,6 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ o sinal da sonda, log (intensidade da radiação incidente/intensidade da radiação transmitida) ou log I₀/I, tende a diminuir em 681 nm, acompanhado de um intenso deslocamento da intensidade máxima da banda para regiões de maior comprimento de onda, além disso, percebeu-se uma diminuição da taxa de decréscimo de intensidade do sinal da sonda em 529 nm, tendendo-se a igualar ao sinal em 681 nm quando em altas concentrações de TBR (Figura 51). Verificou-se linearidade do sinal analítico, associando-se às concentrações de TBR compreendidas na faixa entre 4,0 x 10⁻⁹ e

$1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se um elevado valor de coeficiente de determinação da reta (maior do que 0,99) para ambos os comprimentos de onda (Tabela 20). A Figura 52 apresenta as curvas analíticas com monitoramento do sinal da sonda para os dois comprimentos de onda e a Tabela 21 apresenta os parâmetros relativos a essas curvas.

Analisando-se a resposta da sonda sob o prisma do que foi reportado na literatura, relacionou-se o incremento de concentração de TBR (na faixa linear antes apresentada) com a relação entre os sinais das duas bandas, nos comprimentos de onda descritos por Apyari *et al.* ($\lambda_{700}/\lambda_{520}$), obtendo-se um coeficiente de determinação da reta de 0,9813 (equação da reta: $Y = 7,5391 \times 10^6 X + 0,0017$). Tendo em vista que a intensidade máxima do sinal da sonda de AuNPs (obtidas a partir da síntese IV), na banda decorrente da polarização transversal, é percebida em 529 nm, averiguou-se também a relação entre os sinais de 529 nm e 700 nm ($\lambda_{700}/\lambda_{529}$) e a resposta analítica em função desta relação em função do aumento de concentração de TBR (na mesma faixa linear considerada anteriormente), obtendo-se um coeficiente de determinação da reta de 0,9812 (equação da reta: $Y = 7,4118 \times 10^6 X + 0,0013$). Tais resultados deixam evidente, que o sinal avaliado apresenta maior comportamento linear nos comprimentos de onda fixos, escolhidos para o método aqui proposto.

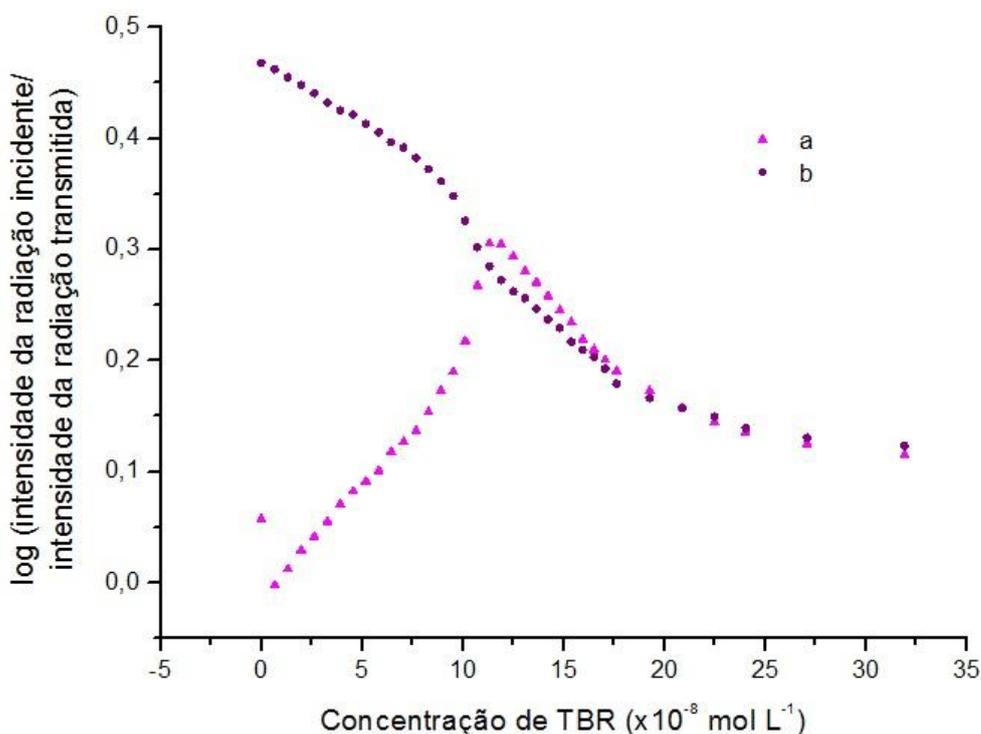


Figura 51. Avaliação qualitativa do comportamento da sonda com monitoramento do sinal em 529 nm (b) e em 681 nm (a), na presença de concentrações de TBR variando de 0,7 a $31,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 21. Parâmetros analíticos das curvas com monitoramento do sinal da sonda ($\log I_0/I$) em 529 nm ou 681 nm.

λ (nm)	Coefficiente linear	Coefficiente angular	R^2
529	$3,5 \times 10^{-1} \pm 1,0 \times 10^{-3}$	$-(5,0 \pm 0,1) \times 10^5$	0,9943
681	$2,5 \times 10^{-2} \pm 3,1 \times 10^{-3}$	$(1,8 \pm 0,04) \times 10^6$	0,9949

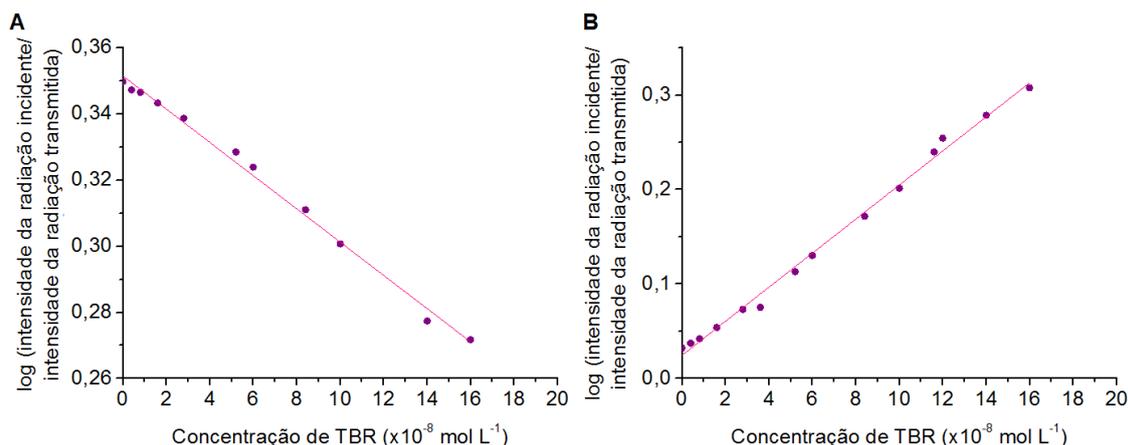


Figura 52. Curvas analíticas construídas a partir de dispersões de AuNPs na presença de TBR (faixa de $4,0 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) nos seguintes comprimentos de onda: A) 529 nm; B) 681 nm.

Para verificar a homoscedasticidade das curvas analíticas, foram feitos gráficos de resíduos usando os pontos das curvas construídas com monitoramento de sinal tanto em 529 nm quanto em 681 nm. Conforme observado na Figura 53, ambos os gráficos de resíduos, indicam a homoscedasticidade da resposta analítica em virtude do comportamento aleatório dos resíduos em função da concentração de TBR.

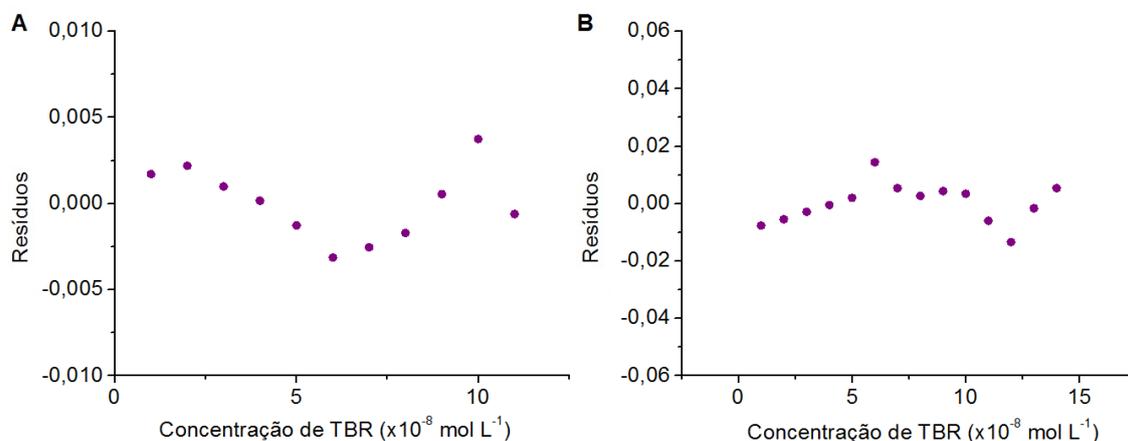


Figura 53. Gráfico de resíduos para as curvas analíticas construídas a partir de dispersões de AuNPs na presença de TBR: A) com monitoramento de sinal em 529 nm; B) com monitoramento de sinal em 681 nm.

5.2.2.

Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

Considerando-se os sinais de log (potência radiante incidida/potência radiante transmitida) de dez valores de dispersões-branco, com monitoramento em 529 nm e 681 nm, obtiveram-se os sinais médios de $0,3546 \pm 0,0021$ e $0,03144 \pm 0,0003$ para os respectivos comprimentos de onda. O LQ foi calculado encontrando-se na equação da curva o valor de concentração correspondente ao valor das médias dos sinais das dispersões-branco (x_b) acrescidos de dez vezes do valor do desvio padrão (s_b) entre as medidas (x_b+10s_b). Os resultados obtidos para ambos os comprimentos de onda encontram-se na Tabela 22.

O monitoramento em 681 nm apresentou um LQ inferior ao apresentado para o monitoramento em 529 nm, desse modo, a faixa linear estabelecida é condizente com os resultados em 681 nm, todavia, em função dos resultados apresentados com monitoramento do sinal em 529 nm, fez-se necessário ajustar a faixa linear nesse comprimento de onda para concentrações de TBR compreendidas entre $6,5 \times 10^{-9}$ e $1,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

O LD foi calculado encontrando-se na equação da curva o valor de concentração correspondente à x_b+3s_b . Os resultados obtidos para ambos os comprimentos de onda encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22. Limites de detecção e de quantificação para o sinal monitorado em 529 e 681 nm.

λ (nm)	LD (mol L^{-1})	LQ (mol L^{-1})
529	$6,2 \times 10^{-9}$	$6,5 \times 10^{-9}$
681	$3,8 \times 10^{-9}$	$4,4 \times 10^{-9}$

5.2.3.

Robustez

Os estudos de robustez do método foram descritos nas seções 5.1 e 5.2, através de uma avaliação univariada do comportamento de dispersões de trabalho de AuNPs na ausência e na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Avaliou-se a alteração do sinal da sonda com relação à alteração do pH do meio (estudando-se

uma faixa de pH entre 2,6 e 9,7) e com relação ao tempo de preparo das dispersões. Conforme os resultados já apresentados, o sinal da sonda mostrou-se robusto na faixa de pH entre 2,6 e 4,5. Nessa faixa as dispersões de trabalho na ausência de TBR (dispersões-banco) apresentaram C.V. entre os sinais de log (I_0/I) iguais a 0,90% e 2,19% para o monitoramento em 529 nm e 681 nm, respectivamente, ao passo que as dispersões de trabalho contendo TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) apresentaram um C.V. entre os sinais iguais a 0,89% e 2,77% para o monitoramento em 529 nm e 681 nm, respectivamente.

Com relação ao tempo pós preparo das dispersões, o sinal da dispersão-branco manteve-se estável por 120 min (C.V.= 0,18%), sendo que, apesar das maiores variações percebidas em intervalos de tempo superiores a este, o sinal da sonda manteve-se consideravelmente estável por 360 min (C.V. = 0,68%), entretanto, o procedimento de análise não excede 120 min o que garante a estabilidade do sinal analítico em todas as medições realizadas. A Figura 54 indica a estabilidade, em função ao tempo, de uma dispersão de trabalho de AuNPs na presença TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Verifica-se que o sinal da sonda é estável, mesmo em presença de TBR, nos 120 min avaliados, apresentando baixos desvios entre as medidas (valores de C.V. iguais a 0,13% e 0,76% para o monitoramento do sinal em 529 nm e 681 nm, respectivamente). Desse modo, o método foi considerado robusto durante todo o tempo de análise e na faixa de pH da sonda.

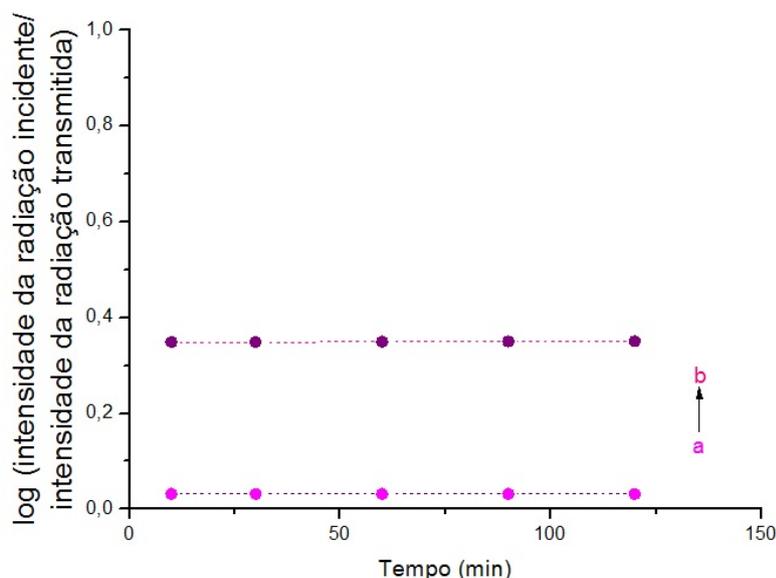


Figura 54. Intensidade do sinal de uma dispersão de trabalho de AuNPs na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo com medidas realizadas após 5 min do preparo da dispersão. Monitoramento do sinal em a) 529 nm e b) 681 nm.

5.2.4. Precisão instrumental e intermediária

A precisão instrumental foi avaliada considerando-se os valores de C.V. calculados a partir dos dados coletados em dez medições consecutivas de sinal (em 529 e em 681 nm) em dispersões de trabalho. No caso, dois níveis concentração de TBR (presentes nas dispersões de trabalho) foram testados: $6,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Para a precisão intermediária do método, os valores de C.V. foram obtidos das medições de sinal (em 529 e em 681 nm) de dois conjuntos de cinco dispersões de trabalho (réplicas autênticas), onde cada conjunto continha uma concentração diferente de TBR ($6,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹). Os resultados indicaram variações percentuais inferiores a 3% (Tabela 23) o que mostra que a resposta da sonda é adequada para a aplicação analítica proposta.

Tabela 23. Precisão Intermediária e Instrumental da sonda de AuNPs.

λ (nm)	Precisão intermediária ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)	Precisão intermediária ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹)	Precisão instrumental ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)	Precisão instrumental ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹)
529	0,34%	0,64%	0,07%	0,18%
681	2,61%	0,92%	0,37%	0,40%

5.2.5. Seletividade da resposta analítica

5.2.5.1. Seletividade avaliada com relação aos componentes das matrizes das amostras reais

Uma vez que um dos objetivos deste trabalho visou à quantificação de TBR em soluções oftálmicas, testes de seletividade foram feitos com todas as substâncias que compõem as matrizes dos medicamentos Tobrex e Tobragan (medicamentos selecionados para esse estudo). A descrição dos componentes da matriz desses medicamentos e suas quantidades típicas são indicadas na Tabela 24 cujos dados foram obtidos das patentes de soluções oftalmológicas de TBR. A Tabela 24 indica a composição de apenas uma das patentes de solução oftálmicas

de TBR, contudo, outros três tipos de patentes registradas foram encontradas e notou-se que a proporção dos excipientes no meio não se alterava significativamente, muito embora hajam pequenas variações com relação aos excipientes presentes em cada uma das formulações (Edwards, 1989; Stark, 1983; Cagle *et al.*, 1989; Cagle *et al.*, 1989).

Tabela 24. Composição das soluções oftálmicas com base nas informações de patente. (Cagle *et al.*, USA, Patente: 5149696, 1992).

Substância	Concentração prevista (m/v)	Teor (%)
Tobramicina	3,0 mg + 5% de excesso	0,30 + 5% de excesso
Cloreto de benzalcônio	0,001 mL + 10% de excesso	0,01% +10% de excesso
EDTA, USP	0,1 mg	0,01%
Cloreto de sódio, USP	3,0 mg	0,3%
Sulfato de sódio, USP	12,0 mg	1,2%
Tiloxapol, USP	0,5 mg	0,05%
Ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio	Quantidade suficiente para o ajuste do pH em $5,5 \pm 0,5$	
Água ultrapura, USP	Aproximadamente, 1 mL	Aproximadamente, 100%

A seletividade foi avaliada em termos da variação do sinal analítico de dispersões de trabalho, contendo uma concentração fixa de tobramicina ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹), na presença das demais substâncias (usadas como excipientes). Assim, avaliou-se o fator $[\log(I_0/I_{TBR})/\log(I_0/I_{TBR+\text{excipiente}})] \times 100$, que é a razão, em termos percentuais, entre o valor do sinal da sonda contendo TBR ($\log I_0/I_{TBR}$) e o valor dessa mesma sonda contendo quantidades específicas do potencial interferente, ou seja, $\log(I_0/I_{TBR+\text{excipiente}})$. Nas Figuras 55 e 56 são apresentados os resultados desses testes de interferência, considerando-se o monitoramento do sinal tanto em 529 nm quanto em 681 nm.

Os testes de interferência para as substâncias inorgânicas foram feitos a partir das concentrações molares utilizando-se a proporção de 1:1 em relação a TBR: potencial interferente, sendo esta uma proporção muito mais elevada do que a esperada para matrizes oftálmicas típicas. Conforme indicado nas Figuras 55 e 56, os testes de interferência com as substâncias inorgânicas presentes na formulação (ácido bórico, sulfato de sódio, cloreto de sódio e hidróxido de sódio) não provocou variações significativas do sinal da sonda até proporções de 1:1, apresentando percentuais de variação entre -1,5 e 0,6% em 529 nm e entre -1,9 e

2,6% em 681 nm. Conforme pode ser observada na especificação da patente, essas substâncias encontram-se em proporções TBR:excipiente inferiores a 1:1, com exceção do sulfato de sódio que está presente no colírio na proporção de 1:4. No entanto, o percentual de interferência encontrado para a proporção 1:5 de TBR:Na₂SO₄ indicou uma variação no sinal da sonda de 3,4% (com monitoramento do sinal em 681 nm), que indica que este sal é um interferente do método, entretanto, o sulfato de sódio encontra-se na proporção de 1:3 de TBR:Na₂SO₄, assim, considerando-se que avaliou-se uma proporção um pouco mais elevada, pode-se inferir que o sulfato de sódio não é interferente ao método na proporção encontrada nas formulações das soluções oftálmicas.

Outra alteração percebida com relação às substâncias inorgânicas foi a variação do sinal da sonda em 4,1% provocado pelo ácido clorídrico na proporção de TBR:HCl de 1:1, todavia, não considerou-se este resultado importante, pois tanto o ácido clorídrico quanto o hidróxido de sódio são utilizados apenas para ajuste do pH da solução oftálmica, ou seja parte do HCl é reagido no meio mantendo-o em quantidades não significantes em termos de interferência. Isso foi confirmado pela avaliação do pH de uma das soluções oftálmicas (Tobrex) encontrando-se o valor de 5,8. Assim sendo, tornou-se evidente que tanto o ácido clorídrico bem como o hidróxido de sódio estão presentes nas soluções oftálmicas em concentrações muito baixas, dessa forma, a alteração do sinal da sonda foi provocada por uma concentração de HCl muito maior do que a encontrada nas soluções oftálmicas, por isso, não foi considerado como um potencial interferente.

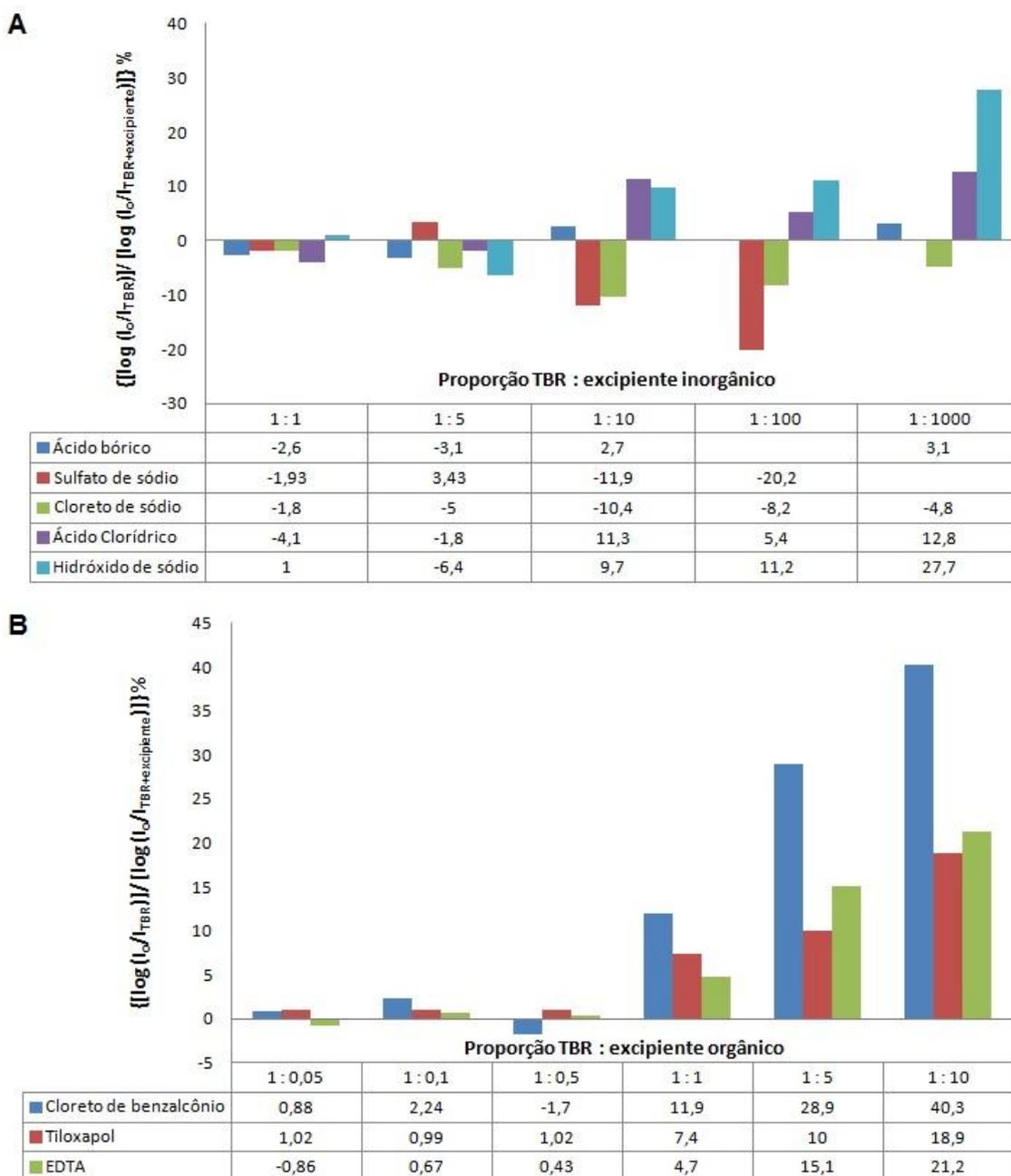


Figura 56. Avaliação de interferência com relação ao sinal do padrão de TBR $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, em 681 nm separados de acordo com a natureza dos interferentes: A) inorgânicos; B) orgânicos.

Tendo em vista os altos valores de percentuais de interferência avaliados para as substâncias orgânicas na proporção com TBR de 1:1, novos testes foram feitos usando a proporções um pouco superiores as previstas na formulação oftálmica. Conforme indicado na Tabela 25, as proporções utilizadas de cloreto de benzalcônio, tiloxapol e EDTA nas soluções oftálmicas, em relação a uma parte de TBR, são respectivamente: 0,0003; 0,16 e 0,03. Assim, os novos testes de interferência foram feitos com as proporções TBR:excipiente de 1:0,05; 1:0,1 e

1:0,5. Com essa segunda avaliação não percebeu-se nenhuma interferência significativa para nenhuma das substâncias (resultados estão apresentados na Tabela 25).

Tabela 25. Avaliação de interferência de substâncias orgânicas no sinal da dispersão de trabalho contendo TBR ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹).

Substância	¹ Variação (%) em 529 nm nas proporções			¹ Variação (%) em 681 nm nas proporções		
	1:0,05	1:0,1	1:0,5	1:0,05	1:0,1	1:0,5
Cloreto de benzalcônio	0,7	-1,1	0,2	0,9	2,2	-1,7
Tiloxapol	-0,7	0,3	1,0	1,0	0,1	1,0
EDTA	0,2	-1,8	1,7	-0,9	0,7	0,4

$$^1\text{Variação (\%)} = (\log(I_0/I_{\text{TBR}})/\log(I_0/I_{\text{TBR+excipiente}})) \times 100$$

Conforme indicado na Tabela 26, considerando-se a avaliação da interferência de todos os excipientes das soluções oftálmicas em proporções iguais (ou superiores quando as concentrações das substâncias são muito baixas) às previstas nas patentes destes medicamentos, tem-se que nenhum dos excipientes será interferente na análise destas amostras nas proporções mostradas na Tabela 26.

Tabela 26. Avaliação de interferência dos excipientes das soluções oftálmicas no sinal da dispersão de trabalho contendo TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), em proporções próximas às previstas nas patentes das mesmas.

Excipiente	Proporção prevista TBR : interferente	Proporção avaliada TBR : interferente	¹ Varição em 529 nm (%)	¹ Varição em 681 nm (%)
Cloreto de benzalcônio	1 : 0,03	1 : 0,05	0,7	0,9
EDTA	1 : 0,03	1 : 0,05	0,2	-0,9
Cloreto de sódio	1 : 1	1 : 1	-1,5	-1,8
Sulfato de sódio	1 : 4	1 : 5	-1,6	3,4
Tiloxapol	1 : 0,17	1 : 0,5	1,0	1,0
Ácido bórico	1 : 1,17	1 : 5	-1,2	-3,1
Ácido clorídrico	1 : $3,8 \times 10^{-5}$	1 : 5	0,2	-1,8
Hidróxido de Sódio	1 : $4,2 \times 10^{-8}$	1 : 1	0,6	1,0

$$^1\text{Variação (\%)} = (\log (I_0/I_{\text{TBR}})/\log (I_0/I_{\text{TBR+excipiente}})) \times 100$$

5.2.5.2. Seletividade com relação à presença de STP

Avaliou-se também a seletividade do método com relação à presença de outro AMG no meio: a estreptomicina (STP). A análise foi feita conforme descrito anteriormente para os componentes das matrizes das soluções oftálmicas: tomando-se como parâmetro de comparação o sinal analítico da dispersão de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e avaliando o desvios deste sinal ao se preparar outros padrões com a adição de diferentes proporções de TBR (variação do sinal = $[\log (I_0/I_{\text{TBR}})/\log (I_0/I_{\text{TBR+STP}})] \times 100$). Conforme pode ser observado na Figura 57, a STP apresentou potencial interferência com valores de concentração de STP superiores a $2,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, numa proporção TBR:STP de 1:3. Em proporções de TBR:STP entre 1:1 e 1:3, não observou-se desvios maiores que 2% em nenhum dos comprimentos de onda. Dessa maneira, comprovou-se que nas concentrações referentes a faixa linear do método, STP não é interferente para a análise de TBR, o que possibilita a determinação de TBR em amostras de medicamentos que contenham os dois AMG em concentrações similares.

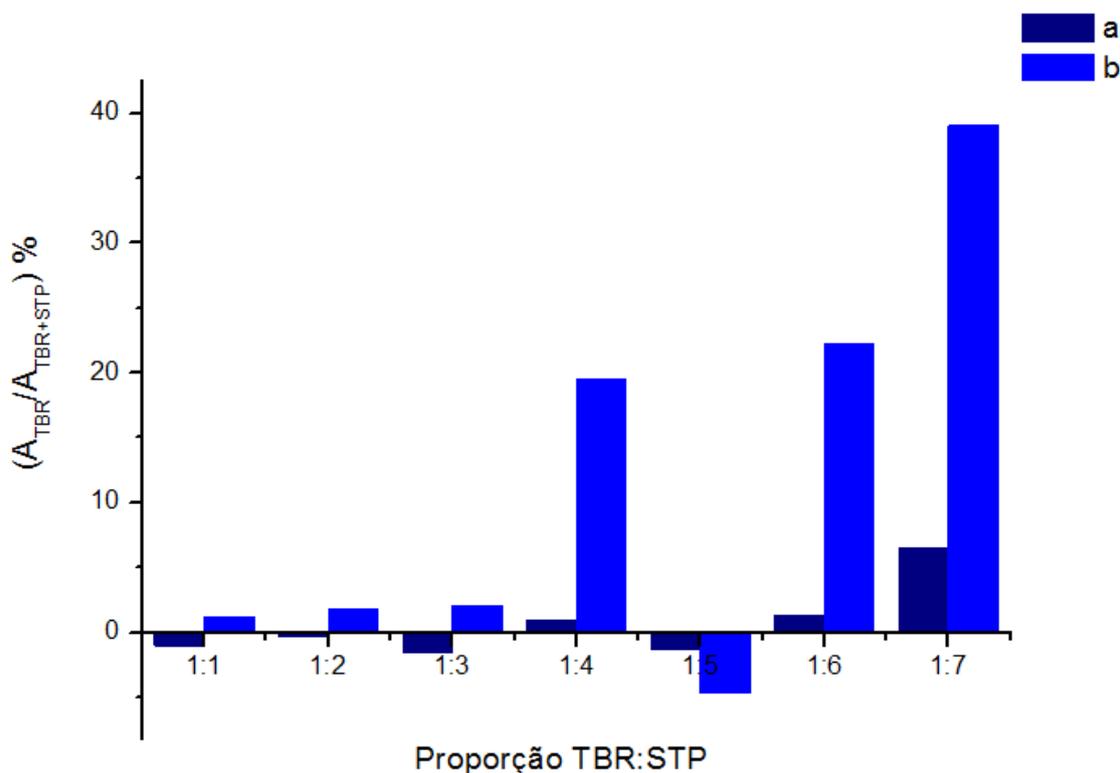


Figura 57. Avaliação da interferência causada pela presença de diferentes concentrações de STP nas dispersões de trabalho contendo TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) nas proporções: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 e 1:7 com monitoramento do sinal em (a) 529 nm e (b) 681 nm.

Com o objetivo de esclarecer um pouco mais o comportamento dos AMG (TBR e STP) perante a sonda de AuNPs, selecionaram-se dispersões de trabalho na ausência de AMG (dispersão-branco) e na presença de TBR ou STP ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) para a realização das análises de microscopia, desse modo, tornou-se possível visualizar a morfologias das dispersões, bem como a modificação imposta na sonda pela presença de TBR que ajudasse a justificar o comportamento seletivo em relação a presença de STP.

Verificou-se que as AuNPs aglomeram-se na presença de TBR, mas tal fenômeno não ocorre na presença de STP (Figura 58). Não foi possível determinar o diâmetro médio das AuNPs no padrão de TBR em função da aglomeração das mesmas, impossibilitando, a separação via programas computacionais para determinação dos diâmetros. A análise das imagens caracteriza o fenômeno eletrostático que a presença de TBR induz nas dispersões de AuNPs e confirmam a seletividade da sonda com relação a presença de STP no meio, na mesma faixa de concentração de TBR.

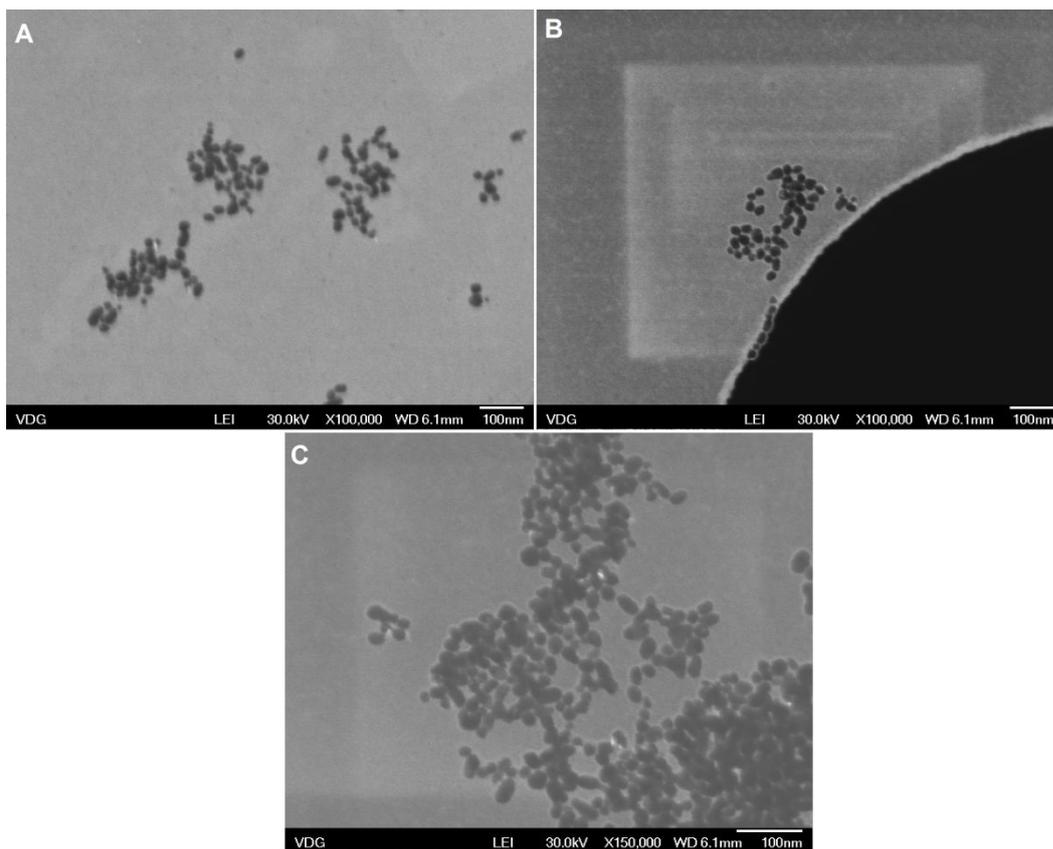


Figura 58. Imagens por STEM: A) dispersão de trabalho na ausência de AMG (dispersão-branco); B) dispersão de trabalho na presença de STP ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e C) dispersão de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

Comparando-se a imagem da dispersão-branco (Figura 58A) com a imagem da dispersão de trabalho na presença de STP ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), Figura 58B, percebe-se que as AuNPs permanecem praticamente inalteradas após a adição de STP. Ao observar-se a imagem gerada pela dispersão de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), Figura 58C, percebe-se que a interação da sonda, neste nível de concentração, só ocorre com TBR. O processamento das imagens de STP deixa dúvidas com relação ao aspecto das imagens (Tabela 27): as médias dos valores de circularidade e de razão de aspectos são praticamente iguais aos encontrados na AuNPs da síntese IV (Tabela 12), contudo, pode-se perceber que o tratamento quantitativo das dimensões das AuNPs deixa a impressão de que no padrão de STP as partículas estão em menores dimensões.

A dúvida é esclarecida ao comparar-se os espectros das dispersões na presença de padrões de STP e TBR com a dispersão-branco (Figura 59): percebe-se que o espectro do padrão de STP permanece inalterado com relação a dispersão-branco (o mesmo não ocorre com dispersão de trabalho contendo TBR),

assim sendo, pode-se inferir que as diferenças com relação à análise morfológica podem ter ocorrido devido a grande heterogeneidade das AuNPs obtidas na síntese IV. Uma vez que as diferenças entre os resultados morfológicos são sutilmente diferentes, mas, não totalmente discrepantes, é cabível assumir que os desvios sejam provocados pelas diferenças entre as nanopartículas, peculiares à dispersão coloidal sintetizada.

Tabela 27. Análise morfológica dispersão de trabalho na presença de STP ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹).

Média das dimensões das AuNPs na presença de STP ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹)					
Eixo maior	Eixo menor	Diâmetro médio	Razão de aspectos	Circularidade	Área
22,75±7,58	16,33±4,73	19,54±6,15	1,33±0,26	0,75±0,13	255,92±156,45

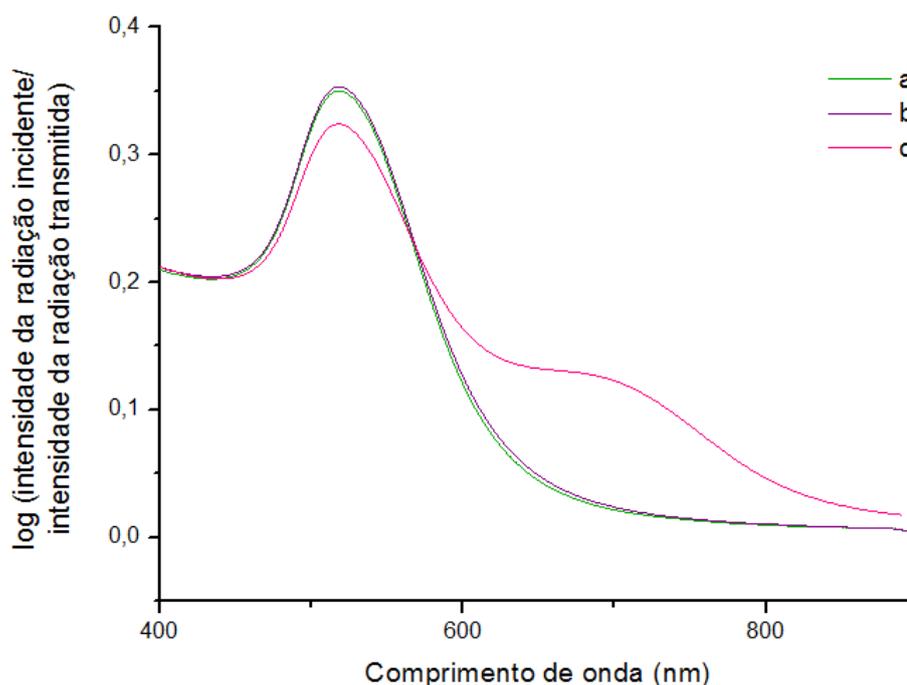


Figura 59. Espectros da (a) dispersão de trabalho na ausência de AMG (dispersão-branco), (b) dispersão de trabalho na presença de STP ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) (c) dispersão de trabalho na presença de TBR ($6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹).

5.2.5.3.

Estudos da interação entre outros AMG e AuNPs

O estudo da resposta óptica da sonda de AuNPs (obtida a partir da síntese IV) foi feito em relação a presença de outros cinco AMG: STP, CANA, NEO, AMIC e GENTA. As condições experimentais otimizadas para a sonda em relação à resposta para a TBR serviram de base para o estudo com os demais AMG. Assim, de maneira geral, os estudos com os AMG seguiram a mesma sequência do que foi feito com a TBR: observou-se o efeito causado pelos diferentes AMG (em concentração cuja ordem de grandeza variou de 10^{-9} a 10^{-7} mol L⁻¹) na resposta óptica da sonda, estabelecendo-se uma faixa linear de resposta e observando-se a repetibilidade dessa resposta ao comparar-se os parâmetros analíticos das curvas analíticas obtidas em duplicata por dois analistas diferentes.

De maneira geral, todos os AMG avaliados, com exceção de STP, apresentaram um perfil de interação muito similar com a sonda de AuNPs (obtidas de acordo com a rota sintética IV), na faixa de trabalho entre 10^{-9} e 10^{-7} mol L⁻¹. Nota-se que o aumento de concentração dos AMG provoca uma diminuição da intensidade do sinal (logaritmo da (potência radiante incidida/potência radiante transmitida)) em 529 nm e um incremento caracterizado pelo aparecimento da banda espectral com intensidade máxima em torno de 700 nm.

A faixa linear foi estabelecida, para todos os AMG, considerando-se como limite o ponto de saturação da resposta da sonda de AuNPs para cada um deles, ou seja, a faixa linear foi considerada até a última concentração na qual percebia-se uma tendência de incremento de sinal com monitoramento em 681 nm, após essa dada concentração, ao perceber-se o decréscimo do sinal monitorado em 681 nm, tem-se o ponto de saturação da sonda e o final da faixa linear.

A Tabela 28 apresenta as faixas lineares encontradas e os parâmetros das curvas analíticas obtidos para os quatro AMG (com exceção de STP,) representados através das médias entre os quatro resultados: as duplicatas obtidas por dois analistas. A repetibilidade dos resultados foi avaliada por uma estatística simples, através do desvio, calculado pelo coeficiente de variação (C.V.), para cada um dos parâmetros das curvas.

Tabela 28. Resultados da avaliação do potencial analítico da sonda de AuNPs (obtidas através da síntese IV), na presença de NEO, AMIC, GENTA e CANA: faixa linear encontrada e média dos parâmetros analíticos das curvas, obtidos em duplicata por dois diferentes analistas, avaliando-se os desvios entre os resultados através do coeficiente de variação.

Sinal da sonda monitorado em 529 nm							
AMG	Coeficiente linear		Coeficiente angular		R ²		Faixa linear (mol L ⁻¹)
	Média:	C.V. (%)	Média:	C.V. (%)	Média:	C.V. (%)	
NEO	0,3551	0,80	-9,7403x10 ⁶	9,14	0,9866	0,53	4,0x10 ⁻⁹ à 6,4x10 ⁻⁸
GENTA	0,3487	0,92%	-3,7393x10 ⁵	11,31%	0,9884	0,46%	4,0x10 ⁻⁹ à 1,2x10 ⁻⁷
CANA	0,3575	2,14	-3,9017x10 ⁵	44,72	0,9608	1,51	4,0x10 ⁻⁹ à 1,6x10 ⁻⁷
AMIC	0,3558	0,58	-5,3117x10 ⁵	25,01	0,9847	0,39	4,0x10 ⁻⁹ à 2,0x10 ⁻⁷
Sinal da sonda monitorado em 681 nm							
AMG	Coeficiente linear		Coeficiente angular		R ²		Faixa linear
	Média:	C.V. (%)	Média:	C.V. (%)	Média:	C.V. (%)	
NEO	0,03308	11,97	3,5025x10 ⁶	4,13	0,9940	0,25	4x10 ⁻⁹ à 6,4x10 ⁻⁸
GENTA	0,03288	13,96%	1,579x10 ⁶	4,00%	0,9935	0,37%	
CANA	0,0197	10,05	1,5294x10 ⁶	1,90	0,9874	0,11	4,0x10 ⁻⁹ à 1,6x10 ⁻⁷
AMIC	0,0173	11,89	1,8380x10 ⁶	11,89	0,9880	0,13	4,0x10 ⁻⁹ à 2,0x10 ⁻⁷

De uma maneira geral, a resposta obtida foi satisfatória em termos do comportamento linear (R² maiores que 0,98, exceto em um caso), com maiores sensibilidades para a NEO e GENTA. Os espectros obtidos da sonda na presença de concentrações crescentes para cada um dos AMG são mostrados na Figura 60. Já as curvas analíticas que mostram o ajuste das concentrações no perfil linear se encontram nas Figuras 61 e 62.

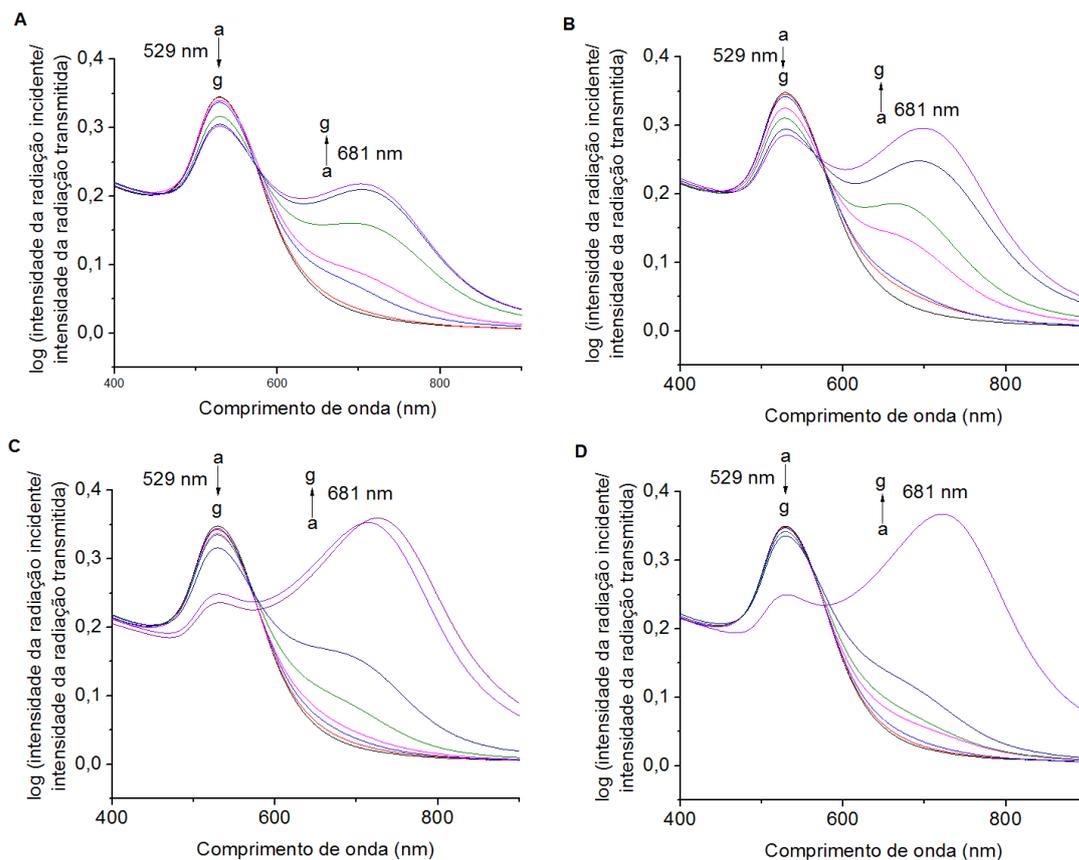


Figura 60. Espectros de dispersões de trabalho de AuNPs (obtidas na síntese IV), na presença de concentrações crescentes dos AMG. A) Concentrações crescentes de GENTA conforme as linhas de a-g: (0,0; 0,8; 2,8; 4,0; 8,4; 10,8; 12,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. B) Concentrações crescentes de NEO conforme as linhas de a-g: (0,0; 0,8; 1,6; 3,2; 4,0; 6,0; 8,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. C) Concentrações crescentes de AMIC conforme as linhas de a-g: (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 16,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. D) Concentrações crescentes de CANA conforme as linhas de a-g: (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 20,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$.

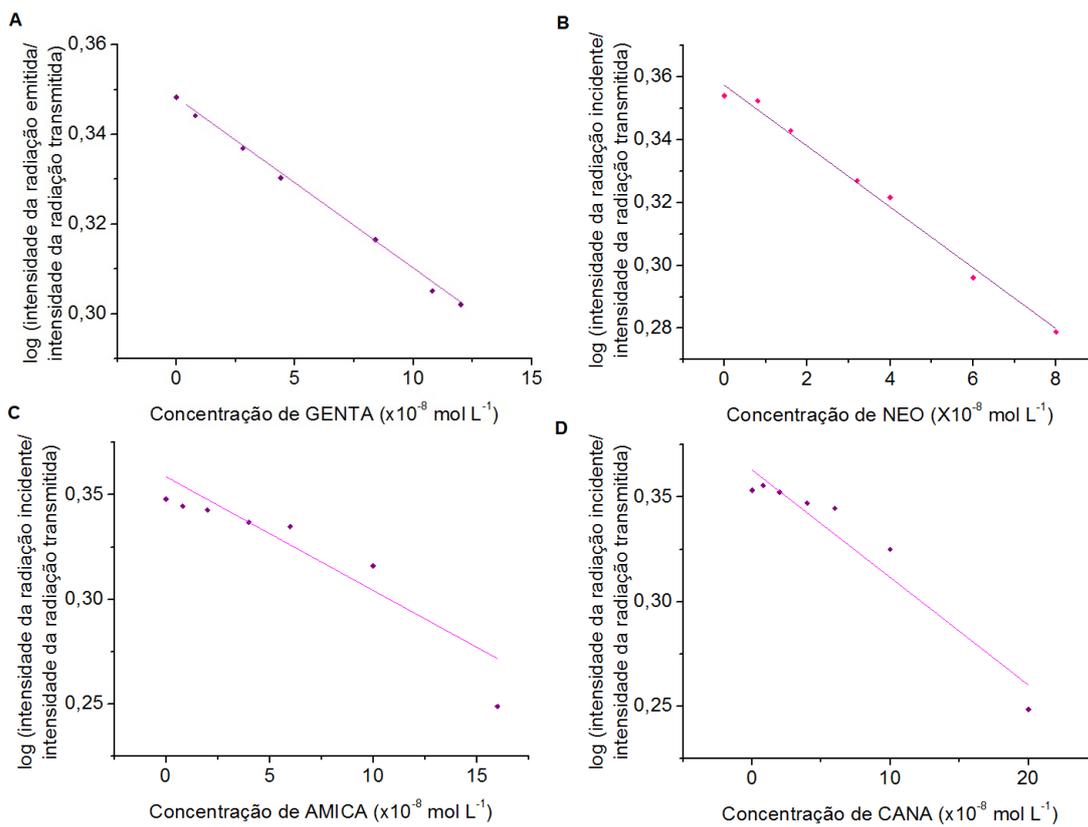


Figura 61. Curvas analíticas dos AMG obtidas através da sonda de AuNPs (produzidas nas condições da síntese IV), com monitoramento do sinal analítico em 529 nm. A) Concentrações crescentes de GENTA (0,0; 0,8; 2,8; 4,0; 8,4; 10,8; 12,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. B) Concentrações crescentes de NEO (0,0; 0,8; 1,6; 3,2; 4,0; 6,0; 8,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. C) Concentrações crescentes de AMIC (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 16,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. D) Concentrações crescentes de CANA (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 20,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$.

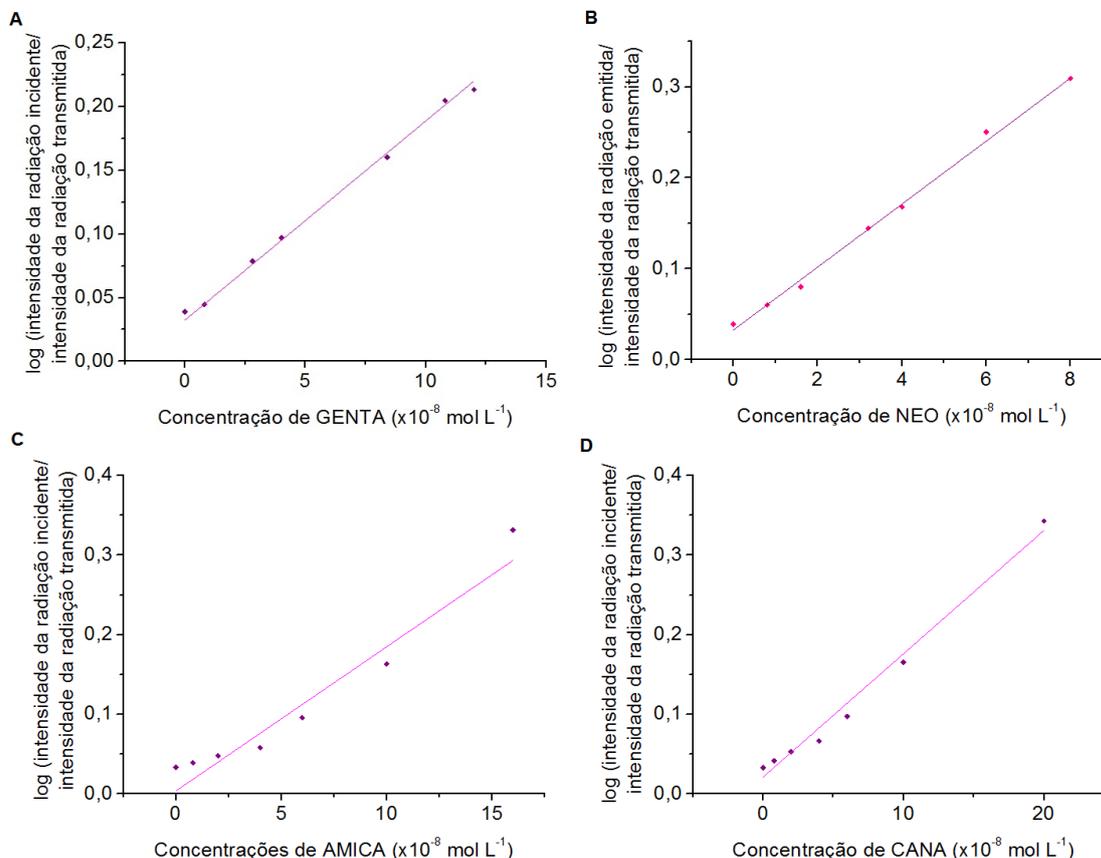


Figura 62. Curvas analíticas dos AMG obtidas através da sonda de AuNPs (produzidas nas condições da síntese IV), com monitoramento do sinal analítico em 681 nm. A) Concentrações crescentes de GENTA (0,0; 0,8; 2,8; 4,0; 8,4; 10,8; 12,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. B) Concentrações crescentes de NEO (0,0; 0,8; 1,6; 3,2; 4,0; 6,0; 8,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. C) Concentrações crescentes de AMIC (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 16,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$. D) Concentrações crescentes de CANA (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 20,0) $\times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$.

5.2.6.

Aplicação do método

5.2.6.1.

Soluções oftálmicas e misturas simuladas

A avaliação tanto para as amostras reais das soluções oftálmicas quanto para as amostras simuladas foi feita a partir do percentual de recuperação, escolhendo-se dosar os analitos nas amostras em dois níveis de concentração ($6,0 \times 10^{-8}$ mol

L^{-1} e $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), fazendo-se as análises em triplicata para garantir a confiabilidade do resultado.

Os percentuais de recuperação das amostras simuladas variaram entre 103,1 e 103,9%, enquanto que os percentuais de recuperação das amostras de soluções oftálmicas variaram entre 101 e 113%. Os resultados obtidos, referentes aos dois comprimentos de onda monitorados, estão apresentados na Tabela 29. A partir dos laudos dos colírios do controle de qualidade dos fabricantes (vide anexos III e IV) considerou-se a concentração de TBR relacionada ao percentual massa/volume encontrado, de modo a estabelecer um padrão de comparação com esses dados.

Pode ser observado que os percentuais de recuperação das amostras simuladas apresentam-se concordantes, contudo, os percentuais de recuperação das amostras das soluções oftálmicas, apresentaram alguns desvios com relação à informação dos respectivos fabricantes. Para avaliar a concordância entre os resultados, reproduziu-se um método cromatográfico estabelecido na literatura desenvolvido por Barends *et. al.* (1981), seguindo-se às adaptações sugeridas por Beulac *et. al.* (1996).

No método cromatográfico, foram avaliados os percentuais de recuperação das mesmas amostras analisadas com a sonda com as AuNPs, todavia, em soluções com valores diferentes de concentração, porque o método cromatográfico apresenta faixa linear em ordem de grandeza superior ao método proposto. Analisaram-se as amostras simuladas e as amostras reais dos colírios, prevendo-se a concentração de $1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, realizando-se o procedimento em triplicata. Os resultados encontrados estão indicados na Tabela 30, de acordo com a média dos percentuais obtidos e com o teor de TBR presente nos colírios (Cromatogramas disponíveis no anexo II).

A Tabela 31 apresenta um quadro comparativo entre as concentrações (m/v%) encontradas para as soluções oftálmicas através do uso de dispersões de AuNPs como sondas, do método cromatográfico comparativo e dos resultados referenciados pelos fabricantes nos laudos dos medicamentos.

Tabela 29. Recuperação das amostras simuladas e das amostras reais de soluções oftálmicas utilizando a sonda de AuNPs ($2,38 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$).

Sinal monitorado em 529 nm				
Amostra	Concentração prevista (mol L^{-1})	Recuperação (%)	Teor encontrado (m/v%)	Teor referenciado pelo fabricante (m/v%)
Amostra simulada	$6,0 \times 10^{-8}$	$103,96 \pm 4,60$	*	*
Amostra simulada	$1,0 \times 10^{-7}$	$104,4 \pm 0,71$	*	*
Colírio b	$6,0 \times 10^{-8}$	$108,7 \pm 3,7$	0,33	0,33
Colírio b	$1,0 \times 10^{-7}$	$122,7 \pm 1,2$	0,37	0,33
Colírio a	$6,0 \times 10^{-8}$	$113,6 \pm 3,2$	0,34	0,31
Colírio a	$1,0 \times 10^{-7}$	$123,1 \pm 7,2$	0,37	0,31

Sinal monitorado em 681 nm				
Amostra	Concentração prevista (mol L^{-1})	Recuperação (%)	Concentração encontrada (m/v%)	Concentração referenciada pelo fabricante (m/v%)
Amostra simulada	$6,0 \times 10^{-8}$	$103,13 \pm 1,80$	*	*
Amostra simulada	$1,0 \times 10^{-7}$	$103,1 \pm 0,9$	*	*
Colírio b	$6,0 \times 10^{-8}$	$101,1 \pm 1,2$	0,30	0,33
Colírio b	$1,0 \times 10^{-7}$	$117,3 \pm 0,9$	0,35	0,33
Colírio a	$6,0 \times 10^{-8}$	$108,5 \pm 2,4$	0,32	0,31
Colírio a	$1,0 \times 10^{-7}$	$123,6 \pm 1,8$	0,37	0,31

Tabela 30. Recuperação nas amostras simuladas e das amostras de soluções oftálmicas através da reprodução do método cromatográfico descrito por Beulac *et. al.* (1996).

Amostra	Concentração prevista (mol L^{-1})	Recuperação (%)	Teor encontrado (m/v%)	Teor referenciado pelo fabricante (m/v%)
Amostra simulada	$1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$101,3 \pm 1,5$	*	*
Colírio b	$1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$102,7 \pm 8,5$	0,31	0,33
Colírio a	$1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$122,7 \pm 8,5$	0,37	0,31

Tabela 31. Comparativo entre o teor encontrado para as amostras através da utilização das sondas de dispersões de AuNPs, do método cromatográfico e dos laudos apresentados pelo fabricantes.

Amostra	Colírio a	Colírio b
Teor referenciado pelo fabricante (m/v%)	0,31	0,33
Teor encontrado pelo método de AuNPs com monitoramento do sinal em 529 nm (m/v%)	0,34 a 0,37	0,33 a 0,37
Teor encontrado pelo método de AuNPs com monitoramento do sinal em 681 nm (m/v%)	0,32 a 0,37	0,30 a 0,35
Teor encontrado pelo método cromatográfico (m/v%)	0,37	0,31

Os percentuais de recuperação encontrados foram comparados utilizando-se primeiramente o teste F (comparação de variâncias dos resultados obtidos através da mesma técnica, com $n=3$) para posteriormente, utilizar a mais adequada

abordagem para o teste t-student (comparação dos valores médios considerando a magnitude dos desvios padrões obtidos com o método proposto e com método comparativo, com $n=4$ e um intervalo de confiança de 95%). O teste t-student apresenta, para quatro amostras, um valor de t_{tabelado} igual a 2,447. Fazendo-se o teste t entre os resultados obtidos com monitoramento do sinal em 529 nm, obtiveram-se valores de $t_{\text{calculado}}$ iguais a 0,557; 2,405 e 0,234 para os percentuais de recuperação das amostras simuladas, das amostras do colírio b e das amostras do colírio a, respectivamente. Repetindo-se os testes entre os resultados obtidos com monitoramento do sinal em 681 nm, obtiveram-se valores de $t_{\text{calculado}}$ iguais a 0,997; 0,501 e 0,486 para os percentuais de recuperação das amostras simuladas, das amostras do colírio b e das amostras do colírio a, respectivamente. Tendo em vista que todos os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram menores que o valor de t_{tabelado} , pode-se inferir que os resultados são estatisticamente iguais.

Foi feita também a tentativa de reprodução de outro método comparativo mais simples: o método colorimétrico descrito por Ryan (1984). O método apresentou linearidade questionável ($R^2=0,9811$) e percentual de recuperação de 110,10% para as amostras simuladas, entretanto, as interferências foram muito altas com relação às soluções oftálmicas: obtiveram-se percentuais de recuperação de 139 a 168% e de 127 a 164%, para colírio a e colírio b, respectivamente (vide resultados no anexo I).

5.2.6.2. Estudos em saliva

Visando uma avaliação do potencial de aplicação do método para determinação direta de TBR em amostras biológicas, foram feitos estudos usando saliva de indivíduos tratados com as soluções oftálmicas contendo TBR como princípio ativo.

A avaliação foi feita a partir das amostras de saliva de dois voluntários: um indivíduo do sexo masculino com 44 anos de idade (saliva M) e um indivíduo de 26 anos de idade do sexo feminino (Saliva F) e fumante regular. Aplicado o medicamento, o fluido biológico foi coletado após 5 min, 30 min, 1 h e 2 h (conforme o procedimento descrito).

A primeira avaliação foi feita com a adição direta da saliva na sonda de AuNPs, adicionando-se um volume de 20,00 μL de cada amostra a cada dispersão de trabalho. Em seguida, avaliou-se a possibilidade de fortificação das amostras de saliva com uma concentração de TBR $1,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 63 apresenta os espectros da sonda na presença da saliva M onde pode-se perceber que o fluido biológico em questão é uma matriz muito complexa e devido à grande quantidade de proteínas presentes na matriz, a interação entre as AuNPs e as amostras de saliva apresentou um perfil completamente diferenciado do observado ao longo do trabalho. No caso, as bandas de absorção antes notadas separadamente em 529 nm e em 681 nm, podem ser observadas, nesse estudo com saliva, como uma única banda, aparentemente resultante da junção das duas bandas originais da sonda antes e depois do efeito causado pelo TBR. Não foi encontrada na literatura nenhuma referência a esse tipo de comportamento em soluções coloidais de AuNPs.

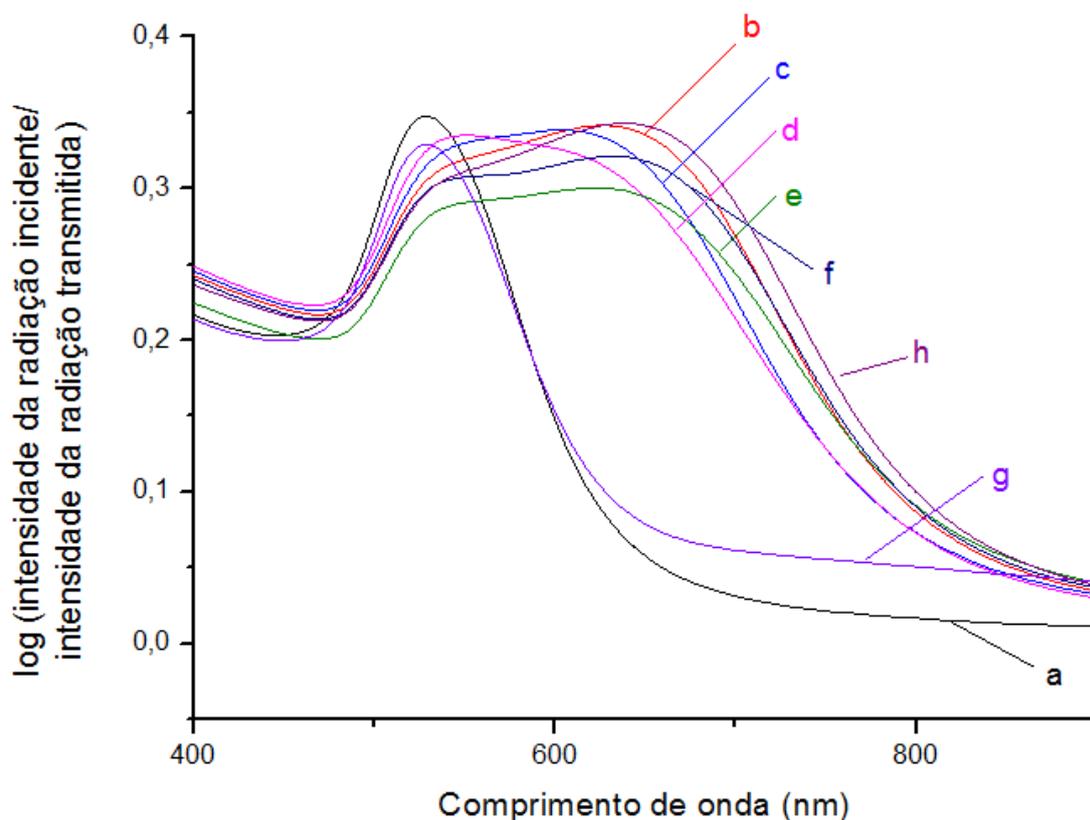


Figura 63. Espectros obtidos nos testes com as amostras de saliva M, tomando-se como perfil comparativo (a) dispersão de trabalho na ausência de TBR e saliva (dispersão-branco) e (g) dispersão de trabalho na presença de TBR ($1,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Os testes com as amostras de saliva nas dispersões de trabalho na presença de 20 μL da (b) saliva pura (antes do indivíduo fazer uso do colírio); (c) saliva coletada após 5 min de aplicação do medicamento; (d) saliva coletada após 30 min de aplicação do medicamento; (e) saliva coletada após 1 h de aplicação do medicamento; (f) saliva

coletada após 2 h de aplicação do medicamento; (h) saliva pura, (antes do indivíduo fazer uso do colírio), enriquecidas com TBR na concentração de $1,62 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Mantendo-se o padrão de monitoramento do sinal em 529 nm e 681 nm, pode-se observar que matrizes dessa natureza aparentemente alteram o comportamento de resposta da sonda de AuNPs, gerando um comportamento inverso ao relatado no desenvolvimento do método. As amostras de saliva coletadas após o uso do colírio, quando comparadas com a amostra de saliva antes da aplicação do medicamento, possuem uma tendência de incremento de sinal em 529 nm e decréscimo de sinal em 681 nm até 30 min após o uso do colírio, após esse período o sinal tende a diminuir em 529 nm e a aumentar em 681 nm (Figura 63).

Por causa do forte efeito de matriz provocado na sonda, realizou-se um segundo estudo a partir do tratamento de limpeza das amostras de saliva F com ácido perclórico com o objetivo de precipitar grande parte das proteínas que podem estar interagindo com a superfície das AuNPs. No entanto, os sinais de log (intensidade da radiação incidente/intensidade da radiação transmitida) obtidos com a adição das amostras que foram submetidas e esse procedimento de limpeza apresentaram comportamentos similares aos obtidos para as amostras de saliva M (sem o tratamento prévio) como visto na Figura 64. Isso indicou que para a amostra do indivíduo fumante, o tratamento não foi suficiente para sanar as interferências por efeito de matriz. Desse modo, tornou-se evidente que para a elaboração de um método que compreenda a análise de amostras com essa natureza é indispensável uma etapa inicial prévia de separação.

Estudos foram feitos visando a separação de TBR da matriz biológica por extração em fase sólida (SPE), utilizando-se um cartucho C18 e com um cartucho contendo uma base polimérica acrílica. No entanto, não se obteve sucesso com essas abordagens, pois a fase estacionária de C18 não reteve a TBR e a extração com a matriz polimérica exigiu um grande volume de solvente (5,00 mL de água, adicionados em frações de 1,00 mL, dado o tamanho da coluna de separação) para a eluição da TBR em virtude da grande retenção dessa molécula nessa fase estacionária. Além de um grande fator de diluição, a extração não foi completa e a reprodutibilidade das extrações não foi boa.

Assim como observado na saliva F, mesmo após o tratamento com o ácido perclórico, foi possível identificar o mesmo efeito de matriz observado para a

saliva M, desse modo, uma observação qualitativa do fenômeno (considerando que o incremento de TBR nas sondas de AuNPs provoca um incremento de sinal em 529 nm e um decréscimo de sinal em 681 nm, em comparação com a saliva pura) permite perceber que existe um aumento da concentração de TBR na saliva até 30 min depois do uso do colírio, posteriormente, percebe-se uma tendência de diminuição da concentração de TBR na saliva.

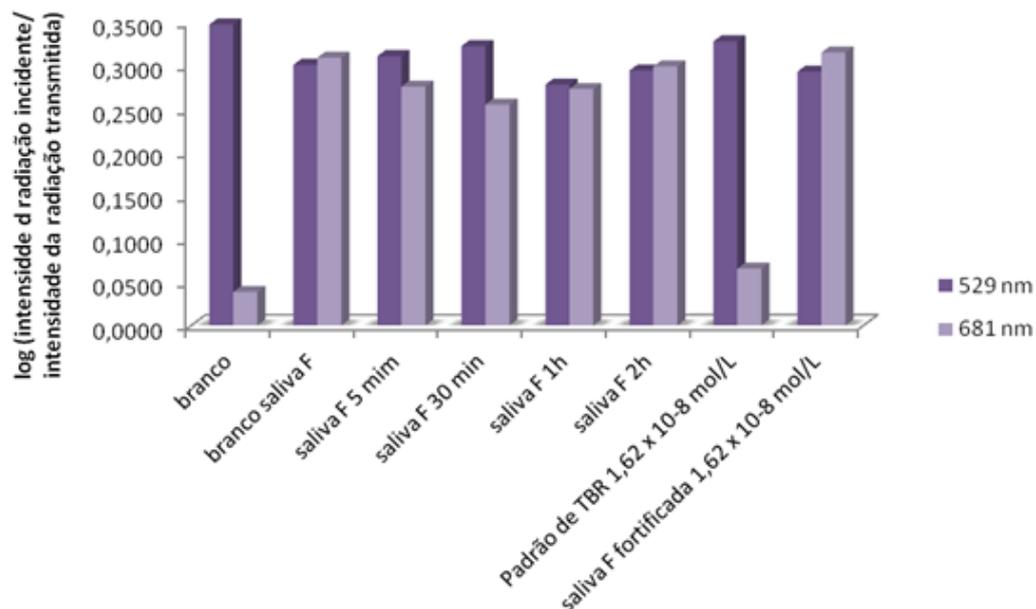


Figura 64. Gráfico referente aos resultados obtidos com as amostras de saliva F, monitorando-se o sinal da sonda em 529 nm e em 681 nm.

6 Conclusões

A avaliação de diferentes rotas sintéticas para produção de AuNPs indicou que o momento de adição do agente precursor é um fator que determina as dimensões das AuNPs formadas. Percebeu-se também que o tipo do citrato usado como agente redutor, influenciará no pH da dispersão coloidal, alterando o mecanismo de formação das AuNPs, tendo influência maior nas dimensões das AuNPs formadas quando ocorre a adição simultânea do agente precursor e do agente redutor.

Avaliando-se a interação de AuNPs, produzidas por diferentes rotas sintéticas, com TBR, percebeu-se que a concentração de AuNPs na dispersão coloidal deve ser um parâmetro controlado para que se obtenha uma boa resposta analítica de interação com o AMG.

Dentre os AMG estudados, foi possível identificar que a resposta da sonda apresenta potencial analítico para TBR, NEO e GENTA habilitando a determinação destas através do efeito de ressonância plasmônica na superfície de AuNPs.

As dispersões de AuNPs, na concentração estimada em $2,4 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, produziram boas sondas analíticas para determinação de TBR por espectrometria, viabilizando a validação de um método em faixas de concentrações ultra-traço de TBR, apresentando boa linearidade e LD na ordem de 10^{-9} mol L⁻¹. O método mostrou-se robusto em uma faixa de pH entre 2,6 e 4,5, durante 120 min. A composição da dispersão aquosa faz com que a sonda tenha capacidade tamponante que mantém o pH frente às adições de padrão e amostras. O método apresentou precisão satisfatória e demonstrou seletividade com relação a outro AMG, STP, e com relação aos excipientes presentes nas amostras analisadas. Utilizando-se um método comparativo para validar os resultados dos percentuais de recuperação obtidos, verificou-se através do teste t-student que os percentuais de recuperação encontrados através das sondas de AuNPs e através do método comparativo foram estatisticamente iguais.

Os estudos preliminares visando a determinação de TBR em saliva indicam que o uso de matrizes complexas, como este fluido biológico, permitem apenas uma avaliação qualitativa da presença de TBR. Para avaliações qualitativas torna-se necessária a separação prévia dos interferentes da matriz biológica.

O uso de AuNPs (provenientes da síntese IV) como sonda para determinação de TBR mostrou-se um método simples, barato e rápido quando comparado com os demais métodos descritos na literatura para determinação de AMG que fazem uso da derivatização. É válido destacar que o método desenvolvido no presente trabalho apresenta grandes vantagens com relação aos métodos descritos na literatura:

- A determinação de TBR através da sonda analítica de AuNPs é um método rápido e de baixo custo ao passo que os métodos descritos na literatura envolvem uma grande morosidade no processo, além de gastos com os reagentes de derivatização empregados.
- A sonda de AuNPs utilizada apresenta baixa concentração de nanopartículas, gerando baixas quantidades de resíduos que podem facilmente ser tratadas pela deposição das AuNPs em superfícies poliméricas (Ojea-Jiménez *et al.*, 2012). Já os métodos descritos na literatura fazem uso de reagentes muito tóxicos no processo de derivatização, gerando resíduos de difícil tratamento, contrariando os princípios da química verde.
- Apesar de serem encontrados na literatura métodos recentes para o uso de AuNPs como sonda para detecção de AMG, nenhum deles faz menção da utilização de amostras reais para aplicação do método ou de quaisquer seletividade avaliada com relação a presença de outros AMG, dessa forma, o método desenvolvido no presente trabalho apresenta questões muito vantajosas ainda não discutidas em trabalhos anteriores.
- Em comparação ao método colorimétrico encontrados na literatura, a sonda de AuNPs apresenta grande vantagem com relação aos excipientes presentes nas amostras reais: tendo em vista que as interferências não são significativas, não é necessária uma etapa de pré-separação dos interferentes nas amostras.

Por fim, é cabível mencionar a grande dificuldade de reprodução dos métodos analíticos encontrados na literatura. Neste trabalho foram apresentados apenas os resultados referentes aos métodos cuja reprodução foi bem sucedida, entretanto, houve tentativas de reprodução de quatro diferentes métodos cromatográficos. Mesmo com várias tentativas de ajuste das condições cromatográficas, não se obteve a separação do pretense produto da derivatização e identificação efetiva do produto da derivatização com TBR. O método cromatográfico tomado como método comparativo foi o único que apresentou resultados satisfatórios, sendo necessários ajustes no volume de injeção da amostra e nas proporções da fase móvel (uma vez que a fase móvel descrita no procedimento do método era uma solução turva e inadequada para o uso de HPLC). O método colorimétrico, apesar da fácil reprodução, apresenta grandes interferências aos excipientes presentes nas soluções oftálmicas, tornando inviável seu uso sem que antes haja um processo de separação nas amostras. Também vale destacar que o agente derivatizante empregado na reprodução dos métodos avaliados é o 2,4-dinitro-fluorobenzeno; um reagente altamente tóxico cuja ficha de segurança indica níveis de concentração que podem ser letais em contato com a pele.

7

Referências Bibliográficas

Alencar, A.B. Estudo da interação entre nanopartículas de ouro funcionalizadas e moléculas doadoras e aceitadoras de elétrons: um estudo por primeiros princípios. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Departamento de física, Belo Horizonte-MG, 2012.

Algar, W.R.; Krull, U.J. Interfacial Chemistry and design of solid-phase nucleic acid hybridization assays using immobilized quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer. **Sensors**, v.11, p. 6214-6236, 2011.

Al-Majed, A.A.; Belal, F.; Abounassif, M.A.; Khalil, N.Y. Fluorimetric Determination of Gentamicin in Dosage Forms and Biological Fluids Through Derivatization with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole (NBD-Cl). **Microchimica Acta**, v. 141, p. 1-6, 2003.

Amin, A.S.; Issa, Y.M. Ion-association method for the colorimetric determination of neomycin sulphate in pure and dosage forms. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 59, p. 663-670, 2003.

Antimicrobianos – principais grupos disponíveis para uso clínico, disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_control/opas_web/modulo1/aminoglicosideos5.htm, acessado em novembro de 2013.

Apyari, V.V.; Dmitrienko, S.G.; Arkhipova, V.V.; Atnagulov, A.G.; Gorbunova, M.V.; Zolotov, Y.A. Label-free gold nanoparticles for determination of neomycin. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 115, p. 416-420, 2013.

Assis, L.M.; Zavareze, E. da R.; Prentice-Hernández, C.; Soares, L.A. de S. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n. 2, p. 99-109, 2012.

Barends, D.M.; Zwaan, C.L.; Hulshoff, A. Micro-Determination of Tobramycin in Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. **Journal of Chromatography**, v. 225, p. 417-426, 1981.

Barros, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

Beaulac, C.; Clément-Major, S.; Hawari, J.; Lagacé, J. Eradication of Mucoïd Pseudomonas Aeruginosa with Fluid Liposome-Encapsulated Tobramycin in an Animal Model of Chronic Pulmonary Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p. 665-669, 1996.

Bresee, J.; Maier, K.E.; Melander, C.; Feldheim, D.L. "Identification of antibiotics using small molecule variable ligand display on gold nanoparticles." **Chemical Communications**, v. 46, p. 7516-7518, 2010.

Brooks, A.A.; Forist, A.A.; Loehr, B.F. Determination of neomycins-B and neomycins-C in neomycin sulfate. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1788-1790, 1956.

Brito, N.M.; Junior, O.P.A.; Polese, L.; Ribeiro, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.

Burygin, G.L.; Khlebtsov, B.N.; Shantrokha, A.N.; Dykman, L.A.; Bogatyrev, V.A.; Khlebtsov. On the enhanced antibacterial activity of antibiotics mixed with gold nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, p. 794-801, 2009.

Cagle, G.D.; McDonald, T.O.; Rosenthal, A.L. Combination of tobramycin and Dexamethasone for topical ophthalmic use. **United States Patent**, n. 5149694, 1992.

Cagle, G.D.; McDonald, T.O.; Rosenthal, A.L. Combination of tobramycin and Steroids for topical ophthalmic use. **European Patent Specification**, n. 0365613, 1989.

Casanova, M.C.R. "**Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis.**" Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, área de concentração em química analítica, São Carlos-SP, 2010.

Carvalho, I.; Haines, A.H. Síntese de aminoglicosídeos, precursores de pseudo-dissacarídeos potencialmente ativos. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 37-41, 2000.

Castilho, M.L.; Ramos, J.; Cardoso, M.A.; Canevari, R.; Martin, A.A.; Raniero, L. "Simulação do espectro de absorção de nanopartículas de ouro e prata através da teoria de Mie." **XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**, Universidade do Vale do Paraíba, 2011.

Chen, S.; Gao, H.; Shen, W.; Lu, C.; Yuan, Q. Colorimetric detection of cysteine using noncrosslinking aggregation of fluorosurfactant-capped silver nanoparticles. **Sensors and Actuators B**, v. 190, p. 673-678, 2014.

Chen, Y.; Dong, B.; Zhou, W. Surface Plasmon resonance biosensor modified with multilayer silver nanoparticles films. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 1021-1026, 2010.

Chen, Y.; Hu, X.; Xiao, X. Sample preparation for determination of neomycin in swine tissues by liquid chromatography-fluorescence detection. **Analytical Letters**, v. 43, p. 2496-2504, 2010.

Chen, Y.P.; Zou, M.Q.; Qi, C.; Xie, M.X.; Wang, D.N.; Wang, Y.F.; Xue, Q.; Li, J.F.; Chen, Y. Immunosensor based on magnetic relaxation switch and biotin–streptavidin system for the detection of Kanamycin in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, p. 122-117, 2013.

Chow, M.K.; Zukoski, C.F. Gold sol formation mechanisms: role of colloidal stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 165, p. 97-109, 1994.

Danzer, K.; Curie, L.A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.70, n.4, p. 993-1014, 1998.

Derbyshire, N.; White, S.J.; Bunka, D.H.J.; Song, L.; Stead, S.; Tarbin, J.; Sharman, M.; Zhou, D.; Stockley, P.G. “Toggled RNA aptamers against aminoglycosides allowing facile detection of antibiotics using gold nanoparticle assays.” **Analytical Chemistry**, v. 84, p.6595-6602, 2012.

Draper, M.; Saez, I.M.; Cowling, S.J.; Gai, P.; Heinrich, B.; Donnio, B.; Guillon, D.; Goodby, J.W. Self-Assembly and Shape Morphology of Liquid-Crystalline Gold Metamaterials. **Advanced Functional Materials**, v. 21, p. 1260-1278, 2011.

Drexler, K.E. “Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation.” **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 9, p. 5275-5278, 1981.

Du, B.; Hongyan, L.; Jianwen, J.; Wang, T.; Li, Y.; Shen, G.; Li, X. Chemiluminescence determination of streptomycin in pharmaceutical preparation and its application to pharmacokinetic study by a flow injection analysis assembly. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 115, p. 823–828, 2013.

Duda, E. New, sensitive method for determination of streptomycin. **Analytical Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 651-653, 1973.

Edson, R.S.; Terrell, C.L. The Aminoglycosides. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, p. 519-528, 1999.

Edwards, J.G. Topical Antibiotic Compositions. **United States Patent**, n. 4888327, 1989.

Eisenman, W.; Bricker, C.E. Spectrophotometric method for Determining Streptomycin. **Analytical Chemistry**, v. 21, n.12, p. 1507-1508, 1949.

El-Attug, M.N.; Chopra, S.; Dhulipalla, R.L.; Allegaert, K.; Smits, A.; Schepdael, A.V.; Adams, E. Development and Validation of a Chromatographic and Electrophoretic Method for the Determination of Amikacin and Urea in Bronchial Epithelial Lining Fluid. **Chromatographia**, v.75, p. 761-766, 2012.

Emery, W.B.; Walker, A.D. Colorimetric Determination of Streptomycin B (Mannosido-streptomycin). **Analyst**, v. 74, n. 881, p. 455-457, 1949.

Faraday, M. Experimental relations of gold (and other metals) to light. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 147, p. 145-181, 1857.

Feng, C.; Lin, S.; Wu, H.; Chen, S. Trace Analysis of Tobramycin in human plasma by derivatization and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 780, p. 349-354, 2002.

Flurer, C.L.; Wolnik, K.A. Quantitation of gentamicin sulfate in injectable solutions by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 663, p. 259-263, 1994.

Frens, G. Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, p. 20-22, 1973.

Frigerio, C.; Ribeiro, D.S.M.; Rodrigues, S.S.M.; Abreu, V.L.R.G.; Barbosa, J.A.C. Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 735, p. 9-22, 2012.

Ferreira, S.H.; Rangel, M.C.; "Nanotechnology: general aspects and potential applications in catalysis." **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

Fujita, Y.; Mori, I.; Kitano, S. Application of o-Hydroxyhydroquinonephthalein-Uranium (VI) Complex to Determination of Neomycin and Tobramycin. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1214-1218, 1984.

Galanzha, E.I.; Shashkov, E.; Sarimollaoglu, M.; Beenken, K.E.; Basnakan, A.G.; Shirliff, M.E.; Kim, J.; Smeltzer, M.S.; Zharov, V.P. "in vivo magnetic enrichment, photoacoustic diagnosis, and photothermal purging of infected blood using multifunctional gold and magnetic nanoparticles." **Plos One**, vol.7, n.9, 2012.

Galembeck, F.; Sá, G.F.; Chaves, A.; Achete, C.A.; Costa, D.A.L.; Júnior, E.F.S.; Baumvol, I.; Swart, J.W.; "**Desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia.**" Programa de Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia Portaria MCT nº 252. Ministério da Cultura e Desenvolvimento. Brasil: 2007.

Gilbert, D.N.; Kohlhepp, S.J. New Sodium Hydroxide Digestion Method for Measurement of Renal Tobramycin Concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, p. 361-365, 1986.

Grace, A.N.; Pandian, K. "Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles – A brief study." **Colloids and Surfaces A**, v. 297, p. 63-70, 2007.

Gupta, V. das; Stewart, K.R.; Gunter, J.M. Quantitation of Amikacin, Kanamycin, Neomycin, and Tobramycin in Pharmaceutical Dosage Forms Using the Hantzsch Reaction. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, p. 1470-1471, 1983.

He, S.; Chen, Q.; Sun, Y.; Zhu, Y.; Luo, L.; Li, J.; Cao, Y. "Determination of tobramycin in soil by HPLC with ultrasonic-assisted extraction and solid-phase extraction." **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 901-907, 2011.

<http://www.britishmuseum.org>, acessado em outubro de 2013.

Huidobro, A.L.; Barbas, G.C. Rapid analytical procedure for neomycin determination in ointments by CE with direct UV detection. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1303-1307, 2009.

Jackeray, R.; Abid, Z.C.K.V.; Singh, G.; Jain, S.; Chattopadhyaya, S.; Sapra, S.; Shrivastav, T.G.; Singh, H. Selective capturing and detection of Salmonella typhi on polycarbonate membrane using bioconjugated quantum dots. **Talanta**, v.84, p. 952-962, 2011.

Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 13939-13948, 2007.

Kaale, E.; Schepdael, A.V.; Roets, E.; Hoogmartens, J. Development and Validation of Capillary Electrophoresis Method for Tobramycin with Precapillary Derivatization and UV Detection. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1695-1701, 2002.

Kabra, P.M.; Bhatnagar, P.K.; Nelson, M.A. Liquid chromatographic determination of amikacin in serum with spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography**, v. 307, p. 224-229, 1984.

Kabra, P.M.; Bhatnagar, P.K.; Nelson, M.A.; Wall, J.H.; Marton, L.J. Liquid-Chromatographic Determination of Tobramycin in Serum with Spectrophotometric Detection, **Clinical Chemistry**, v. 29, p. 672-674, 1983.

Khaldeeva, E.V.; Medyantseva, N.A.; Imanaeva, N.A.; Budnikov, G.K. Determination of Gentamicin with an Amperometric Enzyme Immunosensor. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 1097-1102, 2002.

Kubo, H.; Li, H.; Kobayashi, Y.; Kinoshita, T. Fluorometric determination of streptomycin in serum by high-performance liquid chromatography using mobile phase containing fluorogenic reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 219-223, 1987.

Kreibi, U.; Vollmer, M. **Optical Properties of Metal Clusters**, Berlin: Springer, 1995.

Kulapina, E.G.; Baraguzina, V.V.; Kulapina, O.I. Rapid Potentiometric Determination of Aminoglycoside Antibiotics in Drug Dosage Forms and

Biological Fluids Using Ion-Selective Electrodes. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 523-527, 2005.

La Mer, V.K. Nucleation in Phase Transitions. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1270-1277, 1952.

Leal, A.A.X.; Henriques, C.A.; Luna, A.S. Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por espectrofotometria UV-VIS. **Revista Analytica**, n.32, 2008.

Leite, F. **Validação em análise química**. Editora átomo, 5ª edição, Campinas, SP: 2008.

Lewis, A.S.; Taylor, G.; Rowe, H.N.; Willians, H.O.; Lewis, M.H. Modified Enzyme immunoassays for Tobramycin Using Reduced Sample and Reagent Volumes. **American Journal of Hospital Pharmacy**, v. 44, p. 568-571, 1987.

Li, C.; Li, D.; Wan, G.; Xu, J.; Hou, W.; Facile syntheses of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. **Nanoscale Research Letters**, v.6, p. 440-450; 2011.

Lima, E.R. de A. Cálculo de propriedades físico-químicas de sistemas coloidais via equação de Poisson-Boltzmann. Tese de doutorado, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2008.

Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. Extinction Coefficient of Gold Nanoparticles with Different Sizes and Different Capping Ligands. **Colloids and Surfaces B**, v. 58, p. 3-7, 2007.

Magnet, S.; Blanchard, J.S. Molecular insights into aminoglycoside action and Resistance, **Chemical Reviews**, v. 105, p. 477-497, 2005.

Mammen, M.; Choi, S.K.; Whitesides, G.M.; "Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for design and use of multivalent ligands and Inhibitors." **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p. 2754-2794, 1998.

Martins, M.A.; Trindade, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 2012.

Melo Jr, M.A.; Santos, L.S.S.; Gonçalves, M. do C.; Nogueira, A.F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

Mendes, A.S.R. Implementação e Validação de Métodos Analíticos. **LRCQA**, 9050-Funchal, 2010.

Mitscher, L.A.; Antibiotics and antimicrobial agents. **Principles of medicinal chemistry**, 5 ed., Baltimore, Willians & Wilkins, cap. 34, p. 788-791, 2002.

Miyachi, M.; Yamanoi, Y.; Shibata, Y.; Matsumoto, H.; Nakazato, K.; Konno, M.; Ito, K.; Inoue, Y.; Nishihara, H.; "A photosensing system composed of photosystem I, molecular wire, gold nanoparticle, and double surfactants in water." **Chemical Communications**, v.46, p. 2557-2559, 2008.

Myroshnychenko, V.; Rodriguez-Fernández, J.; Pastoriza-Santos, I.; Funston, A.M.; Novo, C.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L.M.; Abajo F.J.G. de. Modelling the Optical Response of Gold Nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 1792-1805, 2008.

Naveenraj, S.; Anandan, S. "Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs." **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry reviews**, v.14, p.53-71, 2013.

Neto, B.P. da C. Desenvolvimento de Sistemas micro e nanoestruturados de quitosana/MDI para aplicações cosméticas. Dissertação de mestrado, Departamento de Engenharia Química, **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, 2009.

Ojea-Jiménez, I.; Bastús, N.G.; Puentes, V. Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, p. 15752-15757, 2011.

Ojea-Jiménez, I.; Campanera, J.M. Molecular Modeling of the Reduction Mechanism in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, p. 23682-23691, 2012.

Ojea-Jiménez, I.; López, X.; Arbiol, J.; Puentes, V.; "Citrate-coated gold nanoparticles as smart scavengers for mercury (II) removal from polluted waters". **American Chemical Society**, v.6, n. 3, p. 2253-2260; 2012.

Ojea-Jiménez, I.; Romero, F.M.; Bastús, N.G.; Puentes, V. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, p. 1800-1804, 2010.

Oliveira, J.F.P.; Cipullo, J.P.; Burdmann, E.A. Aminoglycoside nephrotoxicity. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, p. 444-452, 2006.

Omar, M.A.; Nagy, D. M.; Hammad, M.A., Alshymaa A.A. Highly Sensitive Spectrofluorimetric Method for Determination of Certain Aminoglycosides in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.14, n. 2, 2013.

Otubo, L. "Técnicas de caracterização de nanopartículas metálicas funcionalizadas." Monografia, UNICAMP, Departamento de Química, 2005.

Patnaik, P. **Handbook of Inorganic Chemicals**, McGraw-Hill, 1ª ed., 2002.

Perala, S.R.K.; Kumar, S. On the Mechanism of metal nanoparticle synthesis in the Brust-Schiffrin method. **Langmuir**, v. 29, p. 9863-9873, 2013.

Pereira, S.E. e colaboradores. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Instituto Nacional de Tecnologia**, DOQ-CGCRE-008, 2011.

Prasad, B.L.V.; Sorensen, C.M.; Klabunde, K.J. Gold nanoparticle superlattices. **Chemical Reviews Society**, v. 37, p. 1871-1883, 2008.

Rai, A.; Prabhune, A.; Perry, C.C. "Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings." **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 6789-6798, 2010.

Rastogi, L.; Kora, A.J.; Arunachalam J. "Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics." **Material Science and Engineering C**, v. 32, p. 1571-1577, 2012.

Regna, P.P.; Wasselle, L.A.; Solomons, I.A. The stability of streptomycin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, p. 631-638, 1946.

Ribeiro, F.A.L; Ferreira, M.M.C.; Morano, S.C.; Silva, L.R.; Schneider, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n.1, p.164-171, 2008.

Rocha, T.C.R. da. Nanopartículas metálicas anisotrópicas: Mecanismos de formação e aplicações ópticas. Tese de doutorado, **Universidade Estadual de Campinas**, 2008.

Roditi, I. **Dicionário Houaiss de Física**, Rio de Janeiro: Objetiva, 2005.

Russ, H.; McCleary, D.; Katimy, R.; Montana, J.L.; Miller, R.B.; Krishnamoorthy, R.; Davis, C.W. Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Tobramycin and its Related Substances in an Ophthalmic suspension. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 21, p. 2165-2181, 1998.

Ryan, J.A. Colorimetric Determination of Gentamicin, Kanamycin, Tobramycin, and Amikacin Aminoglycosides with 2,4-dinitrofluorobenzene. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 1301-1302, 1984.

Sachetelli, S.; Beaulac, C.; Lagacé, J. Aminoglycoside Detection Using a Universal ELISA Binding Procedure Onto Polystyrene Microtiter Plates in Comparison with HPLC Analysis and Microbiological Agar-Diffusion Assay **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1379, p. 35-41, 1998.

Sampath, S.S.; Robinson, D.H. Comparison of New and Existing Spectrophotometric Methods for the Analysis of Tobramycin and Other

Aminoglycosides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 428-431, 1990.

Sánchez-Martínez, M.L.; Aguilar-Caballos, M.P.; Gómez-Hens, A. Long-wavelength homogeneous enzyme immunoassay for the determination of amikacin in water samples. **Talanta**, v. 78, p. 305-309, 2009.

Sánchez-Martínez, M.L.; Aguilar-Caballos, M.P.; Gómez-Hens, A. Selective kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 1021-1027, 2004.

Santos, H. S.; França, G. M.; Silva, A.R.; Aucélio, R.Q. Estudos da interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas de ouro por espectrometria de absorção molecular no UV-Vis: uma avaliação do potencial analítico, **36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Painel ANA-075, disponível em:<http://sec.s bq.org.br/eventos/36ra/resumos/T1837-1.pdf>, 2013.

Santos, H. S.; Silva, A.R.; Aucélio, R.Q. Determinação de Tobramicina por Fotometria de Absorção: Efeito de Ressonância Plasmônica na Superfície de Au, **17º Encontro Nacional de Química Analítica**, disponível em: <http://www.17enqa.com.br/docs/trabalhos.pdf> e <http://www.17enqa.com.br/docs/programacaoDetalhada.pdf>, 2013.

Sarraguça, M.C.; Soares, S.O.; Lopes, J.A. A near-infrared spectroscopy method to determine aminoglycosides in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v.56, p.184-192, 2011.

Scerri, E. As surpreendentes alterações da tabela periódica. **Scientific American Brazil**, v. 17, p. 28-33, 2013.

Schatz, A.; Bugie, E.; Waksman, S.A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 55, p. 66-69, 1944.

Serrano, J.M.; Silva, M. Determination of amikacin in body fluid by high-performance liquid-chromatography with chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 843, p. 20-24, 2006.

Setny, P.; Trylska, J. Search for novel aminoglycosides by combining fragment-based virtual screening and 3D-QSAR Scoring, **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 390-400, 2009.

Shang, Y.; Gao, D.; Wu, F.; Wan, X. Silver nanoparticles capped with 8-hydroxyquinoline-5-sulfonate for the determination of trace aluminum in water samples and for intracellular fluorescence imaging. **Microchimica Acta**, v. 180, p. 1317-1314, 2013.

Shaw, W.H.C.; Fortune, I. An evaluation of autoanalyzer for determining by streptomycin by ferric-maltol method. **Analyst**, v.87, n.1032, p. 187-196, 1962.

Shipway, A.; Willner, I. "Nanoparticles as structural and unctional units in surface-confined architectures." **Chemical Communications**, v. 20, p. 2035-2045, 2001.

Sigma-Aldrich. Ficha de informações de segurança de produtos químicos, disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>, acessado em novembro de 2013.

Sikarra, D.; Shukla, V.; Kharia, A.A. Techniques for solubility enhancement of poorly soluble drugs: na overview. **Journal of Medical Pharmaceutical and Allied Sciences**, v. 1, p. 1-22, 2012.

Silva, A.P; Alves, M.C.C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. **Congresso e Feira da Qualidade em metrologia**, São Pulo, 2006.

Silva, E.C.; Silva, M.G.A.; Meneghetti, S.M.P.; Machado, G.; Alencar, M.A.R.C.; Hickmann, J.M.; Meneghetti, M.R.; "Synthesis of colloids based on gold nanoparticles dispersed in castor oil". **Journal Nanoparticles Research**, v. 10, p. 201-208, 2008.

Sivaraman, S.K.; Kumar, S.; Santhanam, V. Monodisperse sub-10 nm Gold Nanoparticles by Reversing the Order of Addition in Turkevich Method – The Role of Chloroauric Acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, p. 543-547, 2011.

Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. **Fundamentos da Química Analítica**. Editora Pioneira, São Paulo, 2006.

Soares, V.F. Dispersão e estabilização de partículas submicrométricas de óxido de alumínio em sistemas líquidos destinados à produção de materiais refratários. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2009.

Sönnichsen, C.; Reichard, B.M.; Liphardt, J.; Alivisatos, P. A molecular ruler based on Plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 741-745, 2005.

Somasundaran, P.; Mehta, S.C.; Yu, X.; Krishnakumar, S. Colloid systems and interfaces stability of dispersions through polymer and surfactant adsorption. **Handbook of surface and colloid chemistry**, 3^a ed., p. 155-194, 2002.

Soto-Alvaredo, J.; Montes-Bayón, M.; Bettmer, J. Speciation of Silver Nanoparticles and Silver(I) by Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to ICPMS. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 1316-1321, 2013.

Sperling, R.A.; Gil, P.R.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J.; Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p.1896-1908, 2008.

Stark, R.L. Ophthalmic solutions, **United States Patent**, n. 4407791, 1983.

Stjohn, C.V.; Flick, D.E.; Tepe, J.B. Streptomycin and mannosidostreptomycin in fermentation broths. **Analytical Chemistry**, v. 23, n.9, p. 1289-1291, 1951.

Stypulkowska, K.; Blazewicz, A.; Fijalek, Z.; Warowna-Grzeskiewicz, M.; Srebrzynska, K. Determination of neomycin and related substances in pharmaceutical preparations by reversed-phase high performance liquid chromatography with mass spectrometry and charged aerosol detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 76, n. 25, p. 207-214.

Suzuki, N.; Ishihama, Y.; Kajima, T.; Asakawa, N. Quantitation of counter ion of a water-insoluble drug by nonaqueous capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 829, p. 411-415, 1998.

Swanson, N.L.; Billard, B.D. Optimization of Extinction from Surface Plasmon Resonances of Gold Nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 14, p. 353-357, 2003.

Tan, X.; Jiang, Y.W.; Huang, Y.J.; Hu, S.H. Persistence of gentamicin residues in milk after the intramammary treatment of lactating cows for mastitis. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, n.4, p. 280-284, 2009.

Toda, S.; Nakagawa, S.; Naito, T.; Kawaguchi, H. Structure determination of amikacin derivatives modified by enzymes from resistant *S. Aureus* Strains. **Tetrahedrin Letters**, v. 19, n. 41, p. 3917-3920, 1978.

Toma, H.E.; Zamarion, V.M.; Toma, S.H.; Araki, K. The coordination Chemistry at Gold Nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1158-1176, 2010.

Touw, D.J.; Graaf, A.I. de; Goede, P. de. Evaluation of Fluorescence Polarographic Immunoassay with Increased Sensitivity for Measurement of Low Concentrations of Tobramycin in Serum. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 18, p. 189-193, 1996.

Trindade, Tito da Silva; **Nanochemistry**. Universidade de Aveiro; Aveiro-Portugal:2008.

Trügler, A. Optical properties of metallic nanoparticles. Dissertation, **Universität Graz**, Institut für Physik, Fachbereich Theoretische Physik, 2011.

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, p. 55-75, 1951.

Vladimirova, E.V.; Dunaeva, A.A.; Petrukhin, O.M.; Shipulo, E.V. Study of the Transfer of Aminoglycoside Antibiotics through the Phase Boundary

Water/oNitrophenyl Octyl Ether by Voltammetry at the Interface of Two Immiscible Electrolyte Solutions. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 253-260, 2013.

Waksman, S.A.; Woodruff, H.B.; The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease producing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 40, p. 581-600, 1940.

Whall, T.J. Determination of streptomycin sulfate and dihydrostreptomycin sulfate by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 219, n.1, p. 89-100, 1981.

Wang, H.; Ren, J.; Zhang, Y. Use of *P*-dimethylaminobenzaldehyde as a coloured reagent for determination of gentamycin. **Talanta**, v. 40, n. 6, p. 851-853, 1993.

Wang, J.; Mahmoud, J.S. Determination of traces of streptomycin and related antibiotics by adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 186, p. 31-38, 1986.

Wang, M-T.; Liu, M-H.; Wang, C.R.C.; Chang, S.Y. 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, p. 1925-1932, 2009.

Wang, R.; Wang, R.; Ge, B.; Jia, X.; Li, Z.; Chang, J. Spectral method determination of kanamycin sulfate using both gold nanoparticles and quantum dots. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5302-5308, 2013.

Wang, R.; Fan, S.; Wang, R.; Dou, H.; Wang, L. Determination of aminoglycoside antibiotics by a colorimetric method based on the aggregation of gold nanoparticles, **Nano**, v. 8, n. 4, 2013.

Wei, Q.; Zhao, Y.; Du, B.; Wu, D.; Li, H.; Yang, M. Ultrasensitive detection of kanamycin in animal derived foods by label-free electrochemical immunosensor. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1601-1606, 2012.

Wei, Z.; Wang, J. Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system. **Analytica Chimica Acta**, v. 694, p. 46-56, 2011.

Weinstein, M.J.; Luedemann, G.M.; Oden, E.M.; Wagman, G.H.; Rosselet, J.P.; Marquez, J.A.; Coniglio, C.T.; Charney, W.; Herzog, H.L.; Black, J. Gentamicin, a new antibiotic complex from micromonspora. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 463-464, 1963.

Wilhelmus, K.R.; Gilbert, M.L.; Osato, M.S. Tobramycin in Ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 32, p. 111-122, 1987.

Wriedt, T. Mie theory 1908, on mobile phone 2008. **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**, v. 109, p. 1543-1548, 2008.

Yamada, H.; Urata, C.; Aoyama, Y.; Osada, S.; Yamauchi, Y.; Kuroda, K.; Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behavior in Static Aqueous Systems. **Chemistry of Materials**, v.3, p.790-800, 2012.

Zamarion, V.M. **Estudos e Aplicações de Ressonância Plasmônica Superficial em Nanosondas SERS**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Departamento de química Inorgânica, São Paulo-SP, 2008.

Zamborini, F.P.; Bao, L.; Dasari, R. Nanoparticles in measurement science. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 541-576, 2012.

Zanchet, D. Nanopartículas de Ouro Passivadas por Tióis: Caracterização Estrutural e Formação de Super Cristais Auto-organizados. Tese de doutorado, **Universidade Estadual de Campinas**, 2000.

Zarbin, A.J.G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

Zembower, T.R.; Noskin, G.A.; Postelnick, M.J.; Nguyen, C.; Peterson, L.R. The utility of aminoglycosides in na era of emerging drug resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 10, p. 95-105, 1998.

Zhang, A.; Hou, K.; Gu, L.; Dai, C.; Liu, M.; Song, C.; Guo, X.; "Synthesis of silica nanotubes with orientation controlled mesopores in porous membranes via interfacial growth." **Chemistry of Materials**, v. 24, p.1005-1010, 2012.

Zhang, J.; Zhang, L. Nanostructures for surface plasmons. **Advances in Optics and Photonics**, v. 4, p. 157-321, 2012.

Zhang, M.; Yu, P.; Mao, L. Rational design of surface/interface chemistry for quantitative in vivo monitoring of brain chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 4, p.533-543, 2012.

Zhou, N.; Wang, J.; Zhang, J.; Li, C.; Tian, Y.; Wang, J. Selection and Identification of Streptomycin-Specific Single-Stranded DNA Aptamers and the Application in the Detection of Streptomycin in Honey. **Talanta**, v. 108, p. 109-116, 2013.

Zhu, Y.; Chandra, P.; Song, K.; Ban, C.; Shim, Y. Label-free detection of kanamycin based on the aptamer-functionalized conducting polymer/gold nanocomposite. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 36, p. 29-34, 2012.

Zhu, Y.; Qu, C.; Kuang, H.; Xu, L.; Liu, L.; Hua, Y.; Wan, L.; Xu, C. Simple, rapid and sensitive detection of antibiotics based on the side-by-side assembly of gold nanorod probes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 4387-4392, 2011.

Zhu, Y.; Son, J.I.; Shum, Y.B. Amplification strategy based on gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for neomycin immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 1002-1008, 2010.

Anexos

Anexo I: Método Comparativo 1: Determinação colorimétrica de TBR, viabilizada pela derivatização com 2,4-dinitrofluorobenzeno (Ryan, 1984)

O método proposto por Ryan (1984) baseia-se nos compostos coloridos produzidos através da reação entre os AMG e o 2,4-dinitrofluorobenzeno (Reagente de Sanger, RS). Originalmente, o RS foi utilizado para determinar grupos aminos terminais da insulina.

1.1. Materiais e Instrumentação

Para o preparo dos padrões, amostras simuladas e amostras das soluções oftálmicas foram usados: sulfato de tobramicina (99,99%, Sigma-Aldrich, EUA), bicarbonato de sódio (Vetec, 99%, Rio de Janeiro), 2,4-dinitrofluorobenzeno (Sigma-Aldrich, 99%), Tobrex (Alcon) e Tobragan (Allergan) e ácido clorídrico P.A. (Isofar, Rio de Janeiro).

Os espectros eletrônicos foram obtidos com um espectrofotômetro UV/Vis/NIR, Lambda 19 a Perkin Elmer (EUA) com banda espectral passante de 10 nm e velocidade de varredura de 0,01 nm min⁻¹, operado no modo de duplo feixe, usando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, e fazendo-se a varredura na faixa de 400 a 500 nm.

1.2. Análises espectrofotométricas no UV-vis

Soluções estoque foram preparadas diluindo-se quantidades apropriadas de sulfato de TBR para obtenção de soluções finais com concentrações de $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

A partir das soluções-estoque, prepararam-se, em tubos Falcon® individuais, 5,00 mL de soluções de TBR com concentrações entre $6,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $3,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, totalizando cinco padrões. Para o branco, utilizou-se 5,00 mL de água ultrapura. Em cada tubo, adicionou-se 1,00 mL de uma solução aquosa de bicarbonato de sódio (2% m/v) e submeteu-se a agitação. Em seguida,

acrescentaram-se 2,00 mL de uma solução de RS (0,25 mL / 100mL de etanol) e deixou-se em agitação por 20 min. Removeu-se o gás carbônico do tubo e realizaram-se as medidas de absorvância com monitoramento em 415 nm.

1.3. Resultados

A Figura 65 apresenta os espectros eletrônicos obtidos para o branco e os quatro padrões com concentrações de TBR entre $6,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A curva analítica obtida (Figura 66) apresentou coeficiente de determinação da reta igual a 0,9764, com equação da curva representada por: $Y = (0,5867 \pm 0,00569) + (4337,1762 \pm 301,0975) X$.

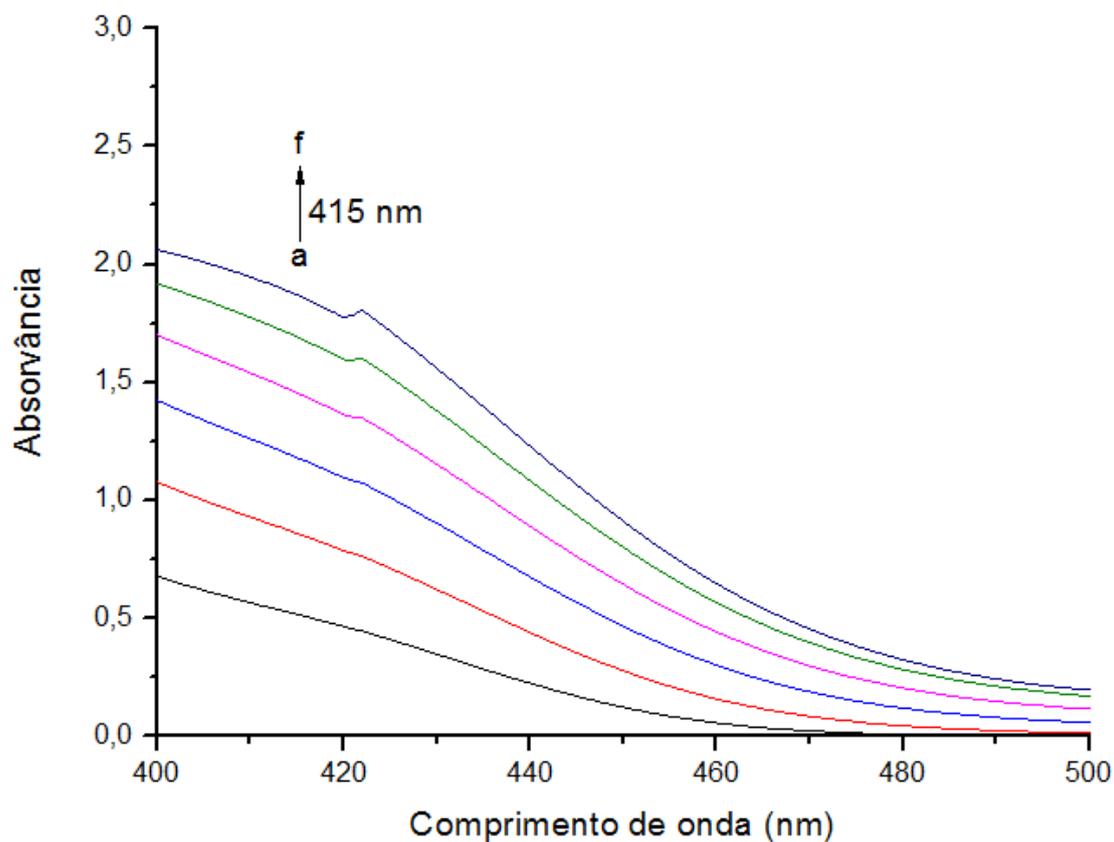


Figura 65. Espectros eletrônicos gerados para os padrões com concentrações de TBR conforme as linhas a-f: (0,0; 0,6; 1,3; 1,8; 2,5; 3,2 ($\times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$)).

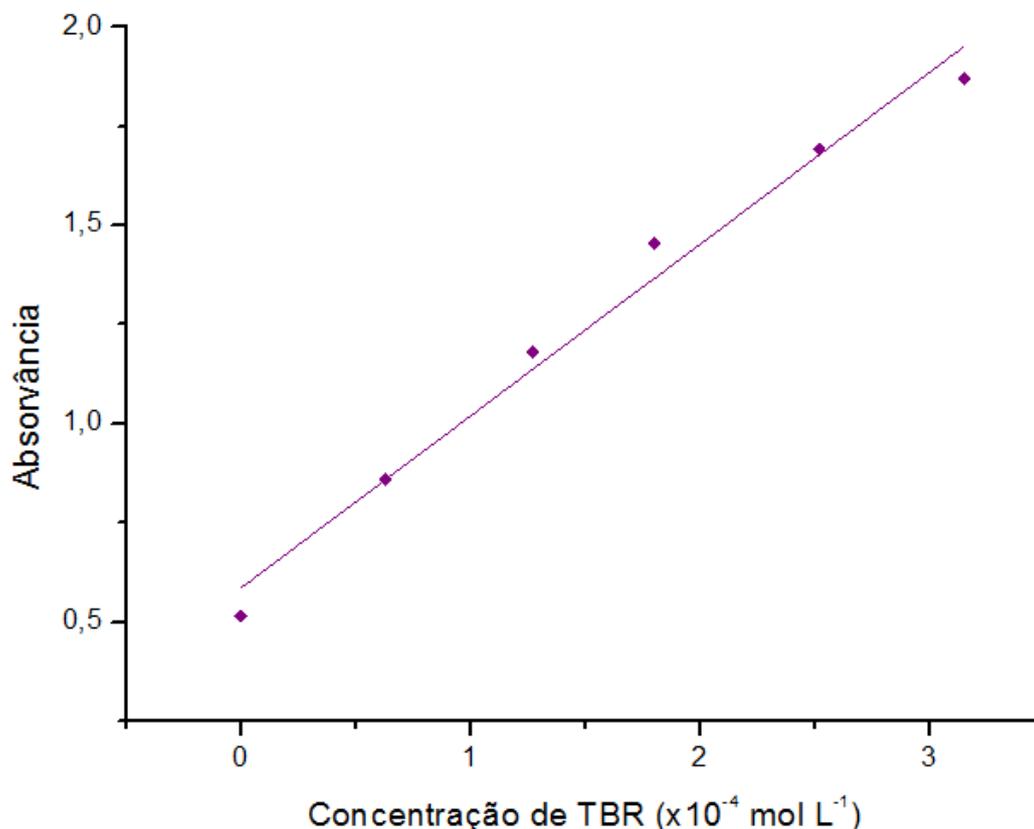


Figura 66. Curva analítica para TBR, obtidas através da derivatização com RS, monitorando-se o sinal em 415 nm. Concentrações de TBR de (0,6 a 3,2 ($\times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$)).

Os percentuais de recuperação (Figura 67) foram obtidos a partir da triplicata das amostras simuladas e das soluções oftálmicas de Tobrex e Tobragan em dois níveis de concentração diferentes: $2,4 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ e $6,3 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$. Para as amostras simuladas, obtiveram-se percentuais de recuperação de 110,10% para os dois níveis de concentração. Para as soluções oftálmicas de Tobragan e Tobrex, obtiveram-se percentuais de recuperação de 139,5% a 168,2% e 127,6% a 164,0%, respectivamente.

Conforme pode ser observado, não foi possível a utilização do método proposto por Ryan (1984) como método comparativo devido à grande interferência da matriz das soluções oftálmicas ao método, desse modo, tem-se que não é possível a determinação de TBR em soluções oftálmicas por este método, sem que haja uma etapa prévia de separação.

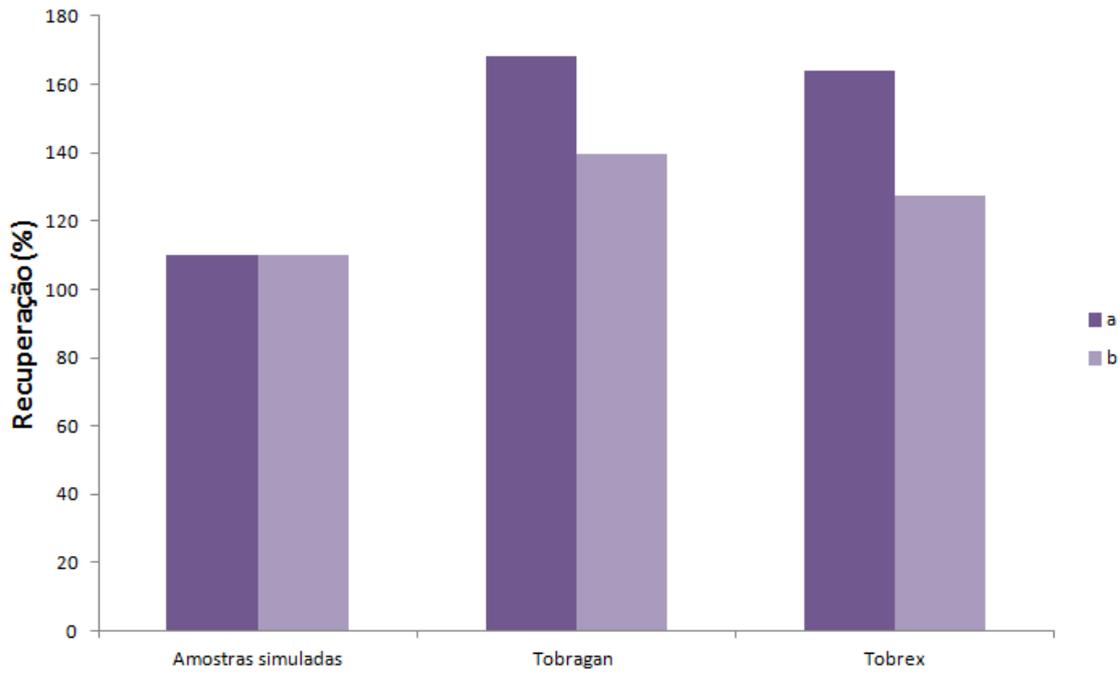


Figura 67. Média dos percentuais de recuperação obtidos em triplicata para as amostras simuladas em dois níveis de concentração de TBR: a) $2,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; b) $6,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Anexo II: Método Comparativo 2: método cromatográfico adaptado de Beulac *et al.* (1996).

O método cromatográfico descrito por Beulac *et al.* (1996) foi utilizado pelos autores como método comparativo para validação do imunoensaio para determinação de TBR proposto pelos autores. O método que os autores utilizaram faz uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência através da derivatização dos padrões de TBR com RS, adaptando as condições cromatográficas do artigo que utilizaram como referência (Barends *et al.*, 1981).

Seguindo as adaptações de Beulac *et al.*, mais algumas pequenas modificações foram necessárias para a realização do método, com relação à proporção da fase móvel descrita pelos autores, tendo em vista que esta gerava precipitados, conforme os procedimentos descritos no Capítulo 3.

As curvas analíticas foram obtidas em duplicata, a partir de quatro padrões, com concentrações de TBR entre $9,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, avaliando-se a área obtida com tempo de retenção igual a 9,1 min. A Figura 68 apresenta a melhor curva analítica obtida.

As amostras simuladas e as amostras das soluções oftálmicas de tobragan e tobrex foram analisadas a partir de quatro amostras em dois diferentes níveis de concentração de TBR: $1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para as amostras simuladas e as soluções oftálmicas de Tobragan e Tobrex, obtiveram-se recuperações de 99,98% a 102,6%; 95,2% a 110,0% e 117,2% a 126,8%, respectivamente.

A Figura 69 indica os cromatogramas obtidos para o branco, o padrão de TBR ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), a amostra simulada e as amostras das soluções oftálmicas de tobragan e tobrex na mesma concentração do padrão apresentado. Tanto a curva analítica quanto os cromatogramas das amostras e padrões estão apresentados com a partir da diferença entre os resultados dos padrões e do branco.

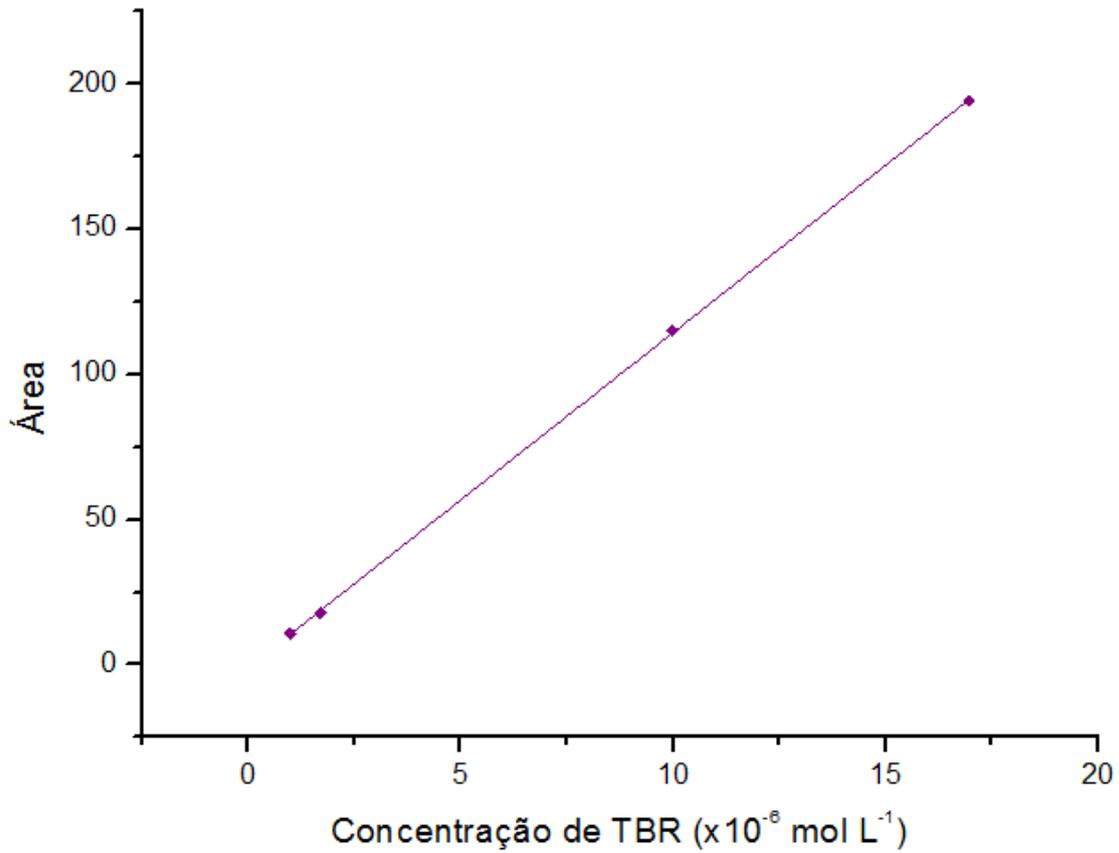


Figura 68. Curva analítica obtida para os padrões de TBR com concentrações entre $9,9 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$ e $1,7 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$. Equação da curva: $Y = (-1,0461 \pm 0,7836) + (1,1232 \times 10^7 \pm 7,9207 \times 10^4) X$; $R^2 = 0,9999$.

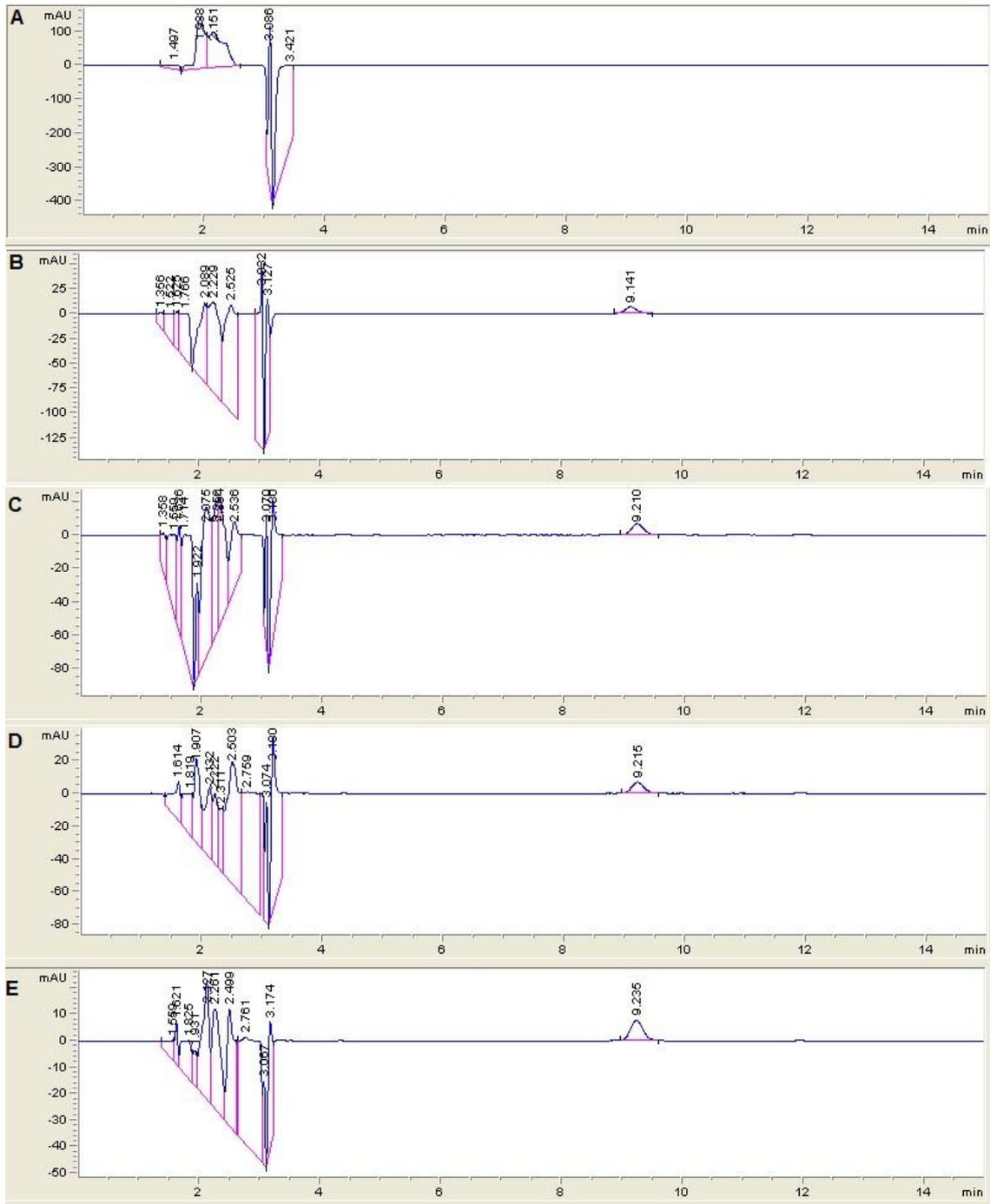


Figura 69. Cromatogramas obtidos através do método de Beulac *et al.* (A) branco, (B) padrão de TBR ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$), (C) amostra simulada ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$), (D) amostra com a solução oftálmica tobragan ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$), (E) amostra com a solução oftálmica tobrex ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$).

Anexo III: Laudo do Colírio b

20.11.2012 03:13

pg. 01 de 09

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
 Av. Guarulhos, 3.180
 Guarulhos - SP - Brasil
 6423-2000

Relatório de Inspeção

Número do lote F35853
 Lote de inspeção 30000535411
 Material 203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7

Status Decisão de utilização tomada

Origem 04 Entrada de mercadorias da produção
 Tipo de inspeção 04 Insp. para EM da produção
 Lista de tarefas Tobragan Sol. Oft. 5mL
 Período de inspeção 17.05.2012 - 22.05.2012
 Tamanho do lote 998 EA
 Tamanho da amostra 1 EA

Operação de inspeção 0010 ANÁLISE DA DOCUMENTAÇÃO

Característica 0010 CHECAGEM DA DOCUMENTAÇÃO
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor KAJIT_TA
Data 05.06.2012

Característica 0020 CHECAGEM MATERIAIS PLÁSTICOS/EMBALAGEM
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor KAJIT_TA
Data 05.06.2012

Característica 0030 CHECAGEM REGISTRO ABERT/FECHAMENTO LINHA
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor KAJIT_TA
Data 05.06.2012

Allergan

20.11.2012 03:13

pg. 02 de 09

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
 Av. Guarulhos, 3.180
 Guarulhos - SP - Brasil
 6423-2000

Relatório de Inspeção

Número do lote F35853
 Lote de inspeção 30000535411
 Material 203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7
 Status Decisão de utilização tomada

Característica	0040	VOLUME MÉDIO
<i>Status</i>	Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>	O resultado é válido (default)	
<i>Código</i>	ACC	Result. é aceitável - Aceita = Passa
<i>Avaliação</i>	Aceitação	
<i>Inspetor</i>	KAJIT_TA	
<i>Data</i>	05.06.2012	
Característica	0050	CHECAGEM DO CONTROLE DE VEDAÇÃO
<i>Status</i>	Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>	O resultado é válido (default)	
<i>Código</i>	ACC	Result. é aceitável - Aceita = Passa
<i>Avaliação</i>	Aceitação	
<i>Inspetor</i>	KAJIT_TA	
<i>Data</i>	05.06.2012	
Característica	0060	CHECAGEM DO CONTROLE DE TORQUE
<i>Status</i>	Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>	O resultado é válido (default)	
<i>Código</i>	ACC	Result. é aceitável - Aceita = Passa
<i>Avaliação</i>	Aceitação	
<i>Inspetor</i>	KAJIT_TA	
<i>Data</i>	05.06.2012	
Característica	0070	INSPEÇÃO FÍSICA DO PRODUTO
<i>Status</i>	Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>	O resultado é válido (default)	
<i>Código</i>	ACC	Result. é aceitável - Aceita = Passa
<i>Avaliação</i>	Aceitação	
<i>Inspetor</i>	KAJIT_TA	
<i>Data</i>	05.06.2012	
Característica	0080	CHECAGEM RETIRADA MAT.PRODUTO ANTERIOR
<i>Status</i>	Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>	O resultado é válido (default)	
<i>Código</i>	ACC	Result. é aceitável - Aceita = Passa
<i>Avaliação</i>	Aceitação	
<i>Inspetor</i>	KAJIT_TA	
<i>Data</i>	05.06.2012	

 Allergan

20.11.2012 03:13

pg. 03 de 09

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
 Av. Guarulhos, 3.180
 Guarulhos - SP - Brasil
 6423-2000

Relatório de Inspeção

Número do lote F35853
 Lote de inspeção 30000535411
 Material 203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7
 Status Decisão de utilização tomada

Característica 0100 CHECAGEM DE RÓTULOS(CARIMBAGEM)

Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor KAJIT_TA
Data 05.06.2012

Característica 0120 CHECAGEM DE CARTUCHOS (CARIMBAGEM)

Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor KAJIT_TA
Data 05.06.2012

Característica 0130 CHECAGEM DE BULAS

Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor KAJIT_TA
Data 05.06.2012

Característica 0150 RETIRADA DE PRODUTOS P/ RETENÇÃO

Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor KAJIT_TA
Data 05.06.2012

Característica 0160 VERIFICAÇÃO DA IDENT. CAIXAS DE PAPELÃO

Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor KAJIT_TA
Data 05.06.2012

Allergan

20.11.2012 03:13

pg. 04 de 09

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
 Av. Guarulhos, 3.180
 Guarulhos - SP - Brasil
 6423-2000

Relatório de Inspeção

Número do lote F35853
 Lote de inspeção 30000535411
 Material 203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7
 Status Decisão de utilização tomada

Operação de inspeção 0020 ANALISE QUIMICA

Característica	0010	ASPECTO (INÍCIO)	
<i>Status</i>		Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>		O resultado é válido (default)	
<i>Código</i>	ACC	Result. é aceitável - Aceita = Passa	
<i>Avaliação</i>		Aceitação	
<i>Inspetor</i>	FARIA_M1		
<i>Data</i>	05.06.2012		
Característica	0020	ASPECTO (FIM)	
<i>Status</i>		Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>		O resultado é válido (default)	
<i>Código</i>	ACC	Result. é aceitável - Aceita = Passa	
<i>Avaliação</i>		Aceitação	
<i>Inspetor</i>	FARIA_M1		
<i>Data</i>	05.06.2012		
Característica	0030	pH (INÍCIO)	
<i>Status</i>		Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>		O resultado é válido (default)	
<i>Detalhes</i>		Limite de tolerância inferior	7,4000
		Limite de tolerância superior	7,6000
		Média dos valores válidos medidos	7,60
<i>Avaliação</i>		Aceitação	
<i>Inspetor</i>	FARIA_M1		
<i>Data</i>	05.06.2012		
Característica	0040	pH (FIM)	
<i>Status</i>		Processamento encerrado	
<i>Atributo</i>		O resultado é válido (default)	
<i>Detalhes</i>		Limite de tolerância inferior	7,4000
		Limite de tolerância superior	7,6000
		Média dos valores válidos medidos	7,60
<i>Avaliação</i>		Aceitação	
<i>Inspetor</i>	FARIA_M1		
<i>Data</i>	05.06.2012		

Allergan

20.11.2012 03:13

pg. 05 de 09

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
 Av. Guarulhos, 3.180
 Guarulhos - SP - Brasil
 6423-2000

Relatório de Inspeção

Número do lote F35853
 Lote de inspeção 30000535411
 Material 203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7

Status Decisão de utilização tomada

Característica 0050 OSMOLALIDADE (INÍCIO)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Detalhes Limite de tolerância inferior 250,0000 OPK
 Limite de tolerância superior 310,0000 OPK
 Média dos valores válidos medidos 272,0 mOs/kg
Avaliação Aceitação
Inspetor FARIA_M1
Data 05.06.2012

Característica 0060 OSMOLALIDADE (FIM)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Detalhes Limite de tolerância inferior 250,0000 OPK
 Limite de tolerância superior 310,0000 OPK
 Média dos valores válidos medidos 271,0 mOs/kg
Avaliação Aceitação
Inspetor FARIA_M1
Data 05.06.2012

Característica 0070 IDENTIFICAÇÃO DE TOBRAMICINA
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor FARIA_M1
Data 05.06.2012

Operação de inspeção 0030 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Allergan

20.11.2012 03:13

pg. 06 de 09

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
 Av. Guarulhos, 3.180
 Guarulhos - SP - Brasil
 6423-2000

Relatório de Inspeção

Número do lote F35853
 Lote de inspeção 30000535411
 Material 203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7

Status **Decisão de utilização tomada**

Característica 0010 TEOR DE TOBRAMICINA (INÍCIO)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Detalhes Limite de tolerância inferior 0,2800 %
 Limite de tolerância superior 0,3300 %
 Média dos valores válidos medidos 0,290 %
Avaliação Aceitação
Inspetor GALHA_PR
Data 05.06.2012

Característica 0020 TEOR DE TOBRAMICINA (FIM)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Detalhes Limite de tolerância inferior 0,2800 %
 Limite de tolerância superior 0,3300 %
 Média dos valores válidos medidos 0,300 %
Avaliação Aceitação
Inspetor GALHA_PR
Data 05.06.2012

Característica 0030 ESTERILIDADE
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor GALHA_PR
Data 05.06.2012

Operação de inspeção 0040 APROVAÇÃO FINAL

Característica 0010 VERIFICAR MONIT.AMBIENTAL (PROD/LABOR.)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor GALHA_PR
Data 05.06.2012

Allergan

20.11.2012 03:13

pg. 07 de 09

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
 Av. Guarulhos, 3.180
 Guarulhos - SP - Brasil
 6423-2000

Relatório de Inspeção

Número do lote F35853
 Lote de inspeção 30000535411
 Material 203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7

Status Decisão de utilização tomada

Característica 0030 VERIFICAR PLACAS RODAC (MONIT.DE SUPERF)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor GALHA_PR
Data 05.06.2012

Característica 0040 VERIFICAR ANÁLISE DE ÁGUA
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor GALHA_PR
Data 05.06.2012

Característica 0050 VERIFICAR "BIOBURDEN" DO PRODUTO
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor GALHA_PR
Data 05.06.2012

Característica 0060 VERIFICAR TESTES MICROBIOLÓGICOS (0030)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor GALHA_PR
Data 05.06.2012

Característica 0070 VERIFICAR TESTES QUÍMICOS (0020)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor SANTA_MA
Data 05.06.2012

Allergan

20.11.2012 03:13

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
 Av. Guarulhos, 3.180
 Guarulhos - SP - Brasil
 6423-2000

pg. 08 de 09

Relatório de Inspeção

Número do lote F35853
 Lote de inspeção 30000535411
 Material 203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7
 Status Decisão de utilização tomada

Característica 0080 VERIFICAR DESVIOS QMS / Media Fill (GMP)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor SANTA_MA
Data 05.06.2012

Característica 0090 AVALIAÇÃO FINAL (GMP)
Status Processamento encerrado
Atributo O resultado é válido (default)
Código ACC Result. é aceitável - Aceita = Passa
Avaliação Aceitação
Inspetor SANTA_MA
Data 05.06.2012

Decisão de utilização

Avaliação Aceito (OK)
Código Aceito, colocado em estoque irrestrito
Contagem de qualidade 0

 Allergan

20.11.2012 03:13

pg. 09 de 09

Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.
Av. Guarulhos, 3.180
Guarulhos - SP - Brasil
6423-2000

Relatório de Inspeção

Número do lote	F35853
Lote de inspeção	30000535411
Material	203586BR Tobragan Sol. Oft. 5mL -MS101470147001-7
Status	Decisão de utilização tomada

Declaramos que o produto/lote acima relacionado foi fabricado e esterilizado (quando aplicável), de acordo com os masters aprovados de produção e embalagem, tendo sido analisado de acordo com as normas atuais de boas práticas de fabricação/laboratório e respectiva licença de fabricação. Todos os documentos foram revisados pela área de Garantia da Qualidade e estão de acordo com os documentos oficiais de Produção, Garantia/Controle da Qualidade e BPF.

ESTE LOTE DE PRODUTO ESTÁ LIBERADO PARA COMERCIALIZAÇÃO

DATA DE FABRICAÇÃO: 15.05.2012

DATA DE VALIDADE: 15.11.2013

Assinatura Eletrônica para a Decisão de Utilização

99724 Maria Santana 05.06.2012 18:35 Lote de controle: decisão de utilização

*** Lote de inspeção 30000535411 completo ***

Allergan

Anexo IV: Laudo do Colírio a

Pag.: 1 / 1



ALCON LABORATÓRIOS DO BRASIL LTDA
 AV. NOSSA SENHORA DA ASSUNÇÃO, 736
 05359-001 - SÃO PAULO - SP
 FONE: (0XX11) 3732-4000

CERTIFICADO DE ANÁLISE

NOME DO PRODUTO: TOBEX SOL
 LOTE: 51391
 DATA DE VENCIMENTO: MAIO / 2015
 DATA DE FABRICAÇÃO: MAIO / 2012
 DATA DE LIBERAÇÃO: 29/08/12
 VOLUME ROTULADO: 5 mL

<u>TESTES</u>	<u>RESULTADOS</u>	<u>ESPECIFICAÇÕES</u>
Cor	INCOLOR (B9)	Incolor (B9) a amarelo pálido (Y4)
Clareza	LÍMPIDO	Límpido
pH	7,6	7,3 - 7,7
Osmolalidade	283	260 - 320 mOsm/kg
Turbidez	0,2	0,0 - 1,0 NTU
Ident. Tobramicina (HPLC)	POSITIVA	Positiva
Tobramicina (HPLC)	104	97 - 120%
Total de Produtos de Degradação (HPLC)	0,0	Informativo
Ident. Cloreto de Benzalcônio (HPLC)	POSITIVA	Positiva
Cloreto de Benzalcônio (HPLC)	107	90 - 116%
Tiloxapol (UV-VIS)	101	80 - 120%
Esterilidade	ESTÉRIL	Estéril

Este lote foi fabricado de acordo com as normas de GMP e procedimentos especificados no dossiê do produto. Todos os requisitos foram cumpridos, os resultados atenderam às especificações e o produto está liberado para ser comercializado.

Esta é uma representação de um registro eletrônico emitido por um sistema validado. Foi assinado eletronicamente e esta nota é a manifestação da assinatura eletrônica.
 Liberado por farmacêutico: Tatiana Torres Pubill CRP: 41752
 29/08/12

BZLIMSPR

BR_CERTIFICADO_ANALISE_V4