



**Larissa Ingrid Madeira Silva**

**Estudo do comportamento de nanopartículas  
de ouro sintetizadas diretamente em água e na  
presença de diferentes surfactantes e sua  
avaliação quantitativa como sonda analítica  
para aminoglicosídeos**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Andrea Rosane da Silva

Rio de Janeiro  
Agosto de 2019



**Larissa Ingrid Madeira Silva**

**Estudo do comportamento de nanopartículas  
de ouro sintetizadas diretamente em água e na  
presença de diferentes surfactantes e sua  
avaliação quantitativa como sonda analítica  
para aminoglicosídeos**

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

**Prof. Ricardo Queiroz Aucélio**

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

**Prof<sup>a</sup>. Andrea Rosane da Silva**

Coorientadora

CEFET/RJ

**Prof<sup>a</sup>. Aurora Pérez Gramatges**

Departamento de Química - PUC-Rio

**Prof<sup>a</sup>. Jéssica da Silva Alves de Pinho**

CEFET/RJ

**Dra. Joseany de Moraes Santos Almeida**

Departamento de Química - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 23 de agosto de 2019

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

### **Larissa Ingrid Madeira Silva**

Graduou-se em Química Industrial na USS (Universidade Severino Sombra – Vassouras/RJ) em 2016. Coursou Técnico em Química no CEFET/AM em 2007. Trabalhou nos anos de 2009 a 2014 na indústria alimentícia em controle de qualidade. É atualmente técnica em química no CEFET/RJ, atuando em ensino e pesquisa junto ao corpo docente e discente. Já atuou em pesquisas no ramo de microrganismos probióticos, análise da qualidade de águas para consumo e atualmente se dedica a pesquisas no ramo da espectroanalítica.

### **Ficha Catalográfica**

Silva, Larissa Ingrid Madeira

Estudo do comportamento de nanopartículas de ouro sintetizadas diretamente em água e na presença de diferentes surfactantes e sua avaliação quantitativa como sonda analítica para aminoglicosídeos / Larissa Ingrid Madeira Silva; orientador: Ricardo Queiroz Aucélio; co-orientadora: Andrea Rosane da Silva. – 2019.

139 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2019.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Nanopartículas de ouro. 3. Gentamicina. 4. Neomicina. 5. Polímero de impressão molecular. 6. Brometo de cetiltrimetilamônio. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Silva, Andrea Rosane da. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus que foi tão fiel comigo em cada passo desta jornada e ao meu esposo Gleidson do qual não tenho palavras para agradecer a parceria e companheirismo em cada momento.

À CAPES, CNPq, FAPERJ e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha família de Manaus e Valença por todas as orações e carinho nos momentos mais difíceis, sobretudo a minha querida mãe Cristiana que sempre acreditou que eu conseguiria.

Com muito carinho agradeço aos meus orientadores Ricardo e Andrea, por toda paciência e ensinamentos que levarei não só em minha vida acadêmica, mas para minha vida pessoal como exemplo de profissionalismo e solidariedade.

Aos alunos de iniciação científica Paula e Alex, por todo apoio científico e conversas gostosas e aos meus queridos amigos do LEEA, de onde sempre levarei com muito carinho os momentos que vivemos: aos técnicos Ana Paula, Leila e Sônia e aos pesquisadores Carlos Toloza, Joseany, Anna De Falco, Jarol, Marlin, Claudiomar, Maqueira, Cristiane, Igor, Juliana e Thais.

À Dra. Aurora Gramatges por ceder os surfactantes e ao Dr. Dunieskys Gonzalez pelas microscopias.

E, finalmente, a toda equipe do CEFET/RJ de Valença pelo apoio e por ceder a estrutura para pesquisa, em especial aos meus amigos Silvana e Plínio por serem muitas vezes meus braços em horas difíceis.

## Resumo

Silva, Larissa Ingrid Madeira; Aucélio, Ricardo Queiroz; Silva Andrea Rosane da. **Estudo do comportamento de nanopartículas de ouro sintetizadas diretamente em água e na presença de diferentes surfactantes e sua avaliação quantitativa como sonda analítica para aminoglicosídeos.** Rio de Janeiro, 2019. 139p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Nanopartículas de ouro dispersas em água (AuNPs-H) e nanopartículas de ouro na presença dos surfactantes brometo de cetiltrimetilamônio (AuNPs-CTAB) e brometo de didecildimetilamônio (AuNPs-C10DAB) foram sintetizadas e caracterizadas por diversas técnicas. As variações nos perfis espectrais no UV-Vis dessas nanopartículas foram estudadas levando-se em consideração a intensidade e o comprimento de onda máximo da banda de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR); foram acompanhadas em função do tempo para nanopartículas estocadas sob refrigeração (4°C) com as mantidas na temperatura ambiente (27°C). Um comportamento anômalo (mais instável) foi observado para AuNPs-C10DAB na concentração  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . As suas atividades catalíticas também foram avaliadas na presença de 4-nitrofenol e verificou-se que a cinética mais efetiva foi do sistema sem surfactante. Finalmente, um estudo de interação com aminoglicosídeos (AMG) foi feito visando o uso das nanopartículas como sonda analítica. Todavia, somente AuNPs-H apresentaram resultados satisfatórios, o que indica que o surfactante impede que o AMG se aproxime da superfície das nanopartículas, visto que, em concentrações mais elevadas de CTAB ou C10DAB, não há variação significativa no sinal original da sonda quando o AMG está presente. Um método analítico foi desenvolvido baseado na interação AuNPs-H-gentamicina e AuNPs-H-neomicina a partir da otimização dos parâmetros: concentração de AuNPs-H, tampão, tempo de medição e faixa de concentração de AMG. Na condição ajustada para sondagem quantitativa, cada dispersão de trabalho foi constituída por 40% v/v ( $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ) de AuNPs-H 1,0 mL de tampão citrato pH 4,0 ( $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) e volume final de 5,0 mL ajustado pela adição água ultrapura, após micro-volumes apropriados de solução

estoque de AMG (exceto na dispersão branco) ou de amostras adicionadas. O monitoramento da variação dos perfis espectrais foi feito em 511 e em 681 nm, habilitando a construção de curvas analíticas em 681, e na razão (681/511). Para gentamicina, a faixa linear variou de 0,6 a 600  $\mu\text{g L}^{-1}$  com o limite de detecção (LD) de 0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para neomicina, faixa linear foi de 7,3 a 550  $\mu\text{g L}^{-1}$ , tendo LD de 6,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A aplicação do método foi feita determinando-se gentamicina (fortificação) em leite integral, e neomicina em solução controle (amostra aquosa simulada), medicamento e em saliva. Para habilitar a seletividade do método foi necessária a utilização de extração em fase sólida (SPE) em cartuchos comerciais empacotados com polímero de impressão molecular de AMG. Em amostras de leite (40  $\mu\text{L}$ ), após limpeza e SPE, foi possível quantificar  $1,72 \pm 0,03 \mu\text{g}$  de gentamicina, o equivale a  $39,1 \pm 0,2\%$ . As recuperações para neomicina em amostras de medicamento foram de aproximadamente  $45 \pm 3,0\%$  (após SPE), indicando interferências de outros componentes. Neomicina também foi recuperada em amostras de saliva após uso do medicamento obtendo valores próximos a  $0,36 \pm 0,02 \mu\text{g}$ . Em contraste, as recuperações em amostras simuladas chegaram até  $102,6 \pm 1,3\%$  (sem necessidade de SPE). Por fim foi feita uma avaliação comparativa de interação de AuNPs-H e nanopartículas de ouro sintetizadas com redução com citrato (AuNPs-citrato) que indicou diferença de comportamento na interação com AMG.

## Palavras-chave

Nanopartículas de ouro; gentamicina; neomicina; polímero de impressão molecular; brometo de cetiltrimetilamônio; brometo de didecildimetilamônio.

## Abstract

Silva, Larissa Ingrid Madeira; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor); Silva Andrea Rosane da (Co-advisor). **Study of the performance of gold nanoparticles synthesized directly in water and in the presence of different surfactants and its quantitative evaluation as aminoglycosides analytical probe.** Rio de Janeiro, 2019. 139p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Water-dispersed gold nanoparticles (AuNPs-H) and gold nanoparticles in the presence of surfactants cetyltrimethylammonium bromide (AuNPs-CTAB) and didecyldimethylammonium bromide (AuNPs-C10DAB) were synthesized and characterized using several techniques. The differences in the UV-Vis spectral profiles of these nanoparticles were studied monitoring the intensity and the localized surface plasmon resonance band (LSPR) maximum wavelength; these were monitored as a function of time taking into account storage conditions: under refrigeration (4°C) and at room-temperature (27°C). Anomalous (more unstable) profile was observed for AuNPs-C10DAB at  $1.0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Their catalytic activities were also evaluated in the presence of 4-nitrophenol and it was shown that the most effective kinetics was observed for the system without surfactant. Finally, an interaction study with aminoglycosides (AMG) was conducted aiming the application of nanoparticles as analytical probe. Only AuNPs-H produced adequate results, indicating that the surfactant prevents interaction between AMG and the surface of the nanoparticles since at higher concentrations of CTAB or C10DAB there is no significant variation in the original probe signal in presence of AMG. An analytical method was developed based on the AuNPs-H-gentamicin and AuNPs-H-neomycin interaction taking into consideration the optimization of the parameters: AuNPs-H concentration, buffer, signal stabilization time and the AMG concentration range. In the adjusted condition for quantitative probing, each dispersion consisted of 40% v/v ( $1.2 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>) of AuNPs-H, 1.0 mL of citrate buffer pH 4.0 ( $1.0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>) and final volume of 5.0 mL adjusted with ultrapure water addition, after appropriate micro-volumes of a stock solution of AMG (except in blank dispersion) or sample added. The spectral profiles were monitored at 511 and 681 nm, allowing the

construction of analytical curves at 681, and at the ratio (681/511). For gentamicin, the linear range reached from 0.6 to 600  $\mu\text{g L}^{-1}$  with the limit of detection (LD) of 0.06  $\mu\text{g L}^{-1}$ . For neomycin, the linear range was 7.3 to 550  $\mu\text{g L}^{-1}$ , with LD of 6.2  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The application of the method was made by determining gentamicin (fortification) in whole milk, and neomycin in control solution (simulated aqueous sample), pharmaceutical samples and saliva. In order to enable selectivity of the method it was necessary to use solid phase extraction (SPE) using a commercial SPE cartridge packed with an AMG molecular imprinted polymer. In milk samples (40  $\mu\text{L}$ ), after clean up and SPE, it was possible to quantify  $1.72 \pm 0.03$   $\mu\text{g}$  gentamicin, which is equivalent to  $39.1 \pm 0.2\%$ . Recoveries for neomycin in drug samples were approximately  $45 \pm 3.0\%$  (after SPE), indicating interferences of other components. Neomycin was also recovered in saliva samples after drug use obtaining values close to  $0.36 \pm 0.02$   $\mu\text{g}$ . In contrast, the recoveries in simulated samples reached up to  $102.6 \pm 1.3\%$  (no need for SPE). Finally, a comparative evaluation of the interaction of AuNPs-H and gold nanoparticles synthesized with reduction with citrate (AuNPs-citrato) was performed, indicating differences in terms of the interaction with AMG.

## Keywords

Gold nanoparticles; gentamicin; neomycin; molecular imprinting polymer; cetyltrimethylammonium bromide; didecyldimethylammonium bromide.



## Sumário

1	Contextualização do trabalho	23
1.1.	Objetivos	26
1.1.1.	Objetivo geral	26
1.1.2.	Objetivos Específicos	26
1.2.	Introdução	28
1.2.1.	Nanopartículas de ouro	28
1.2.2.	Agentes capeantes em sistemas coloidais	32
1.2.3.	Surfactantes	33
1.2.3.1.	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	37
1.2.3.2.	Brometo de didecildimetilamônio (C10DAB)	39
1.2.4.	Aminoglicosídeos	41
1.2.4.1.	Gentamicina	43
1.2.4.2.	Neomicina	44
1.2.5.	Métodos de quantificação de AMGs utilizando nanopartículas de ouro	45
1.2.5.1.	Quantificação de gentamicina em leite e em outras amostras	49
1.2.5.2.	Quantificação de neomicina	51
1.2.6.	Extração em fase sólida e polímero de impressão molecular	52
2	Materiais e métodos	55
2.1.	Materiais e reagentes	55
2.1.1.	Reagentes	55
2.1.2.	Materiais	56
2.2.	Instrumentação	56
2.3.	Procedimentos	57
2.3.1.	Limpeza	57
2.3.2.	Síntese das nanopartículas de ouro	57
2.3.3.	Caracterização das nanopartículas ouro obtidas	58
2.3.4.	Preparo de soluções	59
2.3.5.	Preparo das dispersões	60
2.3.6.	Parâmetros analíticos de mérito	62
2.3.6.1.	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	63
2.3.6.2.	Precisão	63
2.3.7.	Cálculo para ensaios de recuperação e variação	64
2.3.8.	Preparo de amostras de leite integral	64
2.3.9.	Coleta das amostras de saliva e sua preparação	65

2.3.10. Extração em fase sólida com monitoramento usando a sonda AuNPs-H	66
2.3.11. Método espectrofotométrico para sulfato de neomicina com derivatização com ninidrina	67
2.3.12. Método cromatográfico para determinação de neomicina	67
 3 Estudo de nanopartículas de ouro na presença de surfactantes	 69
3.1. Síntese e caracterização das AuNPs	69
3.2. Avaliação da influência da temperatura e tempo de estocagem das AuNPs-CTAB e das AuNPs-C10DAB	77
3.3. Avaliação da estabilidade das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB	81
3.4. Estudo do comportamento das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB na presença de aminoglicosídeos	83
3.5. Avaliação da atividade catalítica das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB	85
 4 Avaliação do potencial analítico das nanopartículas de ouro dispersas em água sem capeamento orgânico (AuNPs-H)	 89
4.1. Síntese das AuNPs-H	89
4.2. Avaliação da estabilidade estocagem em função da temperatura, e composição de AuNPs-H nas dispersões de trabalho	90
4.3. Avaliação da interação AuNPs-H com aminoglicosídeos	94
4.3.1. Parâmetros de mérito	98
4.4. Estudo de seletividade da sonda e ajuste de procedimento SPE em cartuchos de polímero impresso molecularmente com AMG	103
4.5. Determinação espectrofotométrica de sulfato de gentamicina em amostras de leite integral usando a sonda AuNPs-H	112
4.6. Determinação espectrofotométrica de sulfato de neomicina em amostras simuladas, de medicamento e de saliva usando a sonda AuNPs-H	114
4.6.1. Método comparativo espectrofotométrico com derivatização usando ninidrina para determinação de sulfato de neomicina nas amostras simuladas	118
4.6.2. Método comparativo por HPLC, através de derivatização com OPA, para determinação de sulfato de neomicina nas amostras de medicamento nasal	119
4.7. Comparação AuNPs-H e AuNPs-citrato frente a interação com AMG	120

5 Conclusões	126
6 Referências bibliográficas	129
7 Anexos	138
Anexo I – Método comparativo de derivatização por ninidrina	138
Anexo II – Método comparativo cromatográfico	139

## Lista de figuras

Figura 1: Oscilação dipolo formada na superfície metálica.	28
Figura 2: Esquema do processo de formação de nanopartículas de ouro.	31
Figura 3: Estrutura química do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).	38
Figura 4: Propostas de estabilização de AuNPs por CTAB acima da CMC (1) estabilização em bicamadas (2) estabilização em micelas.	39
Figura 5: Estrutura química do brometo de didecildimetilamônio (C10DAB).	40
Figura 6: AuNPs capeadas por uma dupla camada lipídica de surfactantes.	41
Figura 7: Estruturas químicas que representam o complexo sulfato de gentamicina C <sub>1</sub> , C <sub>1a</sub> e C <sub>2</sub> .	43
Figura 8: Estrutura química do sulfato de neomicina (componente principal).	44
Figura 9: Esquema mostrando uma possível interação entre AuNPs revestidas com 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano e neomicina.	48
Figura 10: Síntese de nanopartículas de ouro em: (A) balão de fundo redondo e no reator Orb (B).	70
Figura 11: Perfis espectrais das triplicatas de síntese das nanopartículas (a-c), sendo: (A) AuNPs-CTAB-10 <sup>-2</sup> , (B) AuNPs-CTAB-10 <sup>-3</sup> , (C) AuNPs-CTAB-10 <sup>-4</sup> , (D) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-2</sup> , (E) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-3</sup> e (F) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-4</sup> .	72
Figura 12: Imagens obtidas por STEM para: (A) AuNPs-CTAB-10 <sup>-2</sup> , (B) AuNPs-CTAB-10 <sup>-3</sup> e (C) AuNPs-CTAB-10 <sup>-4</sup> .	73
Figura 13: Imagens obtidas por STEM para: (A) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-2</sup> , (B) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-3</sup> e (C) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-4</sup> .	74
Figura 14: Histogramas da razão de aspectos (eixo maior/eixo menor) referentes ao processamento das imagens da AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB, (A) AuNPs-CTAB-10 <sup>-2</sup> , (B) AuNPs-CTAB-10 <sup>-3</sup> , (C) AuNPs-CTAB-10 <sup>-4</sup> , (D) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-2</sup> , (E) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-3</sup> e (F) AuNPs-C10DAB-10 <sup>-4</sup> .	75
Figura 15: Variação nos perfis espectrais das AuNPs-CTAB-10 <sup>-2</sup> estocadas: (A) temperatura de 4°C, no dia da síntese (a), 1 dia após a síntese (b) e 56 dias após a síntese (c), e (B) na temperatura ambiente, no dia da síntese, 1 dia após a síntese (b) e 56 dias após a síntese (c).	79
Figura 16: Variação nos perfis espectrais das AuNPs-C10DAB-10 <sup>-2</sup> estocadas: (A) temperatura de 4°C, no dia da síntese (a), 1 dia	

após a síntese (b) e 239 dias após a síntese (c), e (B) na temperatura ambiente, no dia da síntese (a), 1 dia após a síntese (b) e 239 dias após a síntese (c). 79

Figura 17: Variação nos perfis espectrais das AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$  estocadas: (A) temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , (a) no dia da síntese, (b) 26 dias após a síntese, (c) 83 dias após a síntese, (d) 111 dias após a síntese e (e) 154 dias após a síntese e (B) temperatura ambiente, (a) no dia da síntese, (b) 26 dias após a síntese e (c) 83 dias após a síntese. 80

Figura 18: Perfil de estabilidade de medições feitas durante 120 min para (A): (a) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$ , (b) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$ , (c) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$ , e (B): (a) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$ , (b) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  e (c) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ . 81

Figura 19: Proposta de estruturas de AuNPs-CTAB em dispersões diluídas 20% v/v. (A) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$ , (B) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$  e (C) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$ . 82

Figura 20: Proposta de estruturas de AuNPs-C10DAB em dispersões diluídas 20% v/v. (A) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ , (B) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  e (C) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$ . 83

Figura 21: AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  em presença de AMGs na variação de: (a) ausência do AMG, (b)  $12\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $60\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $120\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $600\ \mu\text{g L}^{-1}$  e (f)  $1200\ \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo em (A) sulfato de canamicina, (B) sulfato de estreptomicina, (C) sulfato de gentamicina, e (D) sulfato de neomicina. 84

Figura 22: AuNPs-CTAB- $10^{-3}$  em presença de AMGs na variação de : (a) ausência do AMG, (b)  $12\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $60\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $120\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $600\ \mu\text{g L}^{-1}$  e (f)  $1200\ \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo em (A) sulfato de canamicina, (B) sulfato de estreptomicina, (C) sulfato de gentamicina, e (D) sulfato de neomicina. 84

Figura 23: AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  em presença de AMGs na variação de : (a) ausência do AMG, (b)  $12\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $60\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $120\ \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $600\ \mu\text{g L}^{-1}$  e (f)  $1200\ \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo em (A) sulfato de canamicina, (B) sulfato de estreptomicina, (C) sulfato de gentamicina, e (D) sulfato de neomicina. 85

Figura 24: Espectro de UV-Vis para o 4-nitrofenol e íon 4-nitrofenolato. Adaptado de Toloza [103]. 86

Figura 25: Espectros UV-Vis para a redução catalítica do 4-nitrofenol. Redução catalisada por: (A) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  – Até 8 minutos, (B) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$  – Até 20 minutos, (C) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$  – Até 180 minutos, (D) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$  – Até 12 minutos, (E) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  – Até 80 minutos e (F) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$  – Até 600 minutos. 87

Figura 26: Perfil temporal do decréscimo de  $\ln(A/A_0)$  para o íon 4-nitrofenolato (401 nm) na presença de (A): AuNPs em CTAB (a), AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  (b) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$ , (c) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$  e

(B): AuNPs em C10DAB (a), AuNPs-C10DAB-10<sup>-2</sup>, (b) AuNPs-C10DAB-10<sup>-3</sup> e (c) AuNPs-C10DAB-10<sup>-4</sup>. 88

Figura 27: Perfis espectrais no UV-Vis das triplicatas (a-c) de sínteses das AuNPs-H. 90

Figura 28: Perfis espectrais no UV-Vis das AuNPs-H estocadas a 4°C (A) e a 27 °C (B): no dia da síntese (a), 10 dias após a síntese (b), 48 dias após a síntese (c), 105 dias após a síntese (d), 133 dias após a síntese (e), 176 dias após a síntese (f), 259 dias após a síntese (g), 322 dias após a síntese (h) e 358 dias após a síntese (i). Com detalhe da ampliação da variação do  $\lambda_{\max}$  da LSPR 91

Figura 29: Comparação da intensidade máxima da banda LSPR de dispersões de AuNPs-H constituídas por (a) 20% v/v, (b) 32% v/v e (c) 40% v/v. 92

Figura 30: Perfis espectrais das dispersões de AuNPs-H diluídas a 40% v/v preparadas: (a) sem tampão, (b) na presença de tampão citrato pH 4,0 e (c) na presença de tampão fosfato pH 7,2, ambos na concentração de  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . 93

Figura 31: Estabilidade do sinal de dispersões de AuNPs-H 40%v/v com monitoramento em 511 nm: (A) sem tampão, (B) na presença de tampão citrato pH 4,0 e (C) na presença de tampão fosfato pH 7,2 ambos na concentração de  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . 94

Figura 32: Espectros de extinção de dispersões 40% v/v de AuNPs-H com sulfato de neomicina: (a) ausência do AMG, (b) 91  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (c) 182  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (d) 273  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (e) 364  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (f) 546  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (f) 910  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (h) 1183  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (i) 1453  $\mu\text{g L}^{-1}$ . (A) Dispersão tamponada com citrato, pH 4,0 e (B) dispersão tamponada com fosfato, pH 7,2, ambos na concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . 95

Figura 33: Espectros de extinção de dispersões de trabalho 40% v/v de AuNPs-H, tamponadas com citrato, contendo diferentes concentrações de AMGs: (a) ausência do AMG, (b) 91  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (c) 182  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (d) 273  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (e) 364  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (f) 546  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (f) 910  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (h) 1183  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (i) 1453  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo (A) dispersões contendo sulfato de canamicina, (B) dispersões contendo sulfato de estreptomicina e (C) dispersões contendo sulfato de gentamicina. 96

Figura 34: Estabilidade das dispersões de trabalho de AuNPs-H na presença de: (A) sulfato de gentamicina (60  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e (B) sulfato de neomicina (91  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Monitoramento em 681nm (a), e razão 681/511 nm (b). 97

Figura 35: (A) Espectros das dispersões de trabalho de AuNPs-H na presença de sulfato de gentamicina nas concentrações de: (a) ausência do AMG, (b) 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (c) 3,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (d) 36,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (e) 60,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (f) 120,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (g) 420,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (h) 600  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (B) mudança de coloração do salmão para azul proporcional ao aumento da concentração de sulfato de gentamicina. 98

Figura 36: (A) Espectros das dispersões de trabalho de AuNPs-H na presença de sulfato de neomicina nas concentrações de: (a)

- ausência do AMG, (b)  $7,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $9,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $55,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $91,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , (f)  $184,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , (g)  $366,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e (h)  $550,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . (B) mudança de coloração do salmão para azul proporcional ao aumento da concentração de sulfato de neomicina. 99
- Figura 37: Curvas analíticas em função da concentração de sulfato de gentamicina ( $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $36,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $120,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $420,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $600 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em dispersões de trabalho AuNPs-H (A) curva em 681 nm, (B) curva na razão 681/511, (C) gráfico de resíduos em 681 nm e (D) gráfico de resíduos na razão 681/511. 100
- Figura 38: Curvas analíticas em função da concentração de sulfato de neomicina ( $7,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $9,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $55,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $91,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $184,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $366,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $550,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em dispersões de trabalho AuNPs-H (A) curva em 681 nm, (B) curva na razão 681/511, (C) gráfico de resíduos em 681 nm e (D) gráfico de resíduos na razão 681/511. 100
- Figura 39: Comparação dos perfis espectrais de extinção de dispersões de trabalho AuNPs-H antes (a) e após a adição de: (A) amostra de leite integral antes do *clean up* (b) e (B) amostras de leite integral após *clean up* (c). Amostras sem AMG. 103
- Figura 40: Comparação do perfil espectral da dispersão de trabalho de AuNPs-H: (a) sem adição de saliva, (b) saliva após *clean up* e (c) saliva antes do *clean up*. Amostras sem AMG 104
- Figura 41: Avaliação de interferência dos co-fármacos em relação ao sinal do padrão de sulfato de neomicina  $91 \mu\text{g L}^{-1}$  em (A) cloridrato de nafazolina em 681 nm, (B) cloridrato de nafazolina na razão 681/511, (C) fosfato dissódico de dexametasona em 681 nm e (D) fosfato dissódico de dexametasona na razão 681/511. Respectivos valores (sem desvio) em destaque 105
- Figura 42: Teste de acondicionamento dos cartuchos MIP-AMG, frações 1 a 7 (eluição com água ultrapura) e frações 8 a 10 (eluição com tampão citrato), sendo (A) monitoramento em 681 nm e (B) monitoramento na razão 681/511. 106
- Figura 43: Avaliação dos tempos de retenção (30, 40 e 60 minutos) do sulfato de gentamicina nos cartuchos MIP-AMG referentes ao somatório das recuperações das frações 8 e 9, em 681 (a) e na razão de comprimentos de onda 681/511 (b). 107
- Figura 44: Recuperações do padrão de sulfato de gentamicina em dispersões de trabalho de AuNPs-H a partir do carregamento dos cartuchos MIP-AMG com  $0,88 \mu\text{g}$  (monitoramento: (A) 681 e (B) razão 681/511);  $4,4 \mu\text{g}$  (monitoramento: (C) 681 e (D) razão de comprimentos de onda 681/511) e  $8,8 \mu\text{g}$  (monitoramento: (E) 681 e (F) razão de comprimentos de onda 681/511). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e de 8 a 10 eluição com tampão citrato. 108
- Figura 45: Recuperações do padrão de sulfato de neomicina em dispersões de trabalho de AuNPs-H a partir do carregamento dos cartuchos MIP-AMG com  $0,84 \mu\text{g}$  (monitoramento: (A) 681 e (B)

razão de comprimentos de onda 681/511) e 4,2 µg (monitoramento: (C) 681 e (D) razão de comprimentos de onda 681/511). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e de 8 a 10 eluição com tampão citrato.	109
Figura 46: Variações das frações eluídas nos cartuchos MIP-AMG de matrizes de leite integral reconstituídas nas dispersões de trabalho de AuNPs-H. Monitoramento em: 681 nm (A) e na razão de comprimentos de onda 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e de 8 a 10 eluição com tampão citrato.	111
Figura 47: Variações das frações eluídas nos cartuchos MIP-AMG de matrizes de saliva reconstituídas nas dispersões de trabalho de AuNPs-H. Monitoramento em: 681 nm (A) e na razão 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e fração 8 eluída com tampão citrato.	112
Figura 48: Eluição das frações da solução de cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona nos cartuchos MIP-SPE, reconstituídas nas dispersões de trabalho de AuNPs-H. Monitoramento em: 681 nm (A) e na razão de comprimentos de onda 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e fração 8 eluição com tampão citrato.	112
Figura 49: Recuperações de sulfato de gentamicina em dispersões de trabalho de AuNPs-H, de amostras de leite fortificadas (4,4 µg de sulfato de gentamicina). Recuperações encontradas a partir do monitoramento em 681 (A), e na razão de comprimentos de onda 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e de 8 a 10 eluição com tampão citrato.	113
Figura 50: Recuperações de sulfato de neomicina em dispersões de trabalho de AuNPs-H, de amostras de medicamento nasal (0,84 µg considerando o indicado na bula do fabricante). Recuperações encontradas a partir do monitoramento em 681 (A), e na razão de comprimentos de onda 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e fração 8 eluída com tampão citrato.	115
Figura 51: Eluições das amostras de saliva contendo medicamento nasal, reconstituídas em dispersões de trabalho de AuNPs-H, monitoramento em 681 (A), e na razão 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e fração 8 eluída com tampão citrato.	116
Figura 52: Comparação dos perfis de UV-Vis (a) AuNPs-H e (b) AuNPs-citrato.	121
Figura 53: Imagens obtidas por STEM para: (A) AuNPs-H e (B) AuNPs-citrato.	122
Figura 54: Espectros em extinção de dispersões de trabalho de AuNPs-citrato nas concentrações crescentes de (A) sulfato de neomicina de: 3,6 a 58,2 µg L <sup>-1</sup> (a) ausência do AMG, (b) 3,6 µg L <sup>-1</sup> , (c) 7,3 µg L <sup>-1</sup> , (d) 14,6 µg L <sup>-1</sup> , (e) 29,0 µg L <sup>-1</sup> , (f) 36,4 µg L <sup>-1</sup> , (g) 54,6 µg L <sup>-1</sup> e (h) 58,2 µg L <sup>-1</sup> e (B) sulfato de gentamicina de: (a) ausência	



do AMG, (b) $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c) $4,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d) $16,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e) $24,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , (f) $50,4 \mu\text{g L}^{-1}$ , (g) $64,8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e (h) $72,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .	123
Figura 55: Perfil de decréscimo de $\ln(A/A_0)$ para o íon 4-nitrofenolato (400 nm) na presença de: (a) AuNPs-H e (b) AuNPs-citrato	125
Figura 56: Perfis espectrais de padrões de sulfato de neomicina variando de: (a) ausência de AMG, (b) $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (c) $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (d) $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (e) $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ , derivatizados por ninidrina.	138
Figura 57: Cromatograma do padrão de sulfato de neomicina ( $2,0 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$ )	139

## Lista de tabelas

Tabela 1: Relação do parâmetro de empacotamento com organização do meio.	36
Tabela 2: Resumo dos métodos de quantificação de gentamicina em amostras diversas.	51
Tabela 3: Pesquisas utilizando MIP como SPE.	54
Tabela 4: Identificação das nanopartículas de ouro obtidas em função das condições usadas.	58
Tabela 5: Soluções tampão.	60
Tabela 6: Valores de potencial $\zeta$ , Dh, e dados de morfologia obtidos para as AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB.	73
Tabela 7: Valores estimados das concentrações de nanopartículas de ouro nas dispersões de síntese.	76
Tabela 8: Resumo dos dados obtidos após as análises temporais realizadas em nanopartículas estocadas sob refrigeração (4°C)	78
Tabela 9: Resumo dos dados obtidos após as análises temporais realizadas em nanopartículas estocadas à temperatura ambiente (27°C).	78
Tabela 10: Parâmetros da atividade catalítica das nanopartículas.	88
Tabela 11: Resultados de Dh e de potencial $\zeta$ para AuNPs-H estocadas sob refrigeração (4°C) e em temperatura ambiente (27°C).	91
Tabela 12: Condições estabelecidas para as dispersões de trabalho de AuNPs-H.	97
Tabela 13: Equações das curvas analíticas para sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina obtidas a partir das dispersões de trabalho de AuNPs-H.	102
Tabela 14: LD e LQ para monitorado do sinal em 681 nm e na razão (681/511).	102
Tabela 15: Precisão instrumental e precisão intermediária da sonda de AuNPs-H em relação á sulfato de gentamicina.	102
Tabela 16: Precisão instrumental e precisão intermediária da sonda de AuNPs-H em relação á sulfato de neomicina.	103
Tabela 17: Recuperação em 681 nm e na razão de comprimentos de onda 681/511 dos testes de carregamento nos cartuchos MIP-AMG para sulfato de gentamicina (somatório das recuperações das frações 8 e 9) e sulfato de neomicina (recuperação da fração 8).	110
Tabela 18: Recuperações de sulfato de gentamicina em amostras de leite fortificadas.	114
Tabela 19: Recuperação de sulfato de neomicina em amostras simuladas.	114

Tabela 20: Recuperações de sulfato de neomicina em amostras de medicamento nasal	116
Tabela 21: Quantificação de sulfato de neomicina em amostras de saliva.	116
Tabela 22: Recuperações de sulfato de neomicina em amostras simuladas pelo método de derivatização por ninidrina.	118
Tabela 23: Comparativo entre as recuperações percentuais de sulfato de neomicina pelo método de derivatização por ninidrina e pela sonda de AuNPs-H. Nível 1 equivale a menor concentração de sulfato de neomicina, e nível 2 a maior.	118
Tabela 24: Recuperações de sulfato de neomicina em amostras de medicamento nasal pelo método cromatográfico.	119
Tabela 25: Diferenças entre os parâmetros de síntese de AuNPs-H e AuNPs-citrato	121
Tabela 26: Valores de potencial $\zeta$ , Dh, e dados de morfologia obtidos para AuNPs-H e AuNPs-citrato.	121
Tabela 27: Potenciais $\zeta$ de dispersões AuNPs-citrato e AuNPs-H na presença de sulfato de gentamicina em diferentes valores de pH.	124
Tabela 28: Parâmetros da atividade catalítica das nanopartículas AuNPs-H e AuNPs-citrato.	125

## Lista de Abreviaturas

AMG – Aminoglicosídeo

AuNPs - Nanopartículas de ouro

AuNPs-H - Nanopartículas de ouro dispersas em água sem capeamento orgânico reduzidas por boro-hidreto de sódio

AuNPs-CTAB - Nanopartículas de ouro capeadas com brometo de cetiltrimetilamônio reduzidas por boro-hidreto de sódio

AuNPs-C10DAB - Nanopartículas de ouro capeadas com brometo de dodecildimetilamônio reduzidas por boro-hidreto de sódio

AuNPs-citrato - Nanopartículas de ouro dispersas em água reduzidas por citrato de sódio

AuNRs - Nanopartículas de ouro em forma de bastão

$a_0$  - Área transversal ocupada pelo grupo hidrofílico na interface de solução micelar

$\delta_{abs}$  - Coeficiente de absorção

C10DAB - Brometo de dodecildimetilamônio

C12DAB - Brometo de dodecildimetilamônio

CMC - Concentração micelar crítica

$C_{recuperada}$  – Concentração teórica

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

CTACl - Cloreto de cetiltrimetilamônio

$C_{teórica}$  – Concentração teórica

CV - Coeficiente de variação

CVC - Concentração vesicular crítica

$D_h$  – Diâmetro hidrodinâmico

DLS - Espalhamento de luz dinâmica

$\delta_{esc}$  - Coeficiente de radiação espalhada

$\delta_{ext}$  - Coeficiente de extinção

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa

$k$  - Fator de confiança para cálculo de LD e LQ

$k_1$  - Constante de velocidade aparente

$l_c$  - Comprimento do grupo hidrofóbico no núcleo

LD - Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LSPR - Ressonância plasmônica de superfície localizada

MIP - Polímero de impressão molecular

MIP-AMG – Cartucho SPE com impressão molecular de aminoglicosídeo

$m$  - sensibilidade das curvas analíticas

OPA - o-ftalaldeído

P - Parâmetro de empacotamento

$s_b$  - Desvio padrão do branco

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SPE - Extração em fase sólida

STEM - Microscopia eletrônica de varredura por transmissão

UPLC - Cromatografia líquida de ultra eficiência

UV-Vis - Espectroscopia no ultravioleta visível

$V_H$  - Volume ocupado pelos grupos hidrofóbicos no núcleo micelar

$x_b$  – sinal do branco

$\zeta$  – Zeta

“Aquele que vos chamou é fiel”  
*1 Ts 5,24*

## Contextualização do trabalho

Os aminoglicosídeos representam uma classe de substâncias que são amplamente utilizadas no tratamento de infecções bacterianas. Desde a descoberta do sulfato de estreptomicina em meados do século XX [1], o uso dessa classe tem sido bastante difundido, sendo muito utilizado na medicina humana e veterinária. Entretanto, é necessário tomar cuidado com a quantidade de aminoglicosídeo ingerida devido aos seus efeitos adversos como nefrotoxicidade e ototoxicidade.

O sulfato de gentamicina, por exemplo, é um aminoglicosídeo muito utilizado no tratamento da mastite bovina, uma inflamação das glândulas mamárias que pode ser causada por fungos ou bactérias. A administração por via intramamária deve ser feita após a ordenha [2], e o animal precisa ser submetido a um período de quarentena, uma vez que a contaminação do leite pode representar perigo para o consumo humano.

O limite máximo de resíduos para aminoglicosídeos em alimentos é determinado por agências de fiscalização alimentar nacionais e internacionais. De acordo com o *Codex Alimentarius* [3], que representa um conjunto de normas internacionais na área de alimentos (sendo um programa da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, e da Organização Mundial da Saúde), no leite de gado, o limite máximo de resíduos para o sulfato de gentamicina é de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , e para o sulfato de neomicina é de  $1500 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Estes limites representam uma grande limitação para os métodos analíticos de detecção, pois os aminoglicosídeos são substâncias que não podem ser detectadas diretamente através de métodos ópticos de análise. Portanto, requerem métodos que incluam derivatização química, e estes dificilmente apresentam limites de detecção baixos [4]. Isso, sem mencionar que grande parte requer a utilização de técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência [5].

Neste contexto, a determinação indireta de aminoglicosídeos através da utilização de sondas constituídas por nanopartículas de ouro, surge como um grande avanço na área da química analítica, pois os grupos amina (presentes nestes compostos) apresentam alta afinidade pelo ouro coloidal. Não obstante, demais grupamentos amina, como por exemplo, os presentes nas proteínas [6],

também interagem significativamente com as nanopartículas de ouro, assim a eliminação da interferência das matrizes das amostras representa um desafio. Esta limitação também foi relatada por Santos [7], na primeira dissertação de mestrado abordando o tema desenvolvido pelo grupo de trabalho do Dr. Ricardo Aucélio (PUC-Rio). No referido trabalho, Santos *et al.* desenvolveram uma sonda analítica com nanopartículas de ouro obtidas com citrato de sódio monobásico, como agente redutor, que interagiu consideravelmente com alguns aminoglicosídeos, incluindo o sulfato de tobramicina. Um dos estudos envolveu a tentativa de se determinar o aminoglicosídeo sulfato de tobramicina em amostras de saliva de um indivíduo sob administração de solução oftálmica. No entanto, não se conseguiu eliminar a interferência da matriz de saliva. Assim, determinação do aminoglicosídeo foi feita diretamente nas amostras das soluções oftálmicas, nas quais os excipientes das fórmulas não interferiram considerando o nível relativo destes em relação aos níveis de concentrações de sulfato de tobramicina determinados. Subsequentemente, Miranda-Andradas [8] sintetizou nanopartículas de ouro, na forma de bastão, na presença de alta concentração ( $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ) do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio. Porém, o autor só teve sucesso na determinação do analito a partir do momento que removeu parte do surfactante presente nas dispersões. O método foi aplicado na determinação do sulfato de gentamicina, em amostras de formulações injetáveis comerciais contendo sulfato de gentamicina. Novamente os excipientes das formulações não interferiram, pois a proporção de sulfato de gentamicina, em relação a eles, era significativamente elevada.

Esses trabalhos serviram de inspiração para o desenvolvimento da presente dissertação, na qual os analitos também são os aminoglicosídeos, e as nanopartículas de ouro, mais uma vez seriam obtidas com intuito de utilização como sonda. Partiu-se da utilização do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (de uma cauda) em diferentes níveis de concentração, como sendo um sistema de nanopartículas de referência em meio organizado (pois é muito citado na literatura [9–11]). Alternativamente, escolheu-se trabalhar também com o surfactante catiônico de duas caudas, brometo de didecildimetilamônio, sendo a utilização deste inédita em sínteses de nanopartículas de ouro. Obteve-se também nanopartículas de ouro sem recobrimento orgânico, como um contraponto em relação ao revestimento



promovido pelos surfactantes. Assim sendo, essa dissertação foi dividida nos seguintes capítulos:

No capítulo 1 uma introdução teórica é apresentada. Primeiramente apresentam-se conceitos teóricos sobre nanopartículas de ouro, os métodos de síntese, fontes de ouro, diferentes agentes redutores e de recobrimento. Em seguida, faz-se um resumo sobre os surfactantes, especificando seus tipos e peculiaridades em relação à concentração, sendo dado especial destaque aos surfactantes catiônicos de duas caudas brometo de cetiltrimetilamônio e brometo de didecildimetilamônio e suas interações com nanopartículas de ouro. Em seguida, contextualiza-se a importância dos aminoglicosídeos, explanando os diferentes métodos de quantificação e potencial para utilização de nanopartículas de ouro como quantificação destes. Por fim, é abordada de maneira rápida uma explicação sobre extração em fase sólida com destaque para polímeros de impressão molecular.

No capítulo 2 se faz a descrição de todos os procedimentos experimentais realizados. Nele se pode encontrar a listagem dos materiais, reagentes e instrumentações que se fizeram necessários para a execução do trabalho. Apresenta-se também a descrição dos procedimentos realizados com condições otimizadas e as equações matemáticas para o cálculo dos parâmetros analíticos de mérito entre outros.

No capítulo 3 encontram-se os resultados e a discussão a respeito das diferenças nas nanopartículas obtidas na presença dos surfactantes brometo de cetiltrimetilamônio e brometo de didecildimetilamônio em diferentes concentrações. A caracterização morfológica, o estudo da influência do tempo e temperatura de estocagem sobre as características espectrais das dispersões, interação com aminoglicosídeos e reatividade com 4-nitrofenol são apresentados.

No capítulo 4 se apresentam os resultados do desenvolvimento de um método analítico para determinação de sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina por espectrofotometria no UV-Vis, tirando-se proveito do efeito de ressonância plasmônica de superfície localizada de nanopartículas de ouro sintetizadas diretamente em água. Na otimização dos parâmetros experimentais, são mostrados todos os estudos para avaliação da estabilidade das dispersões de trabalho em função da variação de tempo, estocagem, pH e parâmetros analíticos de mérito. São apresentados também testes de interação destas nanopartículas com

diferentes aminoglicosídeos. Tirando proveito de um polímero de impressão molecular, amostras de leite fortificadas com sulfato de gentamicina, amostras de medicamento nasal contendo sulfato de neomicina e saliva (após uso desse medicamento) são analisadas pelo método desenvolvido. Amostras simuladas de sulfato de neomicina também foram analisadas para demonstrar a viabilidade do método. Encerrando o capítulo, os resultados da comparação entre nanopartículas sintetizadas diretamente em água com aquela obtida em meio contendo citrato são apresentados e discutidos.

Finalizando, o capítulo 5 traz as conclusões deste estudo, relacionando-as com os objetivos propostos.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo geral**

Estudar o comportamento de nanopartículas de ouro sintetizadas em água e na presença de surfactantes, bem como avaliar o potencial destas como sonda para determinação de aminoglicosídeos em diferentes amostras, incluindo leite e saliva.

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

- Sintetizar nanopartículas de ouro em soluções aquosas do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (AuNPs-CTAB) ou do brometo de didecildimetilamônio (AuNPs-C10DAB) em três níveis de concentração, bem como sintetizar nanopartículas em água sem recobrimento orgânico (AuNPs-H).
- Caracterizar as nanopartículas obtidas, e avaliar as variações nos perfis espectrais no UV-Vis em função da temperatura e do tempo de estocagem.
- Avaliar as atividades catalíticas das nanopartículas.
- Avaliar a estabilidade de medição das dispersões diluídas de AuNPs-CTAB, AuNPs-C10DAB e AuNPs-H, de forma a verificar a resposta

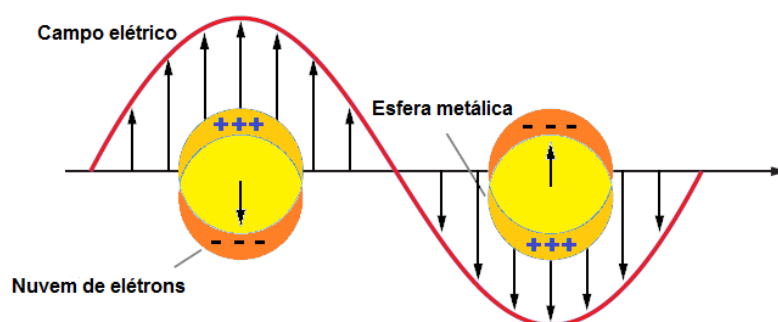
óptica das dispersões, que se mostraram estáveis, na presença de diferentes aminoglicosídeos.

- Verificar a influencia do pH e do tipo de tampão na interação da AuNPs-H (a que mostrou melhor potencial de sonda analítica) com os aminoglicosídeos,
- Realizar estudos de seletividade/interferência das AuNPs-H frente aos co-fármacos cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona, bem como em relação as matrizes de leite e saliva.
- Utilizar cartuchos de extração em fase sólida (SPE) com impressão molecular de aminoglicosídeo com o intuito de minimizar interferência das matrizes testadas e dos co-fármacos.
- Obter parâmetros analíticos de mérito para a sonda estabelecida a fim de determinar os aminoglicosídeos-alvo (sulfato de neomicina e sulfato de gentamicina) na sonda AuNPs-H.
- Aplicar a método desenvolvido na determinação de sulfato de gentamicina em amostras de leite integral, e na determinação de sulfato de neomicina em amostras simuladas e em amostras reais de medicamento nasal, e de saliva.
- Comparar aspectos morfológicos das nanopartículas de ouro obtidas a partir da redução com citrato de sódio monobásico e AuNPs-H (obtida pela redução por  $\text{NaBH}_4$ ), assim como comparar as respostas ópticas obtidas na presença dos aminoglicosídeos-alvo, e as atividades catalíticas na reação de redução do 4-nitrofenol.

## 1.2. Introdução

### 1.2.1. Nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro (AuNPs) são nanoestruturas de ouro que se encontram em escala nanométrica e que têm atraído grande interesse científico nas últimas décadas. O comportamento peculiar das partículas individuais em nanoescala confere às AuNPs propriedades eletrônicas, magnéticas e ópticas, que podem variar de acordo com o diâmetro e forma da nanoestrutura [12–14]. As propriedades ópticas são atribuídas à ressonância plasmônica de superfície localizada, do inglês, *localized surface plasmon resonance* (LSPR). Este fenômeno, causado pelo confinamento quântico dos elétrons, resulta no aparecimento de bandas (transversal e/ou longitudinal) no espectro na região do visível, quando AuNPs são excitadas por radiação eletromagnética [13,14]. A incidência de luz visível promove uma oscilação coerente dos elétrons livres (banda de condução de elétrons) do metal ao redor da superfície da partícula causando uma separação de cargas, permitindo assim, a formação de uma oscilação dipolar ao longo da direção do campo elétrico de luz, conforme ilustrado na Figura 1 [15,16].



**Figura 1:** Oscilação dipolo formada na superfície metálica. Adaptado de Willets & Duyne [17].

As propriedades físico-químicas de um material dependem da mobilidade de seus elétrons. Quando em nanoescala, os elétrons se encontram confinados, e quanto menor é o espaço disponível para os elétrons, maior será a separação de energia entre as bandas de estados permitidos, fenômeno esse chamado de

confinamento quântico [15]. A separação de energia dos estados, originalmente degenerados na escala macroscópica, advém das diferenças em interações que diferentes átomos estabelecem quando considerado o número limitado de átomos que interagem em uma nanopartícula. Ou seja, em nanoescala, um átomo possui uma vizinhança que pode ser ligeiramente diferente de outro presente na nanoestrutura, com isso esses apresentam energias que se diferem [17].

AuNPs esféricas apresentam uma única banda de LSPR transversal, que ocorre em uma faixa em torno de 500 nm, quando essa nanopartícula se aglomera, uma banda decorrente de acoplamento de plasmon aparece na faixa de 700 nm (com deslocamento batocrômico do máximo na medida em que a aglomeração aumenta), com diminuição da banda de LSPR original. Nanopartículas de ouro em forma de bastão (AuNRs) formam duas bandas localizadas de superfície, a transversal, como a esférica, e uma banda longitudinal. A banda longitudinal é mais intensa e corresponde à oscilação dos elétrons ao longo do eixo, e a transversal, que aparece na região do visível, com menor intensidade [8,16].

De acordo com o diâmetro e forma das AuNPs é possível obter variações nas bandas LSPR que podem ser constatadas pelo efeito visual das suas dispersões em termos de mudança de cor, indo do vermelho para o azul, sendo o tom azulado um indicativo de agregação nas nanopartículas [18].

Para explicar as mudanças de cor em dispersões aquosas coloidais de nanopartículas de ouro, Gustav Mie, em 1908, desenvolveu uma teoria [19] que propõem que, em dispersões diluídas, a quantidade de luz que chega ao detector de um espectrofotômetro não é influenciada exclusivamente pela fração de radiação absorvida, mas pela contribuição do coeficiente de extinção ( $\delta_{ext}$ ), que equivale à soma (Equação 1) da contribuição do coeficiente de absorção ( $\delta_{abs}$ ) e do coeficiente de radiação espalhada ( $\delta_{esc}$ ) [18,19].

$$\delta_{ext} = \delta_{abs} + \delta_{esc} \quad (1)$$

Um dos primeiros relatos sobre AuNPs está relacionado com o cálice de Lycurgus, no século IX A.C, objeto cuja cor aparente depende do ângulo de incidência da luz. A luz transmitida é de cor vermelha e a refletida é de cor verde [12]. Pode-se dizer que o estudo moderno mais importante sobre síntese de AuNPs foi o desenvolvido por Turkevich, em 1951. Em seus relatos encontram-se

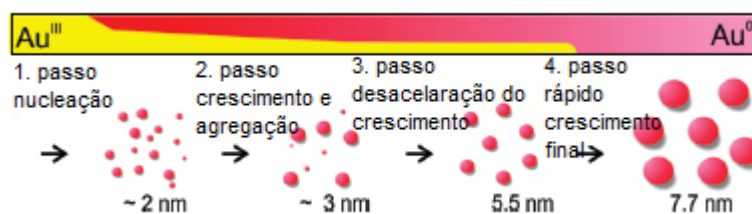
descritos os processos de nucleação e crescimento de AuNPs sintetizadas usando citrato de sódio como agente redutor. Turkevich obteve AuNPs com distribuição de tamanho entre 14 e 24 nm, modificando parâmetros como temperatura, concentração de citrato de sódio e tempo de reação [20].

As AuNPs podem ser preparadas por duas abordagens distintas, que em inglês são denominadas *top down* e *bottom up* [21]. No método *top down*, o ouro (Au) *bulk* (sólido maciço) é fortemente atacado e dividido até a obtenção de nanopartículas. Neste tipo de abordagem é difícil controlar o tamanho e a forma das nanopartículas formadas, para isto, se faz necessário utilizar-se de agentes estabilizantes [21,22], como exemplificado no trabalho de Kabashin *et al.* em 2009, que obtiveram AuNPs através da formação de sementes nanométricas iniciais (<10 nm) por ablação a laser de um alvo de ouro em soluções aquosas de biopolímeros, para estabilização. Estas sementes foram então irradiadas por um *supercontinuum* de luz branca induzida por laser de femtosegundo, o que iniciou o crescimento controlado de nanopartículas maiores [23].

Na abordagem *bottom up*, AuNPs individuais são formadas a partir de íons em solução por redução química ou biológica [24,25]. Este método é simples e permite o controle de vários tamanhos e formas para as AuNPs. Geralmente a síntese ocorre em duas etapas: (i) nucleação e (ii) crescimento sucessivo. O crescimento isotrópico espontâneo gera AuNPs na maior parte das vezes de forma esférica e o crescimento anisotrópico, geralmente forçado, gerará nanopartículas de forma variada [21]. Quando a nucleação e o crescimento não são concluídos no mesmo processo pode-se dizer que a síntese correu pelo método *seed growth* (crescimento de sementes), caso contrário, o processo é chamado crescimento *in situ*, que gera nanopartículas esféricas ou quase esféricas [24].

Os processos de nucleação e crescimento costumam acontecer em uma curta escala de tempo. Polte *et al.*, estudaram esses processos com AuNPs sintetizadas pelo método clássico de Turkevich e propuseram um mecanismo em três fases. Na primeira fase é um processo de rápida nucleação onde 20% da fonte de ouro (precursor) é transformado em núcleos ou partículas, com raio médio de 2 nm, já nos primeiros 60 s do processo. Nos 20 min seguintes, os núcleos começam a se fundir, numa taxa decrescente, devido ao consumo de ouro, formando nanopartículas com 4 nm. Na segunda fase, que dura de 25 a 50 min, o tamanho do raio das nanopartículas alcança 5,2 nm e a polidispersidade baixa bruscamente

e não há mais um significativo aumento no número de nanopartículas. Isto implica que o ouro está crescendo sobre as partículas por difusão, e que a fonte de ouro passa a ser o agente limitante dessa reação. Na terceira fase, dos 50 aos 70 min, ocorre um consumo rápido do restante dos íons precursores ( $\text{Au}^{3+}$ ), as nanopartículas continuam crescendo chegando a um raio médio final de 7,6 nm. Essas três fases podem explicar o fenômeno de nucleação e crescimento da síntese de AuNPs em quatro passos (Figura 2): i) formação de núcleos, ii) coalescência dos núcleos em partículas maiores, iii) lento crescimento e difusão de partículas, e iv) desaceleração do crescimento [26].



**Figura 2:** Esquema do processo de formação de nanopartículas de ouro. Adaptado de Polte *et al.* [26].

A síntese de AuNPs geralmente envolve a redução química do sal de ouro em uma fase orgânica ou aquosa, ou em duas fases [27]. Diferentes fontes de ouro podem ser utilizadas, como por exemplo, o ácido tetracloráurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) citado por Turkevich. Em seus estudos, Turkevich [20] também descreveu o método de Bredig, onde utilizando como fonte do metal eletrodos de ouro que colocados numa solução de hidróxido de sódio num potencial de 115 V, produziu nanopartículas com tamanhos variando de 3 a 10 nm. Em uma síntese típica, um sal de ouro (fonte de metal), como o cloreto de ouro (III), é reduzido pela adição de um agente que leva à nucleação de íons  $\text{Au}^{3+}$  a nanopartículas [28]. Nesse tipo de método químico de redução, o preparo de AuNPs inclui duas principais partes: a redução e a estabilização. Há uma variedade de agentes redutores descritos na literatura, como por exemplo, citratos, boro-hidretos, aminoboranos, formaldeído, hidrazina, hidroxilamina, polióis, ácidos cítrico e oxálico, açúcares, peróxido de hidrogênio, sulfitos, acetileno e complexos sanduíche de metais de transição ricos em elétrons [22,24]. Um fenômeno particular da redução química de ouro, em que o agente redutor é utilizado abaixo da quantidade necessária, é o efeito dicróico,

isto é, quando a luz é transmitida, uma cor é observada, e quando é absorvida verifica-se outra cor. Liu *et al.* [29], obtiveram AuNPs esféricas e dicróicas, pelo método *seed growth*, utilizando quantidades insuficientes de citrato de sódio, o que resultou em AuNPs na qual a cor laranja foi observada quando a luz era refletida, e a cor vermelha prevalecia quando a luz era transmitida.

Um método de redução fotoquímica foi estudado por Sau *et al.* [30], usando ácido ascórbico como agente redutor para obter AuNPs esféricas através do método *seed growth*. Os autores obtiveram AuNPs com uma ampla variação de diâmetros médio, que variaram de 5 a 110 nm.

Contrário de outras rotas sintéticas por redução, como a que usa citrato, o boro-hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) é um forte agente redutor que tem sido utilizado para obter AuNPs sem a necessidade de aquecimento. Isto faz com que as reações sejam mais rápidas, conforme descrito por Xu *et al.*, no qual foram obtidas AuNPs reduzidas por  $\text{NaBH}_4$ , em reações que duraram apenas 5 min [31].

### 1.2.2. Agentes capeantes em sistemas coloidais

A alta energia superficial das AuNPs, bem como a instabilidade termodinâmica, as tornam altamente reativas, fazendo com que ocorra agregação na ausência de proteção ou passivação das superfícies. Num sistema coloidal existem uma ou mais fases dispersas e um meio contínuo. Uma dispersão coloidal não é um sistema termodinamicamente estável, as partículas em um meio de dispersão são sempre submetidas ao movimento browniano com colisões frequentes entre elas. Quando forças atrativas dominam, as partículas se agregam e a dispersão pode desestabilizar, já quando as repulsivas dominam, o sistema permanecerá em um estado disperso [32].

Por conta desses fenômenos que tendem a desestabilizar as nanopartículas, as AuNPs geralmente são sintetizadas por redução química de sal de ouro na presença de um agente estabilizador (agente de proteção), que promove o recobrimento da superfície das nanoestruturas a fim de conferir aumento da estabilidade, e conseqüentemente decréscimo de agregação/aglomeração [27,33,34]. Como as forças de Van der Waals costumam levar à aglomeração das partículas em um sistema coloidal, a presença de uma substância estabilizadora é



essencial para se alcançar a estabilidade das AuNPs, para que essas sejam repelidas entre si. Isso é alcançado por repulsão eletrostática com recobrimento de espécies que adquirem carga em solução ou recobrimdo a superfície das AuNPs com uma camada adsorvida de moléculas compatíveis com o solvente usado como dispersante [32]. Ou seja, AuNPs podem ser estabilizadas tanto por íons, quanto por moléculas orgânicas, desde que ambos estejam recobrimdo as superfícies das nanopartículas [35].

Os agentes de recobrimento além de conferir estabilidade podem ser usados para modelar propriedades das AuNPs, sendo o ajuste da concentração destes útil para impactar no diâmetro médio destas. A literatura reporta diversos compostos orgânicos que são utilizadas como agentes de recobrimento, como por exemplo, tióis, dissulfetos, tioéteres, ditioésteres, ditiocarbamatos, ditiocarbonatos/ tritiocarbonatos, aminas e aminoácidos e também compostos mais complexos, como polímeros, peptídeos, proteínas, DNA, dendrímeros, surfactantes entre outros [36].

De acordo com o agente de recobrimento, o processo de estabilização também muda. Um exemplo é descrito por Liu *et al.* [37], que obteve a estabilização das AuNPs com diferentes agentes de recobrimento: (i) estabilizadas com citrato (através de interações eletrostáticas entre o ligante e as nanopartículas); (ii) estabilizadas com 1-decanotiol (estabilização por ligação covalente entre os grupos tiolato e a superfície dos átomos de ouro), e (iii) estabilizadas por olefilamida (na qual ocorre estabilização por ligação de hidrogênio através dos grupos amina da estrutura da olefilamida).

### 1.2.3. Surfactantes

Os surfactantes representam uma classe de compostos que tem sido utilizada para fazer o recobrimento de AuNPs devido ao seu alto poder de dispersão. Um surfactante (uma contração do termo *surface active agent*) é uma substância que tem a capacidade de se adsorver nas superfícies do sistema e mudar a energia livre entre as interfaces [38].

Os surfactantes têm uma estrutura anfipática, que é caracterizada por uma estrutura molecular onde há um grupo que tem pouca atração pelo solvente,

conhecida como o grupo liofóbico, juntamente com um grupo que tem forte atração pelo solvente, chamado de grupo liofílico [38]. O termo "cabeça" refere-se ao grupo de solubilização (grupo liofílico ou hidrofílico em sistemas aquosos) e a "cauda" que se refere ao grupo liofóbico (hidrofóbico em sistemas aquosos) assim, as moléculas de surfactante em sistemas aquosos têm uma parte apolar (cauda hidrofóbica) e uma parte polar (cabeça hidrofílica) [39,40].

O grupo hidrofóbico é geralmente um hidrocarboneto de cadeia longa, embora haja casos em que se têm hidrocarbonetos fluorados ou oxigenados, ou cadeias de siloxano. Por outro lado, o grupo hidrofílico do tipo iônico ou altamente polar pode conferir solubilidade em água. A classificação química referente aos tipos de surfactantes é fundamentada na natureza do grupo hidrofílico, com subgrupos baseados na natureza do hidrófobo ou cauda. As quatro classes básicas de surfactantes são definidas da seguinte forma, de acordo com a sua dissociação em solução aquosa: (I) Aniônicos – A porção de superfície ativa da molécula tem uma carga negativa, como por exemplo, estruturas do tipo  $\text{RCOO}^-\text{Na}^+$  (sabão) e o alquilbenzeno sulfonato; (II) Não iônico - A porção de superfície ativa da molécula não possui carga iônica aparente, a exemplo dos monoglicerídeos de ácidos graxos de cadeia longa como alquilfenol polioxietilenado e álcool polioxietilenado; (III) Catiônicos - A porção de superfície ativa tem uma carga positiva, como exemplos, sais de aminas de cadeia longa, cloreto de amônio quaternário e (IV) Anfóteros ou Zwitterionicos - Ambas as cargas, positivas e negativas, podem estar presentes na porção de superfície ativa, como por exemplo, aminoácidos de cadeia longa e sulfobetaina [38–40].

Conforme mencionado, uma maneira de se controlar o diâmetro das AuNPs é por meio de agentes estabilizantes [39]. Kwon *et al.* [41] relataram que através da síntese de AuNPs (pelo método *seed growth*), recobertas usando meios com diferentes concentrações de surfactante, foi possível obter nanopartículas com diferentes diâmetros. Neste estudo, os autores chamaram atenção para a relação da banda LSPR com os diâmetros médios das AuNPs. As referidas bandas tiveram valores máximos de comprimentos de onda variando entre 527 e 582 nm e diâmetros médios na faixa de  $11,0 \pm 0,8$  a  $87,3 \pm 12,1$  nm, respectivamente. Consequentemente, diferentes surfactantes também geram AuNPs com diâmetros distintos, mesmo quando estes se apresentam na mesma concentração, conforme relatado por Kazakova *et al.* [42]. Neste estudo AuNPs foram produzidas com

citrato de sódio na presença do surfactante catiônico cloreto de cetiltrimetilamônio (CTACl), ou do aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS). Acima da concentração micelar crítica (CMC), as maiores AuNPs foram obtidas com CTACl (142 nm), em contrapartida, na presença de SDS a maior dimensão não passou de 28 nm. Isto indica que as interações com o surfactante catiônico devem ser favorecidas quando comparadas com o surfactante aniônico, uma vez que o CTACl interage diretamente com as cargas negativas (proveniente do citrato) ao redor das AuNPs.

Outro exemplo do controle do tamanho de AuNPs pelo uso de surfactantes está descrito no trabalho de Cadorin *et al.* [43] que estabilizaram AuNPs reduzidas por boro-hidreto de sódio em micelas reversas de surfactante zwitteriônico 3-(1-tetradecil-3-imidazólio) propanossulfonato, obtendo nanopartículas aproximadamente esféricas com diâmetro médio de  $4,35 \pm 1,51$  nm.

Como mencionado, a CMC representa um valor de concentração intrínseco de cada surfactante, em condições específicas, em que certas propriedades da solução mudam drasticamente por conta da formação de agregados de surfactante ou micelas. Por exemplo, em água, os grupos hidrofóbicos do surfactante concentram-se na superfície do solvente, diminuindo a energia da solução. Quando a concentração de surfactante aumenta de tal forma que satura a superfície da solução, a fim de manter uma baixa energia livre no sistema, formam-se agregados moleculares (micelas) que, no caso de soluções aquosas são estruturas que abrigam em seu interior a cauda hidrofóbica do surfactante, evitando o contato da mesma com a parte hidrofílica da solução aquosa [38,40]. O processo de formação de micelas representa uma automontagem espontânea [44].


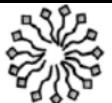








Ao contrário dos surfactantes catiônicos de cauda única, como o CTACl, os surfactantes catiônicos de duas caudas não tendem a formar micelas esféricas simples, mas sim micelas na forma de vesículas. Este fato se deve ao impedimento geométrico de agregação que impede que esse tipo de surfactante formem agregados fechados simples, formando estruturas como vesículas, que se estendem para bicamadas [40]. Portanto, para surfactantes com duas ou mais caudas, denomina-se concentração vesicular crítica (CVC), em vez de CMC, embora haja em algumas referências, tais como a de Subramaniam *et al.* [32], a

designação de CMC para o surfactante de duas caudas brometo de didecildimetilamônio.

Embora seja adotado que o raio da região interna de uma micela é igual ao comprimento da cadeia, que contém os grupos hidrofóbicos totalmente estendida, as micelas podem conter determinada quantidade de solvente no interior de sua estrutura. Assim, entende-se que o raio possui na verdade dois núcleos, um que contém os grupos hidrofóbicos onde a água penetrou, e um núcleo mais profundo, onde a fase aquosa é totalmente excluída. O volume  $V_H$ , ocupado pelos grupos hidrofóbicos no núcleo micelar, o comprimento do grupo hidrofóbico no núcleo,  $l_c$ , e a área transversal,  $a_0$ , ocupada pelo grupo hidrofílico na interface da solução micelar são usados para calcular (pela Equação 2) o "parâmetro de empacotamento" (P) do inglês *packing parameter*, que é um modelo que descreve o comportamento de automontagem dos surfactantes em concentrações acima da CMC. Na Tabela 1 são mostradas as possibilidades de forma de organização de micelas de acordo com o valor de P [38].

$$P = V_H / l_c a_0 \quad (2)$$

**Tabela 1:** Relação do parâmetro de empacotamento com organização do meio. Adaptado de Rosen e Stuart & Boekema [38,45].

Valor de P	Estrutura da Micela	Estrutura	
$0 - \frac{1}{3}$	Esferoidal em meio aquoso		
$\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$	Cilíndrica em meio aquoso, haste		
$\frac{1}{2} - 1$	Bicamadas, vesículas		
$\sim 1$	Bicamadas planares, lamelar		
$> 1$	Micelas reversas (invertidas) em meio apolar		

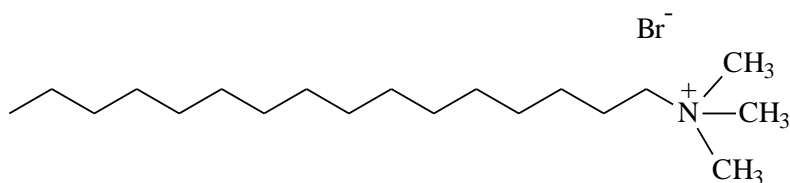
Em soluções de surfactantes iônicos contendo eletrólitos, o  $a_0$  diminui porque interfere na dupla camada elétrica. Assim, com aumento na concentração do surfactante iônico, aumenta também a concentração de íons na solução. Esta diminuição no valor de  $a_0$  promove mudança na forma da micela de esférica para cilíndrica [38].

Além dos surfactantes de uma e duas caudas, há também os do tipo *gemin*i (surfactantes com dois grupos hidrofílicos e dois ou três grupos hidrofóbicos na molécula) [38]. Xu *et al* [31], demonstraram que surfactantes *gemin*i também podem recobrir a superfície de AuNPs. Todavia, em baixas concentrações (por exemplo,  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) os agregados adsorvidos na superfície das AuNPs podem estabelecer pontes para ligar nanopartículas, o que resulta na formação de estruturas maiores, sendo a concentração de surfactante de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> a menor capaz de produzir nanopartículas estáveis. Provavelmente porque abaixo da CMC as atrações entre as AuNPs se tornam muito fortes, assim as moléculas livres de surfactante podem então atuar como uma espécie de "cola", permitindo a fusão das nanopartículas, gerando agregação.

#### 1.2.3.1. Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

O uso de surfactantes em sínteses de AuNPs pode habilitar não apenas o controle do tamanho e na estabilidade, mas também na forma das nanopartículas [29]. Miranda-Andrades *et al.* [46], produziram AuNRs através da metodologia *seed grow* utilizando o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). As AuNRs obtidas apresentaram comprimentos de onda máximo das bandas LSPR transversal e longitudinal em 516 nm e 662 nm respectivamente.

O CTAB (Figura 3) é um surfactante catiônico no qual a carga positiva encontra-se localizada sobre o átomo de nitrogênio, tendo o brometo como contra íon, e um valor de CMC em torno de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> [47]. Este surfactante forma micelas esféricas ou esferoidais (conforme visto na Tabela 1) com parâmetro de empacotamento em torno de 1/3, e diâmetro entre 2 a 3 nm. Porém quando a concentração de CTAB estiver acima de  $2,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> há uma transição no formato das micelas de esferoidal para “haste” [48].

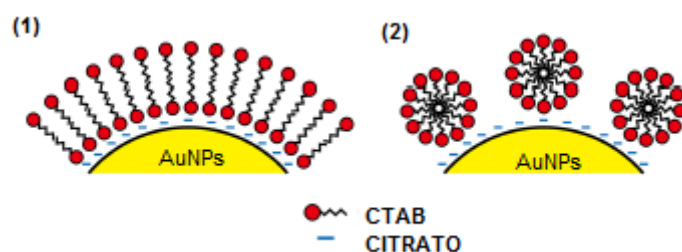


**Figura 3:** Estrutura química do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).

O uso do CTAB como agente de recobrimento de AuNPs é bem difundido na literatura. Em 2013, Khan *et al.* [9], estudaram a modificação das características das AuNPs em relação à concentração do CTAB (variando de  $5,0 \times 10^{-4}$  a  $4,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), tendo como agente redutor o ácido ascórbico. Os autores verificaram que a morfologia das AuNPs foi afetada pela concentração de CTAB, principalmente antes e depois de atingir a CMC. A cor das dispersões obtidas mudou de roxo escuro para roxo claro, com aumento da concentração de surfactante, por outro lado, correu a diminuição da intensidade da banda LSPR, acompanhada do deslocamento batocrômico decorrente da diminuição do diâmetro médio das AuNPs. Constatou-se que o surfactante tem uma forte influência nas fases de obtenção das AuNPs (redução, nucleação e crescimento), atrasando-os significativamente com o aumento na concentração de CTAB. O CTAB protege as AuNPs porque interrompe o processo de crescimento atuando como agente de cobertura [49].

No ano seguinte, outro trabalho que também relacionou a síntese de AuNPs com a concentração de CTAB foi descrito por Lim *et al.* [11], no qual foi utilizado citrato de sódio como agente redutor para formar as nanopartículas. Todavia quando CTAB foi adicionado ao meio, na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, ocorreu a agregação das nanopartículas. Isso ocorreu provavelmente porque a parte polar do surfactante livre se ligou as AuNPs recobertas com citrato (negativamente carregados), removendo as cargas da superfície, o que levou ao colapso das nanopartículas. Demais adições de CTAB ao meio contendo AuNPs foram investigadas até concentrações próxima, e acima da CMC, de modo que as nanopartículas foram estáveis nessas condições. De acordo com experimentos de potencial zeta, constatou-se que os grupos catiônicos das cabeças do surfactante ficaram voltados para fora nas dispersões, o que já era de se esperar. Portanto, os autores fizeram duas propostas para exemplificar como seriam as nanoestruturas (Figura 4). Na primeira há a possibilidade de formação de bicamadas

(estabilização por bicamada) onde as cabeças hidrofílicas ligam-se aos ânions citrato ao redor da superfície das AuNPs, assim, devido as interações hidrofóbicas as cadeias alquílicas do CTAB formam uma bicamada. Na segunda proposta, as micelas carregadas positivamente (estabilização por micelas) recobririam as superfícies das AuNPs através das interações com os íons citrato, sendo esta última a que os autores julgaram ser a mais plausível, devido as micelas esféricas (esferoidais) serem a forma assumida por esse surfactante em concentrações acima da CMC. Medições por microscopia eletrônica de transmissão em situação de criogênia mostrou micelas esféricas de CTAB circundando AuNPs recobertas por citrato.



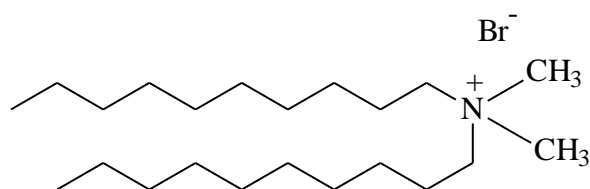
**Figura 4:** Propostas de estabilização de AuNPs por CTAB acima da CMC (1) estabilização em bicamadas (2) estabilização em micelas. Adaptado de Lim *et al.* [11].

Um dos relatos mais antigos (do ano de 1999) e que cita CTAB na síntese de AuNPs, é o descrito por Seip e Connor [50]. Neste trabalho, nanopartículas de ferro revestidas com ouro foram sintetizadas em meio aquoso e na presença de CTAB, usando hidrazina como agente redutor. Nanopartículas com aproximadamente 15 nm e com revestimento de ouro, de espessura em torno 2,5 nm, foram obtidas. Além das referências que já foram citadas, existem diversos trabalhos na literatura relacionados com síntese AuNPs revestidas por CTAB, e um dos mais citados é o de Nikoobakht e El-sayed [51] em 2003, no qual nanobastões são preparados a partir do método de *seed grow*, utilizando como agente redutor o ácido ascórbico. A fim de melhorar a reprodutibilidade dos nanobastões foi utilizado CTAB na dispersão semente, produzindo então partículas com diâmetros que variaram de 7 a 12 nm.

### 1.2.3.2.

#### Brometo de didecildimetilamônio (C10DAB)

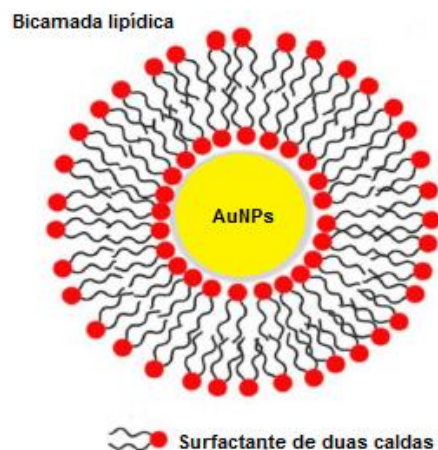
O brometo de didecildimetilamônio (C10DAB) é um surfactante catiônico de cauda dupla e que contém 10 átomos de carbono por cauda. O C10DAB, cuja estrutura química está representada na Figura 5, é um surfactante comercial, com CVC de  $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , é um sal de alquildimetilamônio utilizado, como agente antimicrobiano, em vários produtos comerciais [32,52–54]. Não foi encontrado na literatura o parâmetro de empacotamento para o C10DAB, todavia, para o brometo de dodecildimetilamônio (C12DAB) o valor do parâmetro é de 0,62, sugerindo, de acordo com a Tabela 1, que vesículas são formadas [55].



**Figura 5:** Estrutura química do brometo de didecildimetilamônio (C10DAB).

Até o presente momento não há relatos na literatura relacionados com síntese de AuNPs capeadas com C10DAB, porém há trabalhos relatando o uso de surfactantes catiônicos de duas caudas, como por exemplo C12DAB, que podem dar uma ideia geral sobre o assunto. Zhang *et al.* [56], sintetizaram AuNPs recobertas com C12DAB na concentração de  $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (dentro da ordem de grandeza da CVC), por redução química *in situ* utilizando  $\text{NaBH}_4$ . As AuNPs obtidas foram esféricas e mostraram banda LSPR em 521 nm, com diâmetros variando de 7 a 11 nm, e recobertas por uma dupla camada lipídica de C12DAB (Figura 6). Os autores comprovaram que as nanopartículas formadas eram hidrofílicas devido às estruturas em bicamadas, formando vesículas encapsuladoras, ficando as partes hidrofílicas voltadas tanto para a nanopartícula, quanto para o meio aquoso.





**Figura 6:** AuNPs capeadas por uma dupla camada lipídica de surfactantes. Adaptado de Luchini e Vitiello [57].

Outro trabalho relevante com surfactantes catiônicos de duas caudas foi descrito por Nooney *et al.* [58], que sintetizaram nanopartículas de sílica esféricas recobertas por C10DAB ou C12DAB, utilizando AuNPs de 25 nm de diâmetro, sintetizadas pelo método de Turkevich, como sementes. Desta forma os autores obtiveram partículas com dimensões entre 54 e 590 nm de diâmetro.

#### 1.2.4. Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeo (AMG) representa um grupo de substâncias que possuem potencial antibiótico. São derivadas de açúcares unidos por ligações glicosídicas à hexose ou aminociclitol geralmente na posição central. Por essa razão os AMGs também são chamados por aminociclitóis. Na estrutura química de AMG há grupos pertencentes à função orgânica amina, que ao serem protonados formam sais orgânicos que são solúveis em água [59,60].

Em 1944, a estreptomicina foi descoberta através do isolamento de uma cepa de *Streptomyces griseus*, sendo o primeiro AMG descoberto, e segundo antibiótico a ser utilizado no tratamento da tuberculose. A partir daí a descoberta de diversos AMGs foi relatada: neomicina (1949), canamicina (1957), paromomicina (1959), gentamicina (1963), tobramicina (1968), ampicacina (1972), netilmicina (1975), entre outros [1,59,60].

AMGs exibem um vasto espectro de ação, apresentando atividade sobre bactérias aeróbias Gram-negativas, e moderada ação contra bactérias aeróbias de

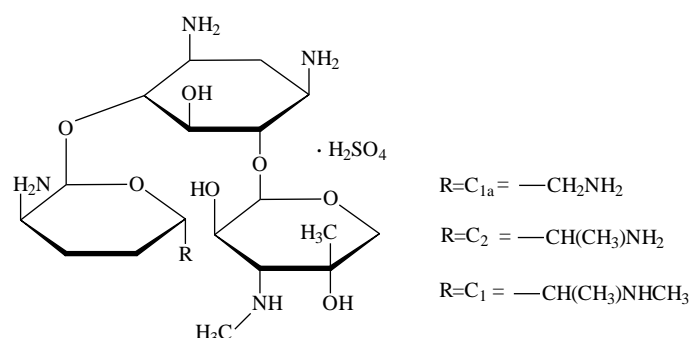
Gram-positivas [61]. Estes antibióticos são utilizados principalmente no tratamento de infecções causadas por *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Serratia*, *Citrobacter* e *Providencia* [59]. O mecanismo de ação dos AMGs é o mesmo, agindo principalmente numa função bactericida ao se ligarem ao ribossomo bacteriano, mas também podem agir como drogas bacteriostáticas, impedindo o crescimento da população de bactérias [59,60].

Dentre os efeitos adversos dos AMGs podem ser citados o de natureza irritante (quanto ao uso tópico), tóxica e de hipersensibilidade. A toxicidade se manifesta por nefrotoxicidade e ototoxicidade (perda auditiva relacionada com a dose do antibiótico) [59,62]. A ocorrência de ototoxicidade e de nefrotoxicidade é mais incidente quando o tratamento permanece por mais de cinco dias, em doses elevadas, sendo os grupos de idosos, e o de portadores de insuficiência renal, classificados como de risco [62].

A seguir, informações importantes de três importantes AMGs são apresentadas: (I) Estreptomicina – AMG de origem natural apresenta-se na forma de sulfato, possui ação bacteriostática, porém é predominantemente bactericida, tendo seu poder de ação duas vezes maior em relação à ação bacteriostática. Embora tenha ação sobre vários bacilos Gram-negativos, a estreptomicina é empregada principalmente, nas infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis* e, em associação com penicilinas, nas infecções causadas por estreptococos do grupo viridans e por enterococos; (II) Tobramicina - AMG também de origem natural, obtido através de culturas de *Streptomyces tenebrarius*, sendo apresentada sob a forma de sulfato. Sua ação predomina sobre os bacilos Gram-negativos, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa*, além da atuação sobre estafilococos e sobre o gonococo. Não tem boa ação quando utilizado contra os estreptococos. (III) Amicacina – AMG semissintético, sendo derivado da canamicina (AMG oriundo de fonte natural) e que também se apresenta sob a forma de sulfato. Suas propriedades antimicrobianas são distintas em relação às dos demais membros da sua classe por ser resistente à inativação pela maioria das enzimas produzidas por enterobactérias e por *Pseudomonas aeruginosa* [59]. A seguir serão descritos os AMGs escolhidos como moléculas alvo nessa dissertação.

### 1.2.4.1. Gentamicina

O sulfato de gentamicina é um antibiótico de origem natural, obtido a partir das espécies do fungo *Micromonospora purpúrea* ou *M. echinospora*. Esse AMG representa um complexo formado por três antibióticos principais denominados gentamicina, e diferenciados por C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub> e C<sub>2</sub>, conforme visto na Figura 7, e que apresentam (os três combinados ou cada um isoladamente) as mesmas propriedades farmacológicas e efeitos tóxicos. A massa molar média é de aproximadamente 563 g mol<sup>-1</sup> utilizando como base a proporção dos componentes fornecidas pelo fabricante (Sigma-Aldrich): C<sub>1</sub>(<45%) como componente majoritário, seguido por C<sub>1a</sub>(<35%) e de C<sub>2</sub>(<30%) [63]. O valor do de pK<sub>a</sub> 8,4 é o referente ao C<sub>1a</sub>, o ponto de fusão varia de 218 a 237 °C (composto orgânico neutro e não na forma de sulfato), sendo a solubilidade em água, na temperatura ambiente, em torno de 50 mg mL<sup>-1</sup> [59,63,64].



**Figura 7:** Estruturas químicas que representam o complexo sulfato de gentamicina C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub> e C<sub>2</sub>.

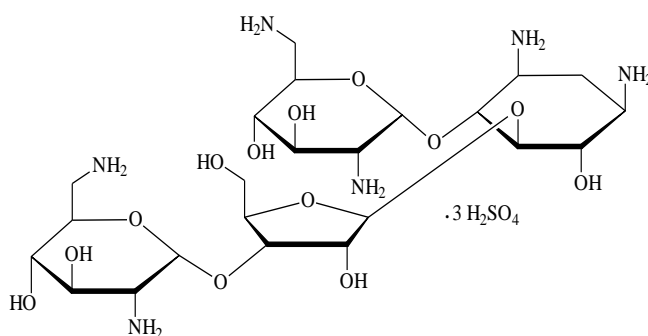
Descoberta em 1963, o sulfato de gentamicina representou um grande avanço para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos [65]. Utilizada para tratar principalmente infecções hospitalares, onde se podem encontrar bactérias Gram-negativas resistentes a uma série de outros AMGs. Sulfato de gentamicina e sulfato de tobramicina são os aminociclitolis que apresentam a maior atividade contra *Enterobacteriaceae* e *P. Aeruginosa*. Além da ação eficaz contra bacilos Gram-negativos, seu espectro de ação também é eficiente no combate a estafilococos, no tratamento de sepses, infecções urinárias, infecções respiratórias, peritonites, infecções biliares e intra-abdominais, entre

outras [59,65]. Também é amplamente utilizado no tratamento de mastites no gado leiteiro [66].

Embora o uso do sulfato de gentamicina seja bem difundido, o mesmo deve ser feito de maneira moderada, respeitando-se a dosagem máxima recomendada, principalmente em tratamentos prolongados, devido aos seus efeitos tóxicos como nefrotoxicidade e ototoxicidade [66].

#### 1.2.4.2. Neomicina

O sulfato de neomicina é um AMG que possui ação bactericida contra estreptococos, estafilococos, enterobactérias e micobactéria. O sulfato de neomicina é um AMG complexo de origem natural, produzido por *Streptomyces*, formado por três constituintes: A, B e C, sendo o constituinte B (Figura 8) o componente principal (aproximadamente 85%). Assim como o sulfato de gentamicina, o sulfato de neomicina também se apresenta comercialmente na forma de sulfato, mais propriamente dito trissulfato, com  $pK_a$  de 12,9 [59,63,67]. Possui massa molar de aproximadamente  $909 \text{ g mol}^{-1}$ , com solubilidade em água a temperatura ambiente de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  [63].



**Figura 8:** Estrutura química do sulfato de neomicina (componente principal).

O sulfato de neomicina é um AMG que no Brasil é administrado somente por via oral ou tópica, não podendo ser administrado por via parenteral (intravenosa) devido a maior toxicidade em comparação aos demais AMGs. Sulfato de neomicina apresenta como efeitos adversos à acentuada nefrotoxicidade e ototoxicidade, levando à surdez irreversível. No tratamento de infecções

intestinais, a dose recomendada é de 30 a 50 mg/kg/dia em intervalos de 6 h. Em uso tópico, pode ser administrada sob a forma de pomadas, cremes e soluções, para tratar feridas superficiais infectadas, conjuntivites e otites externas causadas por estafilococos. Náuseas, vômitos e diarreia também podem ser provocados em casos de hiperdosagem por via oral, embora nessa forma de administração, a absorção de sulfato de neomicina seja de no máximo 3%. Já no uso tópico, manifestações de hipersensibilidade podem surgir devido a maior absorção, gerando riscos de toxicidade renal ou auditiva. [59].

### **1.2.5. Métodos de quantificação de AMGs utilizando nanopartículas de ouro**

A quantificação de antibióticos é de suma importância para minimizar a exposição humana de resíduos destes por conta do consumo de alimentos de origem animal de água ou a partir do solo que contamina os alimentos de origem vegetal. Adicionalmente, métodos simples são úteis como alternativas para realização do controle de qualidade de formulações farmacêuticas [68].

Existem algumas dificuldades para a utilização de métodos analíticos tradicionais para quantificação de AMGs (na forma de sulfato), como por exemplo, o fato de serem compostos altamente polares, devido forma poliônica quando em soluções aquosas, gerando dificuldade em métodos de extração. Além disso, não apresentam grupos cromóforos relevantes e não são fluoróforos a ponto de habilitar a detecção direta destes por métodos baseados nas espectrofotometrias de absorção no UV-Vis, na espectrometria de fluorescência e na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção óptica [68].

A quantificação indireta de AMGs através do uso de AuNPs tem se tornado uma alternativa significativamente relevante quando comparada aos métodos tradicionais de detecção indireta (através de derivatização ou por imunoensaio). Alguns dos trabalhos mais emblemáticos são citados a seguir.

A interação entre AuNPs e AMGs foi primeiramente estudada com objetivos biológicos, ao se avaliar que as propriedades antibióticas dos AMGs se intensificavam quando associados às AuNPs. Os cientistas viram vantagem nessa associação devido a biocompatibilidade, natureza não tóxica e estabilidade das

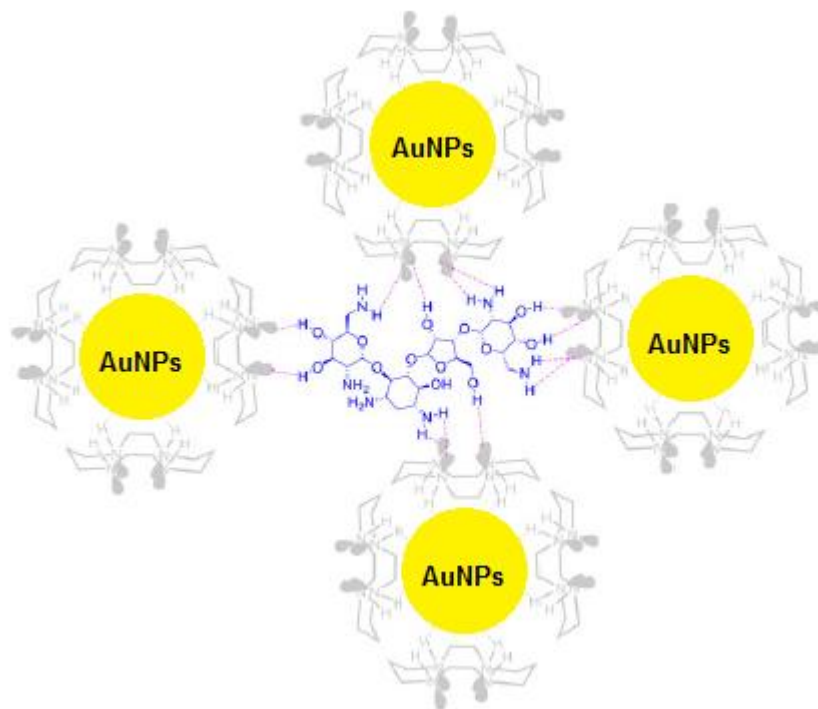
AuNPs, permitindo a aplicação em diversas áreas, principalmente na biomedicina, por exemplo, visando a entrega seletiva de fármacos no organismo [7].

Para explicar melhor essa interação é importante citar o estudo pioneiro de Grace e Pandian [69], em 2007, no qual se avaliou o uso de AuNPs para o transporte de drogas. AuNPs, com diâmetros entre 12 - 15 nm, foram obtidas a partir do uso de ácido cloroáurico reduzido com citrato de sódio tribásico em meio aquoso. Sulfato de estreptomicina, sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina foram colocadas na presença de AuNPs, sob agitação, por duas horas. Os resultados indicaram que mesmo em baixas concentrações de AMG ( $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) foi possível verificar interação com as AuNPs devido à grande área superficial das nanopartículas na dispersão, que facilita a adsorção dos AMG. Foi observado também que quanto maior a concentração do antibiótico no meio, maior foi o grau de agregação nas AuNPs, constatada pela formação do complexo AuNPs-AMG que produziu mudança de cor das dispersões de vinho para azul na medida em que houve incremento de AMG no sistema. Adicionalmente, detectou-se modificação na frequência de estiramento das ligações do grupo NH<sub>2</sub> no espectro de infravermelho, indicando que a interação entre antibiótico e AuNPs está diretamente relacionada com os grupos amino presentes nos AMGs.

Dois anos depois, Wang *et al.* [70], desenvolveram um método para determinação de AMGs (paromomicina, canamicina A, neomicina, gentamicina e apramicina) por espectrometria de massa com dessorção à laser utilizando como sonda nanopartículas de prata, preparadas pelo método *seed growth*, usando AuNPs, reduzidas por citrato de sódio, como sementes para o crescimento de um recobrimento de prata. Os AMGs se adsorveram através de atração eletrostática à superfície das nanopartículas. O método apresentou LD (limite de detecção) da ordem de  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e foi aplicado em amostras fortificadas de plasma humano após desproteinização. As recuperações obtidas foram próximas a 80%. Em 2013, Wang *et al.* [71] desenvolveram um método colorimétrico baseado no uso AuNPs, obtidas na presença de citrato, almejando a determinação de canamicina em formulações injetáveis comerciais. O monitoramento absorciométrico foi feito a partir da razão dos valores de extinção medidos em 656 e 519 nm ( $A_{656}/A_{519}$ ), originando dois intervalos de faixas lineares: de 3,7 ng mL<sup>-1</sup> até 42 ng mL<sup>-1</sup> e de 44 ng mL<sup>-1</sup> até 99 ng mL<sup>-1</sup>, com LD de 0,9 ng mL<sup>-1</sup>. As recuperações encontradas na aplicação do método foram próximas a 100%.

No mesmo ano, Apyari *et al.* [72] desenvolveram um método colorimétrico para determinar neomicina em soluções tópicas oftálmicas após diluídas em água. AuNPs foram utilizadas como sonda na presença de etilenodiaminotetracetato dissódico ( $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), para uma melhor sensibilidade do método. A faixa linear do método foi de 30 a 40 ng mL<sup>-1</sup> e o LD foi de 28 ng mL<sup>-1</sup>, através do monitoramento dos valores de extinção medidos em 520 e 700 nm ( $A_{700}/A_{520}$ ). As recuperações foram próximas de 100%. Em 2014, Santos, *et al.* [73], usaram AuNPs reduzidas por citrato de sódio monobásico visando a determinação espectrofotométrica de sulfato de tobramicina em soluções oftálmicas. O método habilitou o monitoramento da variação dos sinais líquidos (extinção) em 529 nm, com faixa linear de  $6,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , e em 681 nm com faixa linear de  $4,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Vale ressaltar que também foi possível determinar sulfato de tobramicina, em amostras simuladas na presença de sulfato de estreptomicina, pois este último não interagiu com a sonda nas faixas lineares típicas para o sulfato de tobramicina.

No ano seguinte, Yeluri *et al.* [74], detectaram sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina utilizando, como sonda analítica, AuNPs revestidas com 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano, produzidas pela redução com citrato de sódio. Essas nanopartículas se agregam na presença dos AMGs, resultando em uma mudança de cor de violeta para azul, justificada pela mudança nos comprimentos de onda máximo da banda LSPR de 530 nm para 660 nm. O método habilitou valores de LD de  $1,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  para neomicina e gentamicina, respectivamente. A proposta de interação entre neomicina e as AuNPs apresentada pelos autores, está esquematizada na Figura 9, onde se indica que apenas átomos de nitrogênio endocíclicos do agente capeante estão disponíveis para interagir e complexar com neomicina, através de ligação de hidrogênio. Visto que na estrutura química da neomicina há vários grupamentos amino ( $-\text{NH}_2$ ) e hidroxila ( $-\text{OH}$ ), estes habilitam a interação com o agente de recobrimento, o que resulta na agregação das AuNPs.



**Figura 9:** Esquema mostrando uma possível interação entre AuNPs revestidas com 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano e neomicina. Adaptado de Yeluri *et al.* [74]

Ainda em 2015, Miranda-Andrades *et al.* [46], investigaram a influência do sulfato de gentamicina no comportamento óptico das AuNPs esféricas, e também das AuNRs. Os resultados indicaram que para nanopartículas esféricas a interação com gentamicina gerou aglomeração (com consequente aparecimento de uma banda de agregação gerada pela ressonância entre AuNPs que ficam mais próximas. A intensidade dessa banda foi proporcional ao aumento concentração do AMG (3,8 a 57,6 ng mL<sup>-1</sup>), sendo o monitoramento feito em 526 nm. Por outro lado, a sonda de nanobastões apresentou duas bandas LSPR, com comprimentos de onda máximo de 516 e 662 nm. Todavia, na presença de gentamicina a resposta mais sensível (na mesma faixa de concentração descrita acima) foi obtida monitorando-se o sinal em 662 nm. A aglomeração também causou o decréscimo das bandas LSPR originais das nanopartículas. As respostas ópticas das AuNPs e das AuNRs habilitaram a determinação de gentamicina em amostras de medicamento veterinário, com recuperações que variaram de 94 a 98%.

Mais recentemente, Jiang *et al.* [75], desenvolveram um método baseado em espectroscopia Raman para detecção de canamicina em amostras de leite. Nanopartículas bimetálicas de ouro e prata, ligadas a DNA de cadeia dupla, foram



desenvolvidas para funcionar como uma plataforma de detecção. O método apresentou seletividade, tendo um valor de LD de  $9,0 \times 10^{-11} \text{ g mL}^{-1}$  cobrindo uma faixa linear de até  $1,0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ , e com recuperações de 90,4 a 112% em amostras de leite integral líquido fortificadas com os analitos. As amostras de leite fortificadas foram desproteinizadas utilizando ácido clorídrico ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) na proporção 1:1 em relação ao leite, sendo na sequência aquecidas a  $60^\circ\text{C}$  por 30 min, centrifugadas e filtradas.

#### 1.2.5.1.

##### **Quantificação de gentamicina em leite e em outras amostras**

O leite é bastante complexo em termos de constituição (matriz complexa) o que representa um desafio para em termos de análises de componentes traço como contaminantes orgânicos. Um pré-tratamento das amostras é usualmente requerido de forma a eliminar gordura, proteínas, açúcares, e outros componentes que interferem nos métodos analíticos. A desproteínização é um dos processos mais importantes nesse caso, cujo objetivo é limpar a matriz do leite e minimizar interferências na determinação dos analitos. Em geral a desproteínização é alcançada pela adição de solventes orgânicos, ácidos diluídos e sais [76,77]. Outras abordagens como digestão da amostra, extração líquida e extração em fase sólida, também são muito utilizadas para viabilizar aplicações de métodos analíticos, porém, invariavelmente, a carga de proteínas deve ser minimizada previamente à aplicação da maioria dessas abordagens. [78].

Em 1997, Kijak *et al.* [79], separaram, identificaram e quantificaram as gentamicinas  $C_{1a}$ ,  $C_{2a}$ ,  $C_2$  e  $C_1$  em amostras de leite (enriquecidas com sulfato de gentamicina) usando HPLC com detecção fluorimétrica ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 340/430 \text{ nm}$ ) após derivatização do AMG com *o*-ftalaldeído (OPA). O LD alcançado foi de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  referente a quantificação total das gentamicinas. As amostras de leite fortificadas foram tratadas com ácido tricloroacético a fim de habilitar a desproteínização, e os resultados indicaram recuperações entre 72 e 88 %. Quatro anos depois, Van *et al.* [80], avaliaram métodos de determinação de AMG por imunoensaios acoplados a sistemas de injeção em fluxo e com detecção eletroquímica visando obter um método para sulfato de gentamicina que pudesse ser utilizada em campo. Um pré-tratamento de amostra em linha, usando

cartuchos descartáveis, permitiu se quantificar um mínimo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de sulfato de gentamicina em amostras de leite, em menos de 10 min.

Em 2013, Wang *et al.* [81], propuseram um método para determinar (sulfatos de) gentamicina, amicacina e tobramicina utilizando AuNPs como sonda analítica. Monitorando-se a razão dos sinais (extinção) medidos em 518 e 636 nm ( $A_{635/518}$ ) foi possível obter faixas lineares de 2,6 a 34 ng mL<sup>-1</sup> (gentamicina); 13 a 67 ng mL<sup>-1</sup> (amicacina) e 20 a 180 ng mL<sup>-1</sup> (tobramicina) e com valores de LD que variaram de 0,3 a 1 ng mL<sup>-1</sup>. Uma das aplicações do método foi a determinação de sulfato de gentamicina em amostras de leite (amostras fortificadas), sendo necessário fazer o pré-tratamento das mesmas, o que resultou em recuperações de 96,3% a 104,8%. O pré-tratamento foi realizado com adição de ácido tricloroacético, seguido de centrifugação e filtração. No ano seguinte, Young *et al.* [82], utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massa (UPLC-MS do inglês *ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection*), desenvolveram um método de análise de multi-resíduos de aminoglicosídeos em amostras (fortificadas com analito) de leite, rim e músculo bovino. A limpeza das matrizes das amostras foi feita com cartuchos comerciais de extração em fase sólida (SPE do inglês *solid-phase extraction*) e as recuperações obtidas foram de 71 a 84% para neomicina, e de 80 a 104% para gentamicina. Mais recentemente, em 2018, Yan *et al.* [83], sintetizaram AuNPs visando a determinação colorimétrica de AMGs em amostras de leite (fortificadas com o analito) utilizando, para reconhecimento seletivo dos AMGs, oligonucleotídeos de DNA de cadeia simples. O pré-tratamento das amostras foi feito a partir da desproteinização com ácido tricloroacético (1% v/v) e as recuperações dos AMGs foram próximas de 100 %. No mesmo ano, Gukowsky *et al.* [84], desenvolveram um método para detecção de gentamicina utilizando AuNPs recobertas com cisteamina. Mais uma vez o monitoramento se deu pela razão de sinais (extinção) medidos em ( $A_{680}/A_{520}$ ), e o LD do método foi de 12 ng mL<sup>-1</sup>. Após o pré-tratamento das amostras de leite desnatado, fortificadas com sulfato de gentamicina, o método permitiu a quantificação de pelo menos 1,0 ng mL<sup>-1</sup> de gentamicina.

Na Tabela 2 estão resumidos outros métodos de quantificação de sulfato de gentamicina em amostras diversas, com seus respectivos valores de LD,

usando espectrometria de absorção, de fluorescência e por HPLC ou por eletrocromatografia capilar com detecção óptica.

**Tabela 2:** Resumo dos métodos de quantificação de gentamicina em amostras diversas [8].

Classificação da análise	Método	LD	Ref.
Absorciometria molecular direta	Separação por eletrocromatografia capilar com tampão borato (pH 9,4) com detecção absorciométrica (195 nm) sem derivatização.	2 g L <sup>-1</sup>	[85]
Absorciometria molecular após derivatização	Detecção no UV-Vis (415 nm) por derivatização 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno.	50 µg L <sup>-1</sup> (menor concentração da curva)	[86]
HPLC	Diferentes gentamicinas determinadas por HPLC (detecção absorciométrica em 365 nm) derivatizadas com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno.	1 mg L <sup>-1</sup>	[87]
Fluorimetria	Detecção após derivatização por 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol em 50% v/v tampão fosfato metanólico (pH 7,2) com $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 465/530 nm.	0,11 mg L <sup>-1</sup>	[88]

### 1.2.5.2. Quantificação de neomicina

Na literatura estão descritos diversos métodos que visam a quantificação de sulfato de neomicina, sendo alguns dos mais emblemáticos indicados a seguir. Zheng *et al.* [89], propuseram um método por HPLC com detecção por fluorimétrica após derivatização do sulfato de neomicina em amostras de frutos do mar (fortificadas com analito). A partir da utilização de uma coluna de imunoafinidade, o método apresentou uma faixa linear de 0,4 a 1,2 mg g<sup>-1</sup>, um valor de LD de 0,2 mg g<sup>-1</sup>, sendo requerido um procedimento trabalhoso para o tratamento das amostras. As recuperações percentuais encontradas foram de 75 a 117%. Também utilizando HPLC com detecção por fluorescência, Posyniak *et al.* [90], quantificaram sulfato de neomicina e sulfato de gentamicina em amostras (fortificadas com analitos) de tecidos de animais. As amostras foram tratadas e submetidas à SPE, sendo os AMGs derivatizados com cloroformiato de 9-fluorenilmetila antes da introdução no cromatógrafo. A faixa linear para sulfato de neomicina variou de 0,2 a 1 mg g<sup>-1</sup>, com valor de LD de 0,1 mg g<sup>-1</sup>, habilitando

recuperações de 77 a 83% em amostras de tecido suíno. Liu *et al.* [91], utilizando a técnica de HPLC com detecção por espalhamento de luz evaporativa, determinaram simultaneamente dez AMGs, incluindo sulfato de neomicina, em amostras de alimentos (fortificados com os analitos). A faixa linear para os AMGs ficou em torno de 2 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , tendo valores de LD da ordem de 0,2 e 0,7  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , e recuperações entre 61,2 e 104,0%.

Bazzan *et al.* [92], utilizando HPLC com detecção por espectrometria de massa, também desenvolveram um método para determinação de dez AMGs (incluindo a sulfato de neomicina) em amostras de tecidos animais (fortificados com os analitos). As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético, seguida de *clean up* em baixa temperatura para assegurar a precipitação das proteínas. Os valores de LD variaram de 5 a 100  $\text{ng g}^{-1}$ , e as recuperações variaram de 36,8 a 98,0 %. Huidobro *et al.* [93], no intuito de desenvolverem uma metodologia analítica para a determinação de sulfato de neomicina em pomadas, utilizou um sistema de eletroforese capilar com detecção absorciométrica no UV. Os autores encontraram recuperações percentuais em torno de 99 %, sendo a faixa linear de 0,8 a 1,3  $\text{mg mL}^{-1}$ .

Com o objetivo de determinar sulfato de neomicina em amostras de soro humano (fortificadas com analito), Oertel *et al.* [94], em 2004 desenvolveram um método por HPLC-MS (Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa) com ionização por *electrospray*. O preparo das amostras foi feito por extração em fase sólida automatizada e o *clean up* foi realizado por cromatografia de interação hidrofílica. O método apresentou faixa linear de 0,1 a 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e recuperações de cerca de 100%. Shaikh *et al.* [95], buscando determinar sulfato de neomicina em amostras de plasma e urina (fortificadas com analito), utilizaram HPLC com detecção fluorimétrica, derivatizando a sulfato de neomicina com OPA. As amostras passaram por algumas etapas de pré-tratamento, como desproteinização com ácido tricloroacético para o plasma, e filtração para a urina. Obtiveram-se recuperações percentuais de 97 a 113% para as amostras de plasma, e 94% para as amostras de urina, com faixas lineares de 0,25 a 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

### 1.2.6.

#### Extração em fase sólida e polímero de impressão molecular

A limpeza de matrizes a partir da utilização de SPE é de longe uma das abordagens mais utilizadas, quando se trata da determinação de analitos em amostras biológicas e farmacêuticas. O processo de limpeza de matriz (*clean up*) pode ser feito em etapas e visa remover parte significativa dos componentes de matriz antes do processo de extração (SPE, extração líquido-líquido, entre outras) que é usada para separar o analito dos potenciais interferentes [96]. A SPE convencional utiliza fases sólidas, empacotadas em pequenas colunas na forma de seringas ou cartuchos, sendo essa geralmente composta por sílica granulada modificada com um composto orgânico hidrofóbico quimicamente ligado (no caso da fase reversa). Essa fase sólida extratora interage com os analitos orgânicos por meio de interações de van der Waals. Por outro lado, cartuchos SPE com adsorventes polares (fase normal) também são comercializados, neste há grupos funcionais polares ligados à fase sólida, de forma viabilizar a retenção de compostos polares [97].

Em SPE a escolha dos solventes usados na limpeza, condicionamento e eluição são de grande relevância para eficiência do processo. Em muitos casos a extração pode se dar pelo controle de pH e polaridade, como foi o caso do trabalho descrito por Molins-Legua e Campins [98] que extraíram aminas de amostras como urina, água e cerveja. As aminas mais polares eluíram facilmente em condições ácidas, por outro lado, as aminas menos polares, tiveram a eluição favorecida pela utilização de solventes orgânicos.

O desenvolvimento de pesquisas com polímeros de impressão molecular (MIP) impulsionou a utilização/comercialização de cartuchos SPE de impressão molecular. Um polímero impresso constitui um material que possui sítios semelhantes à estrutura química da molécula modelo que foi utilizada para se obter a impressão molecular [99,100]. Ao remover a molécula modelo da matriz polimérica, após a síntese, os sítios vazios tender a apresentar algo grau de reconhecimento à mesma, ou à classe de substâncias que possuem semelhança estrutural com a molécula modelo [101]. Atualmente é possível encontrar alguns cartuchos comerciais de SPE com a impressão molecular de uma substância, ou de uma classe de substâncias, como por exemplos para AMGs. Moreno-González *et al.* [102], utilizaram cartuchos comerciais de SPE com a impressão molecular de AMG visando a limpeza de matrizes de amostras leite e de produtos lácteos. Os

autores desenvolveram um método de cromatografia líquida em tandem a fim de determinar onze AMGs, incluindo sulfato de gentamicina, e os resultados indicaram de recuperações entre 70% e 106%.

Desde 2012 o grupo de pesquisa do Dr. Ricardo Aucélio (PUC-Rio) vem desenvolvendo polímeros impressos como adsorventes para SPE. Na Tabela 3 estão resumidos os trabalhos publicados pelo grupo no assunto, especificando-se o analito, tipo de amostra, os LDs dos métodos e as recuperações percentuais obtidas.

**Tabela 3:** Pesquisas utilizando MIP como SPE.

<b>Analito</b>	<b>Amostra</b>	<b>LD</b>	<b>Recuperação</b>	<b>Ref.</b>
<b>Quercetina, canamicina e piraclostrobina.</b>	Urina, suplemento alimentar e vacina.	$> 4,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	$> 90 \%$	[96]
<b>Canamicina</b>	Vacina e formulações farmacêuticas	$6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	$> 98 \%$	[103]
<b>Neomicina</b>	Vacina e formulações farmacêuticas	$7,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	$> 95 \%$	[104]
<b>Gentamicina</b>	Formulações farmacêuticas	$8,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	$> 112 \%$	[105]

## 2 Materiais e métodos

### 2.1. Materiais e reagentes

#### 2.1.1. Reagentes

Água ultrapura (resistividade  $< 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) foi obtida dos sistemas de purificação Milli-Q gradient A10 (Milipore, USA) e modelo Master All (Gehaka, Brasil). Ácido cloroáurico,  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $>99,9\%$ ), borohidreto de sódio,  $\text{NaBH}_4$ , (pureza  $\geq 99,9\%$ ), brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB, (pureza de 98%), brometo de didecildimetilamônio, C10DAB (pureza de 98%), sulfato de canamicina, sulfato de estreptomicina, sulfato de gentamicina, sulfato de neomicina, 4-nitrofenol (pureza de 99%), e 2-mercaptoetanol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Ácido tricloroacético (pureza  $> 99\%$ ), ácido fosfórico (85% m/m), acetato de sódio (pureza  $> 99\%$ ) metanol (grau HPLC), acetonitrila (grau HPLC), hidróxido de sódio (pureza  $> 99\%$ ), ácido bórico (pureza  $> 99,5\%$ ), ácido cítrico monohidratado (pureza  $> 99,5\%$ ), tetraborato de sódio (pureza  $> 99,5\%$ ), fosfato de sódio monobásico (pureza  $> 99\%$ ), fosfato de sódio dibásico (pureza  $> 99\%$ ), ninidrina (pureza de 95%), *o*-ftalaldeído (OPA), *n*-hexano (pureza  $\geq 99,7\%$ ) e ácido clorídrico (37% m/m) foram obtidos da Merck (Alemanha). Tris(hidroximetil)aminometano ( $>99,9\%$ ) adquirido da Synth (Brasil) Ácido acético ( $>99,7\%$  m/m), citrato de sódio tribásico (pureza  $> 99\%$ ) e ácido nítrico (65% m/m) foram adquiridos da Vetec (Brasil).

O medicamento Hidrocin (solução nasal) contendo sulfato de neomicina foi adquirido em drogaria local, e as amostras de leite integral foram compradas em supermercados locais na cidade de Valença/RJ.

### 2.1.2. Materiais

Micropipetas manuais de volumes ajustáveis de 10 a 100  $\mu\text{L}$  (Brand, Alemanha), de 100 a 1000  $\mu\text{L}$ , de 500 a 5000  $\mu\text{L}$ , e de 2 a 10 mL (Digipet, Brasil) foram usadas. Filtros puradisc de 0,22  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$  com membrana de PTFE foram da Whatman (EUA) e cartuchos SPE com impressão molecular de AMGs (SupelMIP<sup>®</sup> SPE – aminoglycosides), com capacidade 3 mL, foram da Sigma Aldrich.

### 2.2. Instrumentação

As medições espectrofotométricas de absorção no UV-Vis foram realizadas nos espectrofotômetros de duplo feixe, modelo Cary 60 (Agilent, EUA), com banda espectral passante de 10 nm e velocidade de varredura de 600 nm min<sup>-1</sup>, e modelo Lambda 35 (Perkin-Elmer, EUA), com banda espectral passante de 10 nm e velocidade de varredura 1000 nm min<sup>-1</sup>. Em ambos foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm com duas faces polidas. As varreduras foram feitas na faixa de 300 a 900 nm para medições com nanopartículas de ouro.

Para as centrifugações, utilizou-se centrífuga de tubos modelo BE-5000 (Bio Eng, Brasil). Para medições de pH utilizou-se pHmetro modelo MPA 210 (Tecnopon, Brasil) com eletrodo de membrana de vidro combinado e de referência de Ag/AgCl(KCl sat). O banho-maria utilizado foi o modelo 316-D (Nova Ética, Brasil).

As sínteses das nanopartículas de ouro foram feitas no reator Orb (jacketed reactor system) modelo R18 (Syrris Ltd, Reino Unido). As imagens das nanopartículas foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (JEOL, modelo JSM-6701F, Japão), operado no modo de microscopia eletrônica de transmissão (STEM) a 30 kV, com distância de trabalho de 6,1 mm.

As medições de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e de potencial zeta ( $\zeta$ ) foram realizadas no analisador de nanopartículas modelo SZ-100 (Horiba, Japão). Para as medições de DLS utilizou-se cubetas de vidro com caminho óptico



de 10 mm, e para as medições de potencial  $\zeta$  utilizou-se célula eletroquímica de acrílico contendo eletrodo de carbono plano (6 mm de espessura).

As análises de cromatografia foram feitas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies, série 1200, Japão), equipado com um detector de fluorescência de comprimento de onda múltiplo, e coluna Agilent Eclipse XDB – C18 (250  $\times$  4.6 mm de tamanho de partícula médio de 5  $\mu$ m). A excitação foi feita em 345 nm e a emissão foi medida em 450 nm.

## **2.3. Procedimentos**

### **2.3.1. Limpeza**

Após o uso, todas as vidrarias foram lavadas com solução de detergente Extran (Merck) e deixadas em repouso em solução aquosa de ácido nítrico (20% v/v) no mínimo por 1 h, sendo enxaguadas com água corrente e água ultrapura. As cubetas de quartzo e vidro foram limpas após cada medição de dispersão de ouro através de uma lavagem com uma solução de água régia (1:3 de HCl e HNO<sub>3</sub>), enxaguando-se exaustivamente após com água corrente e água ultrapura.

### **2.3.2. Síntese das nanopartículas de ouro**

As nanopartículas foram obtidas a partir da redução de ácido cloroáurico promovida por NaBH<sub>4</sub>, adaptando-se o procedimento descrito por Xu *et al.*, [31] a partir da substituição dos surfactantes originais do trabalho por CTAB e C10DAB e com uso do reator para síntese. O procedimento é resumido a seguir: Em vaso encamisado, de 250 mL, foram adicionados 180 mL de solução aquosa de CTAB ou de C10DAB, variando-se as concentrações de  $1,0 \times 10^{-4}$  a  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, e 1060  $\mu$ L de uma solução aquosa de HAuCl<sub>4</sub> ( $5,1 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>). O vaso foi adaptado ao reator, e em seguida ajustou-se a pá mecânica de vidro de forma a se ter agitação vigorosa. Posteriormente, com auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 600  $\mu$ L (gota a gota) de uma solução 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaBH<sub>4</sub> (recém preparada). Terminada a adição, a reação permaneceu sob agitação por 5 min. Nanopartículas de ouro sintetizadas em água (AuNPs-H), todavia na ausência de

agente de recobrimento orgânico, foram obtidas da mesma forma, substituindo-se o vaso encamisado de 250 mL por um de 500 mL, de forma habilitar a obtenção do dobro do volume final, preservando as requeridas proporções de reagentes. Todas as sínteses de nanopartículas foram feitas em triplicata a fim de se verificar a repetibilidade do processo de obtenção. Após as sínteses, as dispersões foram transferidas para um copo Becher e deixadas em repouso por 2 h. Após o período de repouso, as mesmas foram armazenadas em frascos âmbar, e estocadas tanto sob refrigeração (4°C), quanto na temperatura ambiente (27°C). As AuNPs-citrato, aquelas reduzidas por citrato de sódio monobásico, foram obtidas conforme descrito por Santos *et al.*, [7], e estocadas em frasco âmbar sob refrigeração (4°C), visando a realização de estudos comparativos com AuNPs-H.

### 2.3.3. Caracterização das nanopartículas ouro obtidas

Os perfis espectrais de extinção das nanopartículas sintetizadas foram obtidos por espectrofotometria de absorção, a partir das medições feitas imediatamente após o preparo de dispersões diluídas (20% v/v), constituídas por 1,0 mL de cada dispersão de síntese e 4,0 mL de água ultrapura. Na Tabela 4 estão listadas as nanopartículas obtidas nas diferentes condições.

**Tabela 4:** Identificação das nanopartículas de ouro obtidas em função das condições usadas.

Identificação	Meio	Concentração de surfactante
AuNPs-CTAB-10 <sup>-2</sup>	CTAB	1,0 × 10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup>
AuNPs-CTAB-10 <sup>-3</sup>	CTAB	1,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>
AuNPs-CTAB-10 <sup>-4</sup>	CTAB	1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-2</sup>	C10DAB	1,0 × 10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup>
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-3</sup>	C10DAB	1,0 × 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-4</sup>	C10DAB	1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>
AuNPs-H	Água ultrapura	*
AuNPs-citrato	Citrato de sódio aquoso	*

\* Não se aplica.

As imagens por STEM foram obtidas aplicando-se de 2,5 µL de cada dispersão de síntese nanopartículas de ouro em grades de carbono, esperando-se o solvente evaporar (temperatura ambiente). A partir dos tratamentos das

microscopias foi possível obter dados como diâmetro médio, circularidade e razão de aspecto.

Para a obtenção do diâmetro hidrodinâmico (Dh), foram feitas medições de DLS a partir da diluição de alíquotas das dispersões de síntese das nanopartículas. Para as medições de potencial  $\zeta$  das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB, dispersões diluídas dessas nanopartículas foram utilizadas. Para as medições de potencial  $\zeta$  com AuNPs-citrato foram feitos experimentos com dispersões diluídas com e sem adição de solução tampão fosfato ( $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,2). Por fim, para as medições de potencial zeta com AuNPs-H foram realizados experimentos com dispersões diluídas com e sem tampão citrato ( $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0) ou tampão borato ( $4,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 9,5). As medições foram realizadas no mesmo dia do preparo das dispersões e em outros períodos conforme o estudo realizado.

#### **2.3.4. Preparo de soluções**

Soluções estoque de aminoglicosídeos (sulfatos) canamicina, estreptomicina, neomicina e gentamicina, na concentração de  $6,0 \text{ g L}^{-1}$ , foram preparadas em balões volumétricos de 5,00 mL, a partir da pesagem 30 mg de cada AMG, sendo o volume de cada balão completado pela adição de água ultrapura. Demais soluções padrões (e também amostra simulada de sulfato de neomicina) foram preparadas a partir diluições sucessivas. Soluções estoque de CTAB e C10DAB foram preparadas em balões volumétricos de 1000,00 mL, na concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  pesando-se quantidades adequadas de cada surfactante. As demais soluções padrões ( $1,0 \times 10^{-3}$  e  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparadas por diluição sequencial. Soluções estoque de cloridrato de nafazolina e, fosfato dissódico de dexametasona (potenciais interferentes) foram preparadas na concentração de  $9,1 \text{ g L}^{-1}$ .

As soluções da amostra do medicamento nasal (com composição de  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  para sulfato de neomicina, cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona, respectivamente) foram preparadas em balões volumétricos de 5,00 mL, a partir da diluição de  $21 \mu\text{L}$  do medicamento em água ultrapura.

Solução de ácido tricloroacético foi preparada na concentração de 10% m/v. A solução derivatizante de ninidrina (1,25% m/v) foi preparada a partir da dissolução de ninidrina em tampão fosfato ( $2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,2). Essa e as demais soluções aquosas de tampões foram preparadas misturando-se os respectivos sais e seus ácidos (ou bases) até o pH desejado, sendo as características de todas as soluções resumidas na Tabela 5. A solução derivatizante OPA, para análise cromatográfica foi preparada segundo Freeman *et al.*, [106] com adaptações. Em um balão volumétrico de 5,00 mL foram adicionados 49 mg de *o*-ftalaldeído, 2,0 mL de metanol e 98 uL de 2-mercaptoetanol, sendo o volume final ajustado pela adição de tampão borato (pH 9,5;  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ).

**Tabela 5:** Soluções tampão.

Tampão	Concentração	pH	Reagentes
Borato	$4,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$	9,5	Hidróxido de sódio e ácido bórico
Borato	$5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	8,9	Hidróxido de sódio e ácido bórico
Citrato	$5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	4,0	Citrato de sódio tribásico e ácido cítrico
Fosfato	$5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	7,2	Fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico
Fosfato	$2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$	7,4	Fosfato de sódio monobásico hidróxido de sódio
Fosfato	$1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	3,5	Fosfato de sódio dibásico e ácido fosfórico
Tris-HCl	$5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	8,2	Tris(hidroximetil)aminometano e ácido clorídrico

Para o estudo de atividade catalítica foram preparadas soluções de 4-nitrofenol, na concentração  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , e de  $\text{NaBH}_4$ ,  $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , diluindo-se quantidades apropriadas de cada substância em balões volumétricos de 5,00 mL.

### 2.3.5. Preparo das dispersões

Para as dispersões preparadas nesse trabalho, se adotou os seguintes termos: i) Dispersões de síntese que são as AuNPs sintetizada sem diluição; ii) Dispersões diluídas 20%, 32% ou 40% v/v (volume adequado de dispersão de síntese diluída com água em balão volumétrico de 5,00 mL); iii) Dispersão mãe que são as dispersões de síntese a 80% v/v; iv) Dispersões de trabalho que são

dispersões de síntese a 40% v/v preparadas com 2,5 mL de dispersão mãe, 1,0 mL de tampão  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  diluídas em balão volumétrico de 5,00 mL.

Para os testes de estabilidade das nanopartículas, em relação ao tempo de estocagem e em relação ao tempo de medições, foram preparadas dispersões diluídas 20% v/v. Para os estudos preliminares de interação com AMGs foram preparadas dispersões diluídas 20% v/v (exceto para AuNPs-H) em balões volumétricos de 5,00 mL, contendo alíquotas de soluções padrões do AMG específico, na faixa de concentração entre 12 a  $1200 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo o volume final de cada dispersão completado pela adição de água ultrapura.

Para os testes de atividade catalítica, 1390  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 300  $\mu\text{L}$  de uma solução  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de 4-nitrofenol foram adicionados na cubeta de quartzo. Após homogeneização, adicionou-se 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{NaBH}_4$  ( $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) e 40  $\mu\text{L}$  de cada dispersão de síntese de nanopartículas de ouro. As medições espectrofotométricas de absorção foram feitas na faixa de 200 a 500 nm, sendo o sinal monitorado em 401 nm para monitorar o decaimento do íon 4-nitrofenolato. Este procedimento foi baseado nos relatos Seoudi e Said [107], no qual foram avaliadas atividades de catalíticas de outras nanopartículas de ouro.

Uma vez que somente AuNPs-H interagiram significativamente com os AMGs testados, os testes subsequentes foram realizados no intuito de estudar as respostas ópticas visando aplicação analítica. Para os testes de avaliação de intensidade máxima do sinal das AuNPs-H, uma dispersão dispersão-mãe foi preparada e, a partir desta, foram preparadas dispersões de nanopartículas diluídas a 20, 32 e 40% v/v.

Testes de avaliação da influência de tampão nas dispersões de trabalho de AuNPs-H foram feitos variando-se o tampão entre citrato (pH 4,0), ou fosfato (pH 7,2), ambos na concentração  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . As dispersões foram monitoradas no intervalo de tempo de 90 min. Testes nas mesmas condições também foram realizados utilizando tampão tris-HCl (pH 8,2) e tampão borato (pH 8,9), todos na concentração de  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

Testes subsequentes de interação entre AuNPs-H e sulfato de neomicina foram feitos utilizando soluções padrões do AMG ( $91$  a  $1453 \mu\text{g L}^{-1}$ ) seguindo a condição experimental descrita no parágrafo anterior (para tampão fosfato e tampão citrato). Demais testes de interação foram feitos com outros AMG (sulfato

de canamicina, sulfato de estreptomicina e sulfato de gentamicina) na faixa de concentração final na dispersão de trabalho entre 91 a 1453  $\mu\text{g L}^{-1}$ , na presença de tampão citrato ( $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0).

Para a obtenção das curvas analíticas, dispersões de trabalho (40% v/v;  $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de AuNPs-H) foram utilizadas, através do ajuste de 5,00 mL em balão volumétrico pela adição água ultrapura, após microvolumes apropriados de solução estoque de sulfato de neomicina ou sulfato de gentamicina terem sido adicionados (exceto na dispersão branco). Após 5 min do preparo, foi feito o monitoramento da variação dos perfis espectrais em 511 e em 681 nm, habilitando a construção de curvas analíticas medindo os sinais de extinção em 681 e também usando a razão de sinais (extinção) medidos (681/511), nas faixas de 7,3 a 550  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,6 a 600  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para sulfato de neomicina e sulfato de gentamicina, respectivamente.

Os testes de interferência com as substâncias, cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona foram feitos em dispersões de trabalho de AuNPs-H na presença de sulfato de neomicina na concentração de 91  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo as proporções analito:co-fármacos avaliadas de 1:0,1; 1:0,5 e 1:1. Os testes de interferência com os brancos das amostras (soro de leite e saliva) foram feitos através da adição de alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  destas matrizes (antes e após *clean up*) nas dispersões de trabalho. Amostras simuladas de sulfato de neomicina foram preparadas nos níveis de contração de 55 e 366  $\mu\text{g L}^{-1}$  e determinadas na sonda AuNPs-H conforme protocolo de preparação de dispersões de trabalho.

### **2.3.6.**

#### **Parâmetros analíticos de mérito**

Os parâmetros de mérito indicam o desempenho de um método analítico desenvolvido para uma determinada finalidade. Para tal, determinam-se os parâmetros de mérito como exatidão, precisão, sensibilidade, limite de detecção e faixa linear dinâmica [108]. A seguir serão definidos os parâmetros de mérito considerados neste trabalho para sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina.

### 2.3.6.1.

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

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que indica que o analito está presente na amostra, porém não necessariamente garante nível de confiança adequado para sua quantificação. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser quantificado por um método, com nível de confiança adequado. Estes foram calculados considerando a sensibilidade das curvas analíticas ( $m$ ) e o sinal do branco ( $x_b$ ) que é o sinal LSPR original da sonda de AuNPs-H e considerando um fator de confiança ( $k$ ), de 3 para o LD e de 10 para o LQ, que multiplica o desvio-padrão ( $s_b$ ) obtidos de 10 medições da dispersão-branco feitas em 681 nm ou combinado os desvios padrões no caso do uso da razão 681/511 nm (Equação 3) [108].

$$LOD \text{ ou } LOQ = \frac{x_b + (ks_b)}{m} \quad (3)$$

### 2.3.6.2.

#### Precisão

A precisão indica o grau de dispersão obtido para os resultados experimentais e em geral são reportados como desvios-padrões ou por combinações de desvios-padrões (que podem também ser reportados como desvios-padrões relativos ou coeficientes de variação (CV) como reportado na Equação 4) obtidos por medições experimentais numa mesma amostra ou numa série de amostras de mesma característica [108,109].

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (4)$$

A precisão instrumental é um erro associado às variações do instrumento de medição. Esta foi obtida por meio de 10 medições sucessivas de dispersões contendo AMG em três concentrações diferentes (sulfato de gentamicina em 6,0; 60,0; 300,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e sulfato de neomicina em 9,1; 91,0; 270,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) feitas em 681 nm. Para a precisão instrumental da razão (681/511) combinou-se os desvios padrões obtidos em 511 nm e em 681 nm.

A precisão intermediária refere-se à precisão considerando o processo completo de preparação de amostra e para tal requer réplicas autênticas da amostra. A precisão intermediária foi avaliada a partir de medições feitas em 10 dispersões de trabalho contendo AMG em três níveis de concentração (sulfato de gentamicina em 6,0; 60,0; 300,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e sulfato de neomicina em 9,1; 91,0; 270,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) monitoradas em 681 nm. Para a razão (681/511) utilizou-se a combinação de desvios-padrões.

### 2.3.7.

#### Cálculo para ensaios de recuperação e variação

Os ensaios de recuperação para as amostras fortificadas, reais e simuladas foram realizados fazendo-se uma comparação percentual em relação à concentração teórica ( $C_{\text{teórica}}$ ) e a concentração recuperada ( $C_{\text{recuperada}}$ ) pelo uso das curvas analíticas, conforme Equação 5.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{recuperada}} \times 100}{C_{\text{teórica}}} \quad (5)$$

Para obter-se os resultados de variação (%) foi utilizada a Equação 4, já mencionada como CV, utilizando-se a variação entre a sonda com e sem interferência.

### 2.3.8.

#### Preparo de amostras de leite integral

Amostras de leite integral foram desproteinizadas seguindo a metodologia descrita por Khan *et al.* [110], com pequenas modificações. Resumidamente, em um tubo Falcon de 15 mL foram adicionados 5,0 mL de amostra de leite integral, 210  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de sulfato de gentamicina (6,0  $\text{g L}^{-1}$ ) e água ultrapura para completar o volume final de 10,0 mL. Em seguida fez a homogeneização manual antes de coletar uma alíquota de 5,0 mL, que foi transferida para outro tubo Falcon. O tubo contendo a alíquota foi resfriado no freezer por 30 min para, em seguida, fazer a centrifugação (2.800 RFC) por 5 min. Retirou-se a camada de gordura presente na parte superior da mistura com o auxílio de uma espátula. O material remanescente foi resfriado novamente por 30



min para, em seguida, centrifugar novamente por 5 min para que o resíduo de gordura, separado na camada superior da mistura, fosse retirado. Ao material restante no tubo, adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético (10% m/v), agitou-se manualmente por 30 s e centrifugou-se novamente por 10 min. A solução sobrenadante foi vertida para outro tubo Falcon, rejeitando o pellet de proteínas precipitadas. Ao tubo onde o sobrenadante foi transferido, adicionou-se 1,0 mL de *n*-hexano para, em seguida, fazer a homogeneização manual por 30 s e centrifugar por 10 min. Por fim, recolheu-se a fase líquida (com o soro do leite), com auxílio uma micropipeta, para um tubo Falcon. A desproteinização do branco do leite (sem adição de solução padrão de sulfato de gentamicina) foi feita da mesma forma. Para o procedimento SPE (item 2.3.8) foram utilizadas alíquotas de 40 µL da solução aquosa final (com o soro de leite). Todos os procedimentos foram feitos em triplicata.

### **2.3.9.**

#### **Coleta das amostras de saliva e sua preparação**

Amostras de saliva foram coletadas de um indivíduo adulto do sexo feminino e não fumante. O indivíduo permaneceu sem se alimentar por três horas, e antes da coleta foi feita lavagem bucal com aproximadamente 50 mL de água. Após a administração de 3 gotas do medicamento em cada narina, recolheu-se aproximadamente 2 mL de saliva, imediatamente após o uso do medicamento. A amostra foi desproteinizada seguindo o procedimento descrito por Martínez-Ortega *et al.* [111], com adaptações. Brevemente, em um tubo Falcon de 15 mL foram adicionados 500 µL amostra de saliva e 1,0 mL de acetonitrila para, em seguida, fazer a homogeneização por 30 s, seguida de centrifugação (2.800 RFC) por 10 min. O sobrenadante foi vertido para um novo tubo Falcon, de 15 mL, e posteriormente fez-se a evaporação, a 30 °C em banho-maria, de forma a eliminar o solvente orgânico. Por fim, foi feita a reconstituição da amostra pela adição de 250 µL de água ultrapura. Para amostras de branco da saliva, o mesmo protocolo foi seguido, todavia sem a utilização do medicamento. Para a abordagem SPE (item 2.3.8) foram utilizadas alíquotas de 40 µL de amostras saliva desproteinizadas. Todos os testes foram feitos em triplicata.

### 2.3.10.

#### **Extração em fase sólida com monitoramento usando a sonda AuNPs-H**

Visto que componentes tanto no branco do soro do leite quanto o branco das amostras de saliva, mesmo após a desproteinização, ainda promoveram interferência no sinal da sonda de AuNPs-H, foi necessário lançar mão de um procedimento de SPE para tentar viabilizar as aplicações pretendidas com o método. Para tal, utilizaram-se cartuchos comerciais com adsorvente de polímero impresso com AMGs (MIP-AMG).

Inicialmente o cartucho de SPE foi acondicionado com 1,0 mL de água ultrapura, sendo esta eluída e descartada. Em seguida o cartucho foi carregado com 40 µL de solução padrão de sulfato de gentamicina ( $2,2 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ ). O tempo de adsorção do analito foi avaliado deixando-se o cartucho em repouso por 30, 40 e 60 min. Após esse período, a eluição foi feita com 7 mL de água ultrapura (frações 1 a 7), recolhendo-se frações de 1,0 mL, cada uma em um tubo de vidro. Posteriormente, adicionou-se 3,0 mL de solução de tampão citrato ( $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0) para promover a eluição final (frações 8 a 10), também coletando-se frações de 1,0 mL separadamente. O conteúdo de todos os tubos foram transferidos para dispersões de trabalho de AuNPs-H, e após 5 min, foram feitas as medições espectrofotométricas. Neste protocolo foi estabelecido que para todos os testes subsequentes o tempo de adsorção requerido seria de 60 min.

A fim de se verificar a capacidade de carregamento dos cartuchos, testes foram realizados seguindo o protocolo descrito acima, pela adição de alíquotas de 40 µL de soluções padrões de sulfato de gentamicina nas concentrações de  $2,2 \times 10^{-2}$ ,  $1,1 \times 10^{-1}$  e  $2,2 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ . Testes de capacidade de carregamento também foram realizados com sulfato de neomicina nas concentrações de  $2,1 \times 10^{-2}$  e  $1,1 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$  (segundo protocolo descrito).

A avaliação da variação do sinal da sonda de AuNPs-H também foi realizada frente a eluição de 7 frações de água ultrapura e de 3 três frações de 3,0 mL de solução de tampão citrato ( $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0) na ausência de AMG. Este procedimento controle foi chamado de “branco do MIP-AMG”. Os testes de eluição (segundo protocolo descrito) também foram realizados com os interferentes cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona, nos quais o cartucho foi carregado com 40 µL de uma mistura de soluções padrões de

cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona nas concentrações de  $3185 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2129 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Para as aplicações do método, tanto as amostras tratadas de leite integral (solução com soro do leite) quanto amostras de saliva desproteinizadas, além da de solução nasal, foram submetidas à abordagem SPE, de acordo com o protocolo descrito, a partir do carregamento de  $40 \mu\text{L}$  de amostra por cartucho.

### **2.3.11.**

#### **Método espectrofotométrico para sulfato de neomicina com derivatização com ninidrina**

Amostras simuladas de sulfato de neomicina também foram determinadas no método comparativo colorimétrico de derivatização por ninidrina, descrito por Frutos *et al.* [4]. O método foi adaptado para sulfato de neomicina utilizando-se solução padrão na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em balões volumétricos de vidro foram adicionados  $830 \mu\text{L}$  de solução estoque de ninidrina (1,25% m/v) e volumes apropriados da solução padrão de sulfato de neomicina. Sendo o volume final de cada solução (5,0 mL) ajustado pela adição de tampão fosfato (pH 7,4;  $2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ ). Assim, as concentrações de sulfato de neomicina nos tubos de vidro variaram de 30 a  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras simuladas de sulfato de neomicina foram preparadas de maneira análoga, sendo as concentrações calculadas para o AMG no meio, iguais a 40 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A solução-branco foi preparada da mesma forma, todavia na ausência de sulfato de neomicina. As soluções foram aquecidas a  $95^\circ\text{C}$  em banho-maria, por 15 min, após este período foram resfriadas, e em seguida foram realizadas as medições espectrofotométricas com varredura de 200 a 600 nm. Para construção da curva analítica fez-se o monitorando o sinal em 400 nm [4]. Todos os testes foram feitos em triplicata.

### **2.3.12.**

#### **Método cromatográfico para determinação de neomicina**

Amostras do descongestionante nasal foram analisadas por HPLC com detecção por fluorescência, objetivando-se determinar sulfato de neomicina de modo a se ter um valor de comparação com a do método proposto na dissertação. Um procedimento baseado no trabalho realizado por Santos *et al.* [73] foi

utilizado com modificações. Basicamente, uma solução estoque de sulfato de neomicina ( $1000 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi utilizada para preparar padrões do analito nas concentrações de 5,0 a  $40,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas de  $400 \text{ } \mu\text{L}$  das soluções padrões sulfato de neomicina ou das amostras do medicamento nasal foram derivatizadas com  $150 \text{ } \mu\text{L}$  solução de OPA por 30 min.

A separação de sulfato de neomicina foi realizada utilizando eluição isocrática e fase móvel contendo 66% (em volume) de uma mistura de solventes orgânicos (86,7% de acetonitrila e 13,3% de metanol) e 34% de solução tampão fosfato ( $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 3,5). A fase estacionária foi uma coluna Zorbax eclipse C18 ( $250 \pm 4,6 \text{ mm}$  e tamanho médio de partícula de  $5 \text{ } \mu\text{m}$ ). A vazão da fase móvel foi de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e o volume introduzido no sistema de HPLC foi de  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , na temperatura ambiente. O monitoramento foi feito em 345/450 nm sendo o tempo de retenção do analito em 9,8 min.

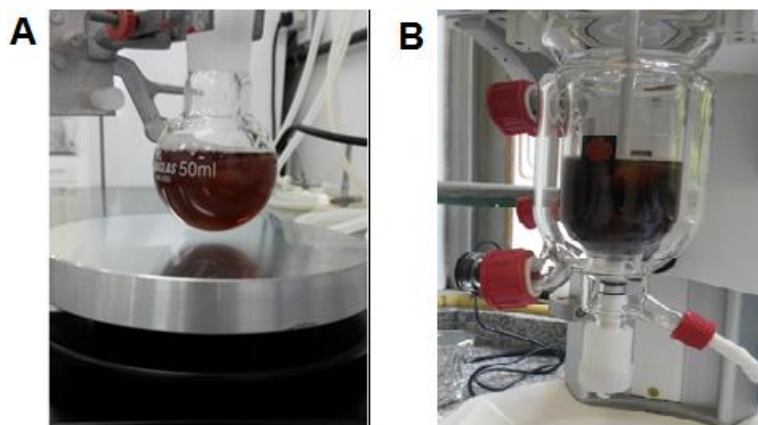
### 3

## Estudo de nanopartículas de ouro na presença de surfactantes

### 3.1.

#### Síntese e caracterização das AuNPs

Inicialmente as nanopartículas de ouro foram sintetizadas em pequenas escalas, em balões de fundo redondo de 50 mL, mantendo-se agitação magnética (Figura 10A). Todavia, verificou-se que havia uma variação maior do que a desejada para sínteses reprodutivas tanto em relação à intensidade (4,2%) quanto ao comprimento de onda máximo da banda LSPR das nanopartículas produzidas (nesse caso variando em média 4 nm). Tal variação indica variação de tamanhos médios nas partidas de nanopartículas e diferentes rendimentos de produção. É sabido que a formação de nanopartículas de ouro são bastante sensíveis às variações do processo, assim, especulou-se que o posicionamento do balão na placa de agitação, bem como diferenças na velocidade da rotação da barra magnética nas diferentes partidas de síntese, poderiam ser fatores que justificassem a variação observada. Assim sendo, decidiu-se realizar as sínteses no reator Orb com agitação do tipo mecânica (Figura 10B). Todavia, a capacidade do vaso disponível para uso era superior a 50 mL, assim o volume das dispersões de síntese das nanopartículas foi aumentado mantendo-se as proporções em relação às sínteses feitas no balão de fundo redondo. Embora não houvesse, nesse reator, uma escala de velocidade de rotação, estabeleceu-se uma posição no controle de rotação do sistema de modo a que a velocidade fosse repetida em todas as sínteses. Como resultado, obteve-se um CV menor do que 3% em relação à intensidade máxima da banda LSPR e comprimento de onda máximo.



**Figura 10:** Síntese de nanopartículas de ouro em: (A) balão de fundo redondo e no reator Orb (B).

Após as sínteses as dispersões das nanopartículas foram transferidas para copos Becker e deixadas em repouso por 2 h para, em seguida transferi-las para frascos de vidro âmbar e estocadas em duas condições: na temperatura ambiente e sob refrigeração a 4 °C. Para a etapa de caracterização utilizou-se apenas as nanopartículas estocadas a 4 °C.

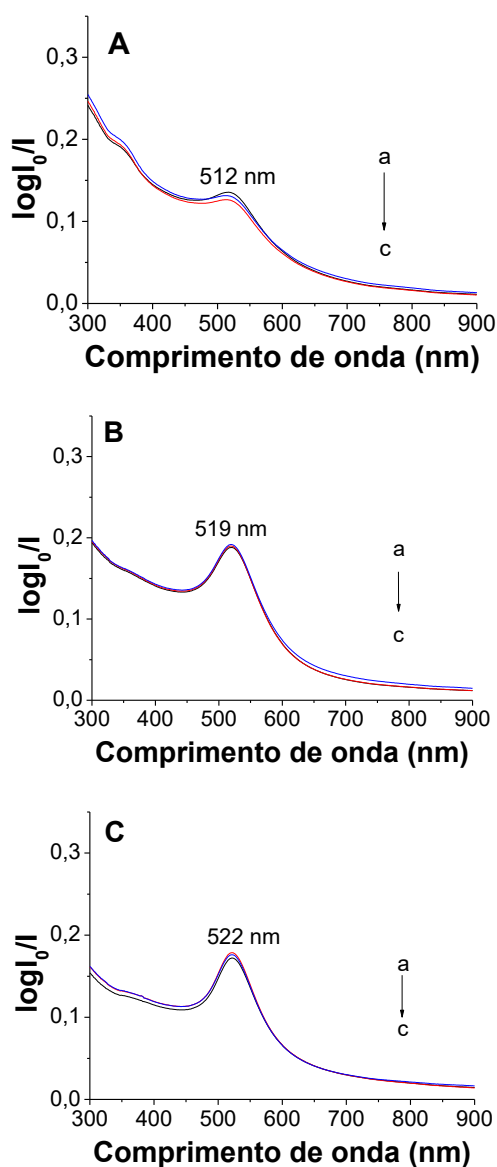
A caracterização inicial das nanopartículas se deu, inicialmente, com a obtenção dos perfis espectrais no UV-Vis (Figura 11). Para tal, fez-se a diluição de alíquotas de dispersões de síntese em água ultrapura, sendo mantida a diluição na proporção de 20% v/v de AuNPs-CTAB ou de AuNPs-C10DAB.

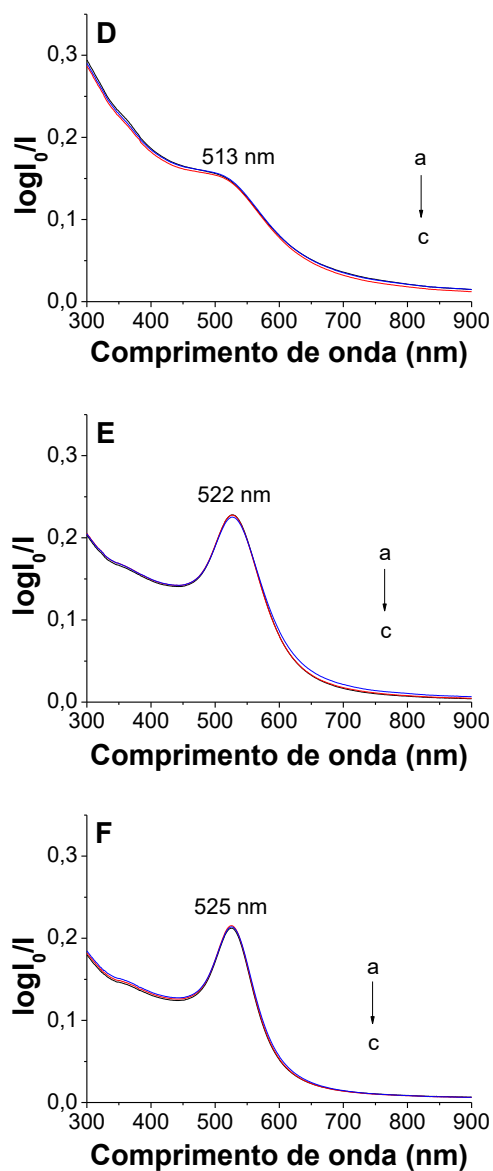
A princípio pode-se verificar que os perfis espectrais não diferiram significativamente nos níveis de concentração  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de CTAB (Figura 11B e Figura 11C), tendo comprimentos de onda máximo das bandas LSPR, em 519 e 522 nm respectivamente. Para as AuNPs-C10DAB, nos mesmos níveis de concentração de surfactante também se observa similaridade nos perfis, todavia percebeu-se um leve deslocamento batocrômico das bandas LSPR (522 e 525 nm), o que sugere que AuNPs-C10DAB apresentem um diâmetro médio um pouco maior que AuNPs-CTAB. Por outro lado, constatou-se que no nível de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de surfactante, ambos os perfis das nanopartículas não exibiram boa definição.

Subsequentemente foram feitas medições de Dh médio e potencial zeta  $\zeta$ , sendo estas realizadas um dia após as sínteses. Esses resultados das medições por DLS são apresentados na Tabela 6 (ver nomenclatura específica na Tabela 4). O Dh é uma técnica de caracterização de partículas dispersas em um líquido, onde o

movimento browniano das mesmas faz com que o laser de luz seja espalhado com intensidades diferentes baseado na relação Stokes-Einstein [112], já o potencial  $\zeta$  indica o valor da carga superficial das partículas [113].

A caracterização morfológica por STEM foi feita após algumas semanas da obtenção da nanopartículas. Na Figura 12 e na Figura 13 são apresentadas as microscopias das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB respectivamente, e na Tabela 5 estão sumarizados os valores de diâmetro médio obtidos por STEM.



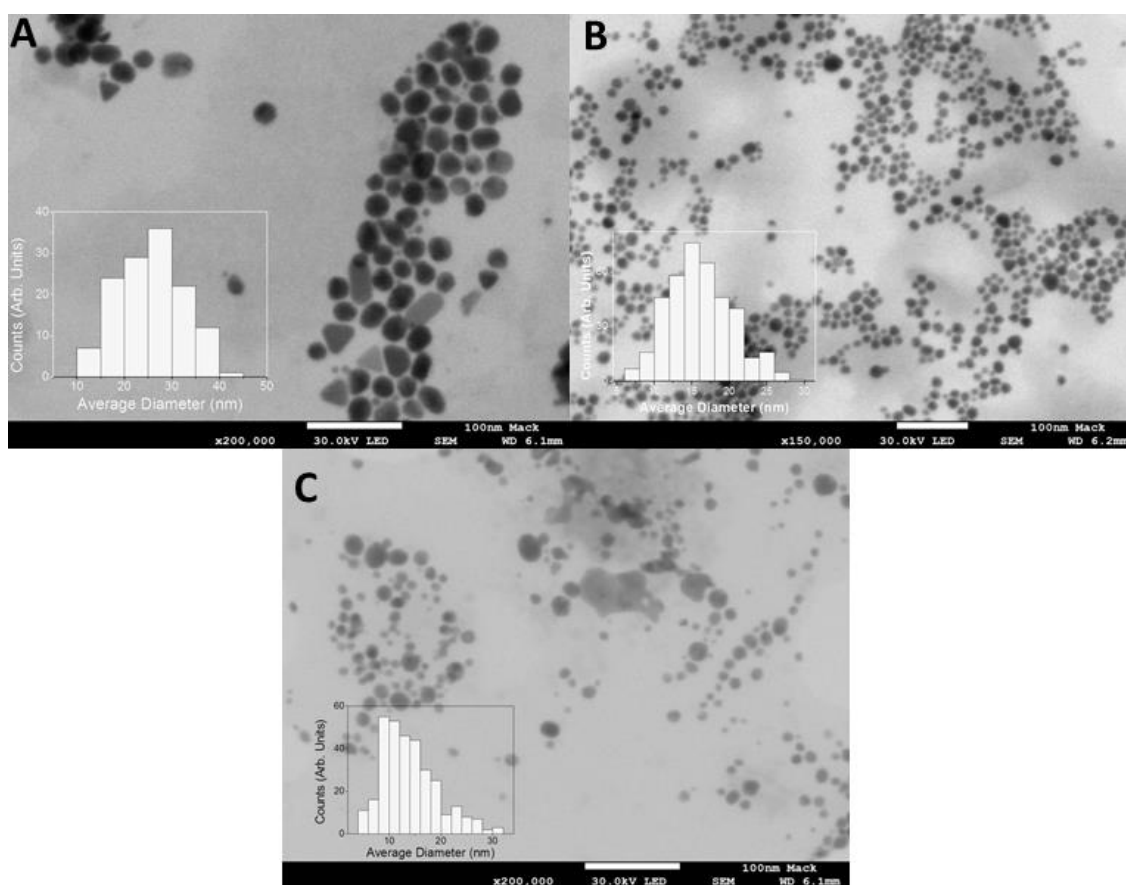


**Figura 11:** Perfis espectrais das triplicatas de síntese das nanopartículas (a-c), sendo: (A) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$ , (B) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$ , (C) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$ , (D) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$ , (E) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  e (F) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ .



**Tabela 6:** Valores de potencial  $\zeta$ , Dh, e dados de morfologia obtidos para as AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB.

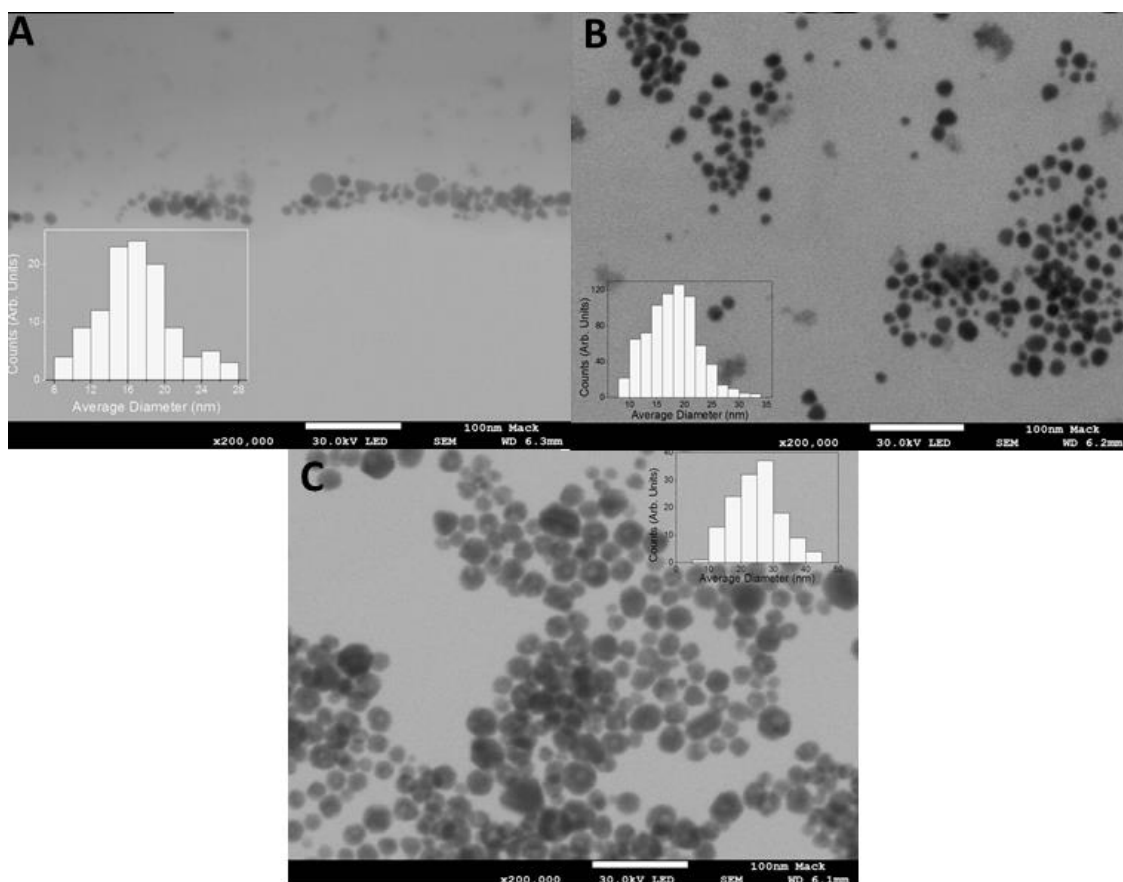
Nanopartículas	Potencial $\zeta$ (mV)	Dh (nm)	Diâmetro médio por STEM (nm)	Circularidade	Razão de aspecto
AuNPs-CTAB- $10^{-2}$	$+124,7 \pm 1,5$	$18,1 \pm 0,6$	$25,7 \pm 6,8$	$0,80 \pm 0,10$	$1,20 \pm 0,10$
AuNPs-CTAB- $10^{-3}$	$+113,0 \pm 2,2$	$17,9 \pm 1,4$	$16,2 \pm 4,3$	$0,80 \pm 0,10$	$1,20 \pm 0,10$
AuNPs-CTAB- $10^{-4}$	$+68,3 \pm 4,6$	$20,0 \pm 6,8$	$13,9 \pm 5,4$	$0,88 \pm 0,06$	$1,15 \pm 0,09$
AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$	$+93,3 \pm 3,4$	$17,7 \pm 0,6$	$16,7 \pm 4,1$	$0,80 \pm 0,10$	$1,20 \pm 0,20$
AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$	$+64,4 \pm 1,8$	$18,6 \pm 4,3$	$17,9 \pm 4,7$	$0,90 \pm 0,10$	$1,20 \pm 0,20$
AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$	$+38,1 \pm 2,9$	$26,8 \pm 5,4$	$24,8 \pm 7,5$	$0,87 \pm 0,08$	$1,12 \pm 0,07$



**Figura 12:** Imagens obtidas por STEM para: (A) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$ , (B) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$  e (C) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$ .

Os valores de diâmetro médio das nanopartículas obtidos tanto por DLS quanto por STEM apresentaram concordância na maioria dos casos. Todavia houve uma pequena divergência para as AuNPs-CTAB- $10^{-2}$ , que pode ser explicada pela presença de grande quantidade de micelas no sistema, influenciando o espalhamento de luz por conta do movimento browniano. Embora

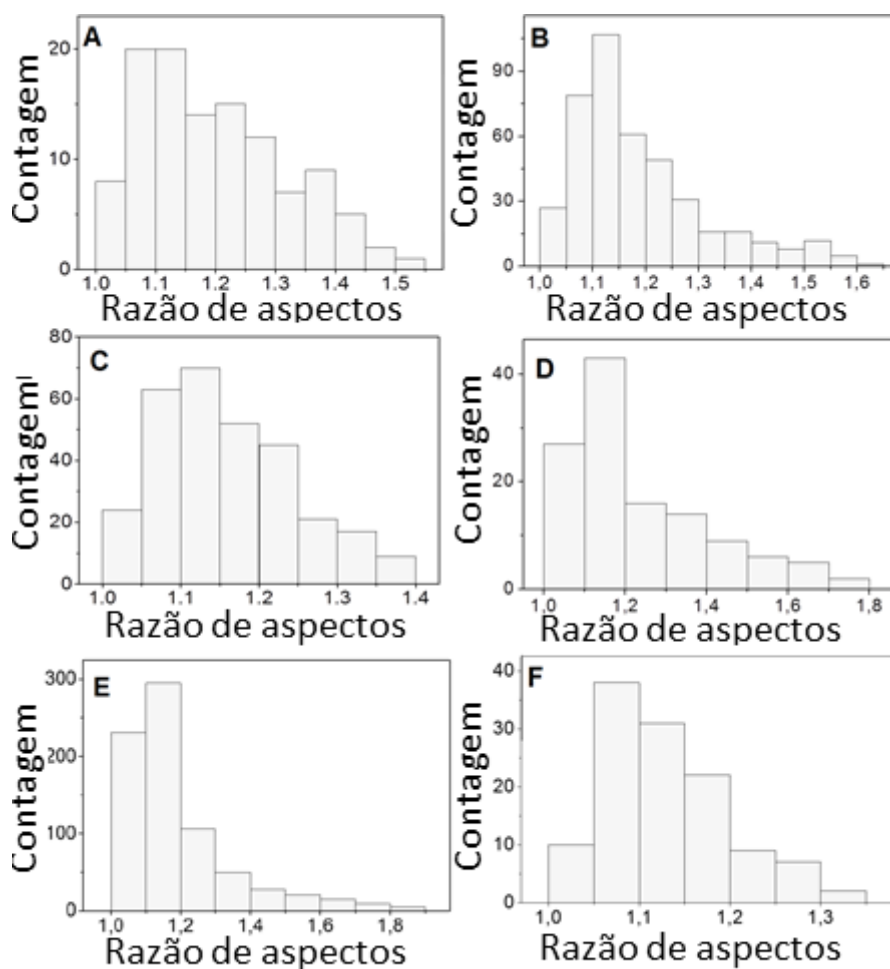
as AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$  apresentem a mesma concentração de surfactante no meio, o valor do diâmetro médio apresentou similaridade nas duas caracterizações. Quanto aos resultados de potencial  $\zeta$ , como era de se esperar, os maiores valores foram obtidos para nanopartículas na presença de alta concentração de surfactante, o que indica que de fato há maior quantidade de carga superficial positiva ao redor dessas nanopartículas, sendo o valor para o surfactante catiônico de uma cauda (CTAB) maior que para o de duas caudas (C10DAB).



**Figura 13:** Imagens obtidas por STEM para: (A) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$ , (B) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  e (C) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ .

Quanto à circularidade, a maioria das nanopartículas apresentou um valor em torno de 0,8, sendo que para AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  o valor foi de 0,9. Os valores de razão de aspecto das nanopartículas, que indica uma relação entre o eixo maior e o eixo menor das partículas [114], são apresentados nos histogramas da Figura 14. Para AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  (Figura 14E) observou-se razão de aspectos igual a 1,2, tendo maior distribuição entre 1,0 e 1,2, indicando maior

circularidade. As demais nanopartículas apresentaram razão de aspecto de maior frequência entre 1,1 e 1,2.



**Figura 14:** Histogramas da razão de aspectos (eixo maior/eixo menor) referentes ao processamento das imagens da AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB, (A) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$ , (B) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$ , (C) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$ , (D) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$ , (E) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  e (F) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ .

A partir dos valores  $D_h$  foi possível estimar a concentração molar das nanopartículas obtidas, a partir da utilizando das equações propostas por Liu *et al.* [37] (Equação 6).

$$C = \frac{N_T}{NVN_A} \quad (6)$$

Onde C é a concentração de nanopartículas em mol L<sup>-1</sup> estimada, N<sub>T</sub> é o número total de átomos de Au com base na massa inicial da fonte de Au, V é o volume da dispersão (em litros), N<sub>A</sub> é a constante de Avogadro e N é o número de átomos de Au, dado pela Equação 7 [37].

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6M} \quad (7)$$

Onde D é o diâmetro médio das partículas (nm), ρ é a densidade média das nanopartículas assumindo ser igual à densidade de Au, cujo valor é 19,3 g cm<sup>-3</sup>, e M é a massa molar de Au (197 g mol<sup>-1</sup>). A partir destas equações estimaram-se os valores de concentração de nanopartículas nas dispersões de síntese, estes são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Valores estimados das concentrações de nanopartículas de ouro nas dispersões de síntese.

<b>AuNPs-CTAB-10<sup>-2</sup></b>	<b>AuNPs-CTAB-10<sup>-3</sup></b>	<b>AuNPs-CTAB-10<sup>-4</sup></b>
8,2 × 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup>	8,4 × 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup>	6,0 × 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup>
<b>AuNPs-C10DAB-10<sup>-2</sup></b>	<b>AuNPs-C10DAB-10<sup>-3</sup></b>	<b>AuNPs-C10DAB-10<sup>-4</sup></b>
8,7 × 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup>	7,5 × 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup>	2,5 × 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup>

Os valores medidos de pH das dispersões de síntese foram bem similares, com um valor médio 7,2, com variação de 1,7% de uma dispersão para outra, mostrando claramente que a variação na concentração dos surfactantes não interfere no pH do meio.

### 3.2.

#### **Avaliação da influência da temperatura e tempo de estocagem das AuNPs-CTAB e das AuNPs-C10DAB**

De modo a investigar o comportamento das nanopartículas em termos de estabilidade, foi realizado o acompanhamento dos perfis espectrais (variação do  $\lambda_{\max}$  da banda LSPR), bem como do Dh e do potencial  $\zeta$ , das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB durante o período de 12 meses, tanto para as estocadas a 4 °C quanto para aquelas estocadas a 27 °C. Os resultados desse estudo estão resumidos na Tabela 8 e Tabela 9.

De uma maneira geral observou-se que houve uma tendência de aumento no diâmetro médio, justificado pelo aumento no valor do comprimento de onda máximo da banda LSPR das nanopartículas, independente da temperatura de estocagem. Todavia esse crescimento foi mais pronunciado para as nanopartículas estocadas a 27°C. Este fenômeno pode ser explicado pela energia cinética na temperatura ambiente ser maior, propiciando maior taxa de crescimento por conta da taxa de colisão. Também se observou que houve uma tendência de estabilização do plasmon mais rápida na temperatura ambiente, em comparação com o tempo requerido de estabilização das nanopartículas estocadas a 4°C, com destaque para AuNPs-C10DAB-10<sup>-2</sup> estocadas a 4°C, que demandou um longo tempo para que ocorresse a estabilização do  $\lambda_{\max}$ . Para grande parte das nanopartículas verificou-se um leve decréscimo no valor do potencial  $\zeta$  em função do tempo, o que pode indicar que aos poucos moléculas de surfactantes tendem a se desligar da superfície das nanopartículas. Por outro lado, foi curioso que para AuNPs-C10DAB-10<sup>-4</sup> estocadas em ambas as temperaturas, o valor do potencial tende a aumentar, porém não conferindo decréscimo no tempo de estabilização do  $\lambda_{\max}$ . Dentre as nanopartículas, as AuNPs-CTAB-10<sup>-4</sup> apresentaram menor  $\Delta\lambda_{\max}$ , independente da temperatura de estocagem.

**Tabela 8:** Resumo dos dados obtidos após as análises temporais realizadas em nanopartículas estocadas sob refrigeração (4°C)

Identificação	$\lambda$ max. após a síntese (nm)	$\lambda$ max. final* (nm)	$\Delta\lambda$ max (nm)	Estabilização do $\lambda$ max (dias)	Dh (inicial)**	Dh final*(nm)	Potencial $\zeta$ inicial** (mV)	Potencial $\zeta$ final* (mV)
AuNPs-CTAB-10 <sup>-2</sup>	512	523	11	56	18,1 ± 0,6	22,5 ± 2,4	+124,7 ± 1,5	+112,2 ± 1,9
AuNPs-CTAB-10 <sup>-3</sup>	519	521	2	95	17,9 ± 1,4	17,5 ± 4,6	+113,0 ± 2,2	+97,8 ± 5,3
AuNPs-CTAB-10 <sup>-4</sup>	522	523	1	92	20,0 ± 6,8	21,7 ± 6,8	+68,3 ± 4,6	+38,8 ± 6,5
AuNPs-C10BAB-10 <sup>-2</sup>	513	525	12	239	17,7 ± 0,6	24,8 ± 1,4	+93,3 ± 3,4	+98,1 ± 3,3
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-3</sup>	522	524	2	84	18,6 ± 4,3	23,1 ± 0,8	+64,4 ± 1,8	+58,5 ± 1,0
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-4</sup>	525	529	4	111	26,8 ± 5,4	30,1 ± 4,7	+38,1 ± 2,9	+48,8 ± 2,4

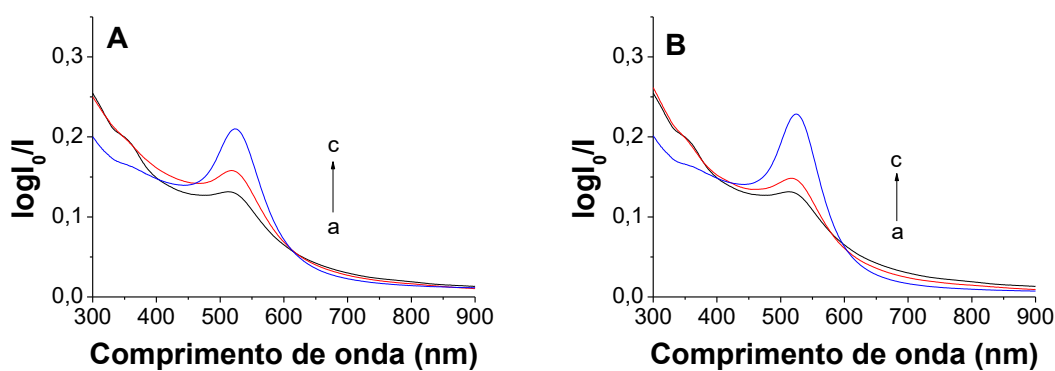
\* Final refere-se a última medida realizada. \*\*Inicial refere-se à primeira medição feita 1 dia após a síntese das nanopartículas.

**Tabela 9:** Resumo dos dados obtidos após as análises temporais realizadas em nanopartículas estocadas à temperatura ambiente (27°C).

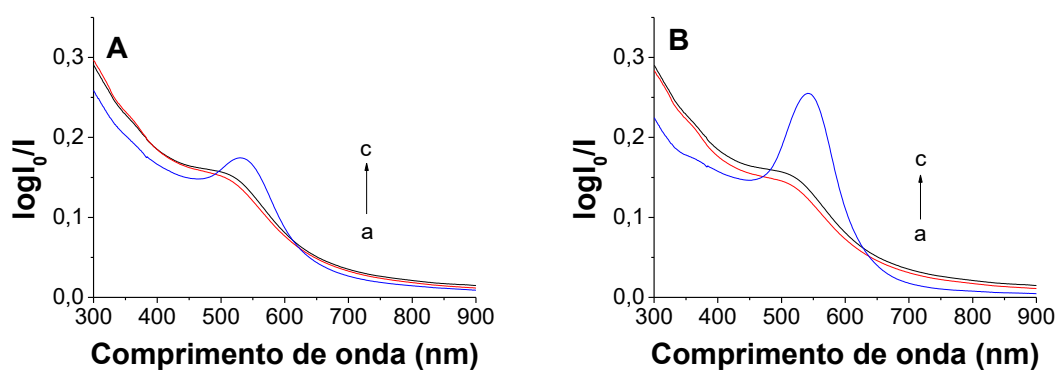
Identificação	$\lambda$ max. após a síntese (nm)	$\lambda$ max. final* (nm)	$\Delta\lambda$ max (nm)	Estabilização do $\lambda$ max (dias)	Dh (inicial)**	Dh final*(nm)	Potencial $\zeta$ inicial** (mV)	Potencial $\zeta$ final* (mV)
AuNPs-CTAB-10 <sup>-2</sup>	512	524	12	11	18,1 ± 0,6	26,5 ± 6,6	+124,7 ± 1,5	+115,7 ± 2,1
AuNPs-CTAB-10 <sup>-3</sup>	519	523	4	38	17,9 ± 1,4	19,8 ± 1,8	+113,0 ± 2,2	+98,4 ± 3,2
AuNPs-CTAB-10 <sup>-4</sup>	522	524	2	35	20,0 ± 6,8	23,5 ± 6,9	+68,3 ± 4,6	+41,8 ± 2,1
AuNPs-C10BAB-10 <sup>-2</sup>	513	541	28	156	17,7 ± 0,6	35,2 ± 1,0	+93,3 ± 3,4	+88,7 ± 3,0
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-3</sup>	522	526	4	27	18,6 ± 4,3	26,8 ± 6,1	+64,4 ± 1,8	+75,6 ± 2,4
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-4</sup>	525	536	11	***	26,8 ± 5,4	36,5 ± 9,9	+38,1 ± 2,9	+51,1 ± 1,4

\* Final refere-se a última medida realizada , \*\*Inicial refere-se a primeira medição feita 1 dia após a síntese das nanopartículas. \*\*\*Não houve estabilização da LSPR

Adicionalmente também foi monitorada a variação na intensidade da banda LSPR das nanopartículas. Observou-se que para AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  a modificação no perfil de UV-Vis foi significativa conforme visto na Figura 15. Em apenas 24 h já havia ocorrido aumento na intensidade banda LSPR, sendo este significativo com o passar dos dias, o que tornou a banda plasmônica bem definida. Por outro lado, para AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$  (Figura 16) verificou-se, em 24 h, que a modificação no perfil foi sutil, variando pouco ao longo do tempo quando para as nanopartículas estocadas a 4°C. Todavia, para as nanopartículas estocadas à temperatura ambiente, a modificação no perfil foi relevante, com aumento na intensidade máxima em até 85% em relação à extinção medida inicialmente.



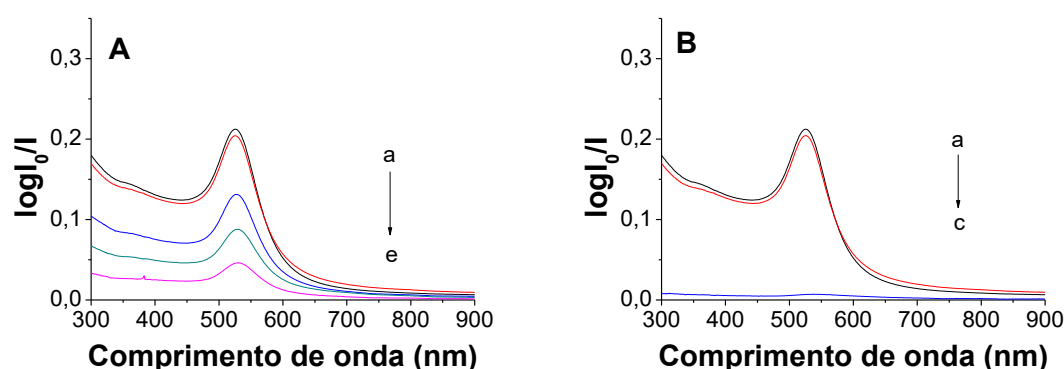
**Figura 15:** Variação nos perfis espectrais das AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  estocadas: (A) temperatura de 4°C, no dia da síntese (a), 1 dia após a síntese (b) e 56 dias após a síntese (c), e (B) na temperatura ambiente, no dia da síntese (a), 1 dia após a síntese (b) e 56 dias após a síntese (c).



**Figura 16:** Variação nos perfis espectrais das AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$  estocadas: (A) temperatura de 4°C, no dia da síntese (a), 1 dia após a síntese (b) e 239 dias após a síntese (c), e (B) na temperatura ambiente, no dia da síntese (a), 1 dia após a síntese (b) e 239 dias após a síntese (c).

De um modo geral, a intensidade do  $\lambda_{\text{max}}$  da banda LSPR para as demais nanopartículas (AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB) aumentou com passar do tempo,

sendo os percentuais mínimos e máximos iguais a 7 e 28% para AuNPs-CTAB  $10^{-3}$  estocada a 4 °C e a temperatura ambiente, respectivamente. Entretanto, para AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ , o comportamento não foi o mesmo, pois constatou-se que intensidade do  $\lambda_{\max}$  diminuiu ao longo do tempo conforme visto na Figura 17, indicando que as nanopartículas se desfazem. Quando essas nanopartículas foram estocadas na temperatura ambiente, após 83 dias da síntese, já não foi mais possível observar sinal no UV-Vis, o que caracteriza a inexistência de nanopartículas de ouro. Também se verificou que essa dispersão de síntese estava transparente. A temperatura de 4 °C, o desaparecimento dessas nanopartículas foi mais lento, sendo possível observar ainda algum sinal após 154 dias da síntese. Conclui-se que para o C10DAB, em concentração uma ordem de grandeza abaixo da CVC, o capeamento não é efetivo, sendo os monômeros livres responsáveis pela degradação das nanopartículas.



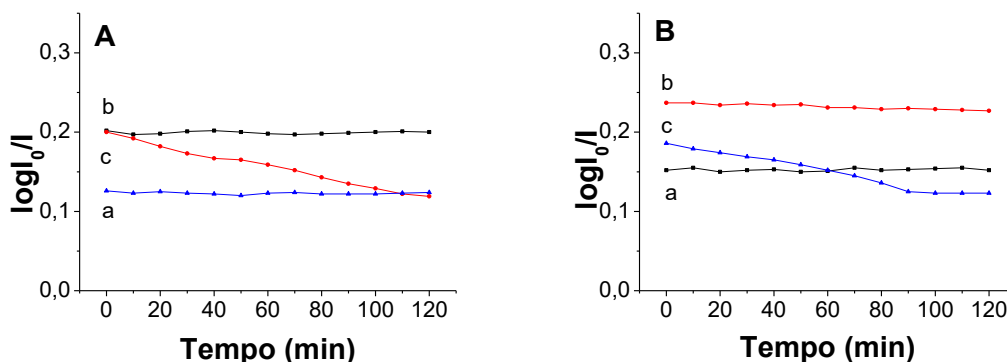
**Figura 17:** Variação nos perfis espectrais das AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$  estocadas: **(A)** temperatura de 4°C, (a) no dia da síntese, (b) 26 dias após a síntese, (c) 83 dias após a síntese, (d) 111 dias após a síntese e (e) 154 dias após a síntese e **(B)** temperatura ambiente, (a) no dia da síntese, (b) 26 dias após a síntese e (c) 83 dias após a síntese.



### 3.3.

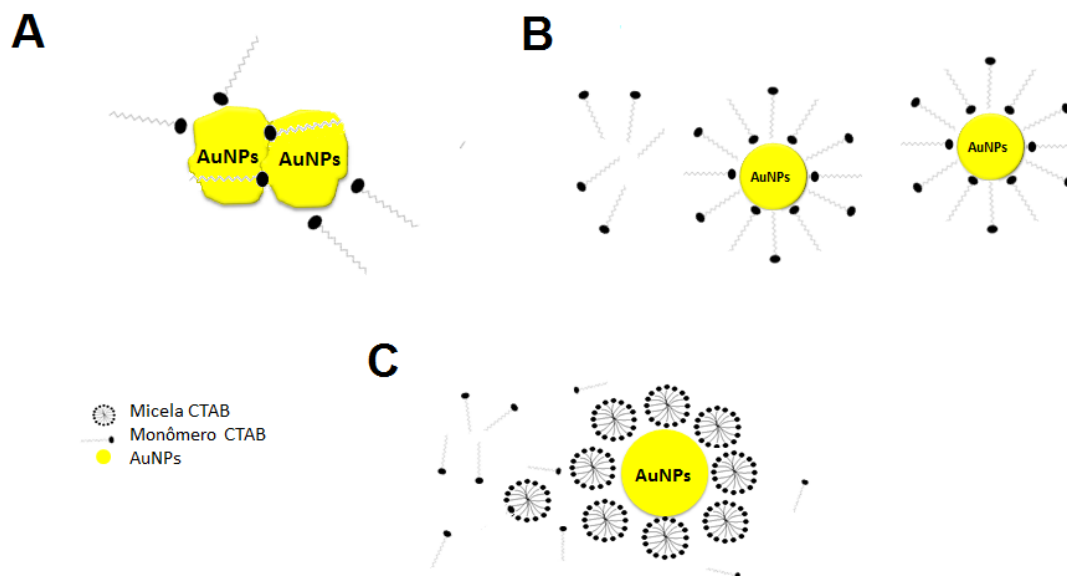
#### Avaliação da estabilidade das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB

A estabilidade das bandas LSPR das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB foi avaliada durante o intervalo de 120 min, após o preparo das dispersões diluídas a 20% v/v. Para tal, o comprimento de onda máximo da banda LSPR foi monitorado apenas para as nanopartículas estocadas a 4 °C. Os resultados apresentados na Figura 18(A e B), indicaram que para a AuNPs-CTAB- $10^{-4}$  e AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$  não eram estáveis, pois o sinal decresceu ao longo do tempo. Ao longo das medições foi verificado também que essas dispersões tendiam para coloração azul, o que é um indicativo de agregação das nanopartículas. Uma vez que a concentração nas dispersões de nanopartículas com menor concentração de surfactante ( $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) está muito abaixo da CMC/CVC, o surfactante deixa de ter efeito de agente de recobrimento e passa a funcionar como ponte de agregação de nanopartículas. Uma proposta para estas estruturas em dispersões diluídas 20% v/v é apresentada nas Figura 19A e Figura 20A.



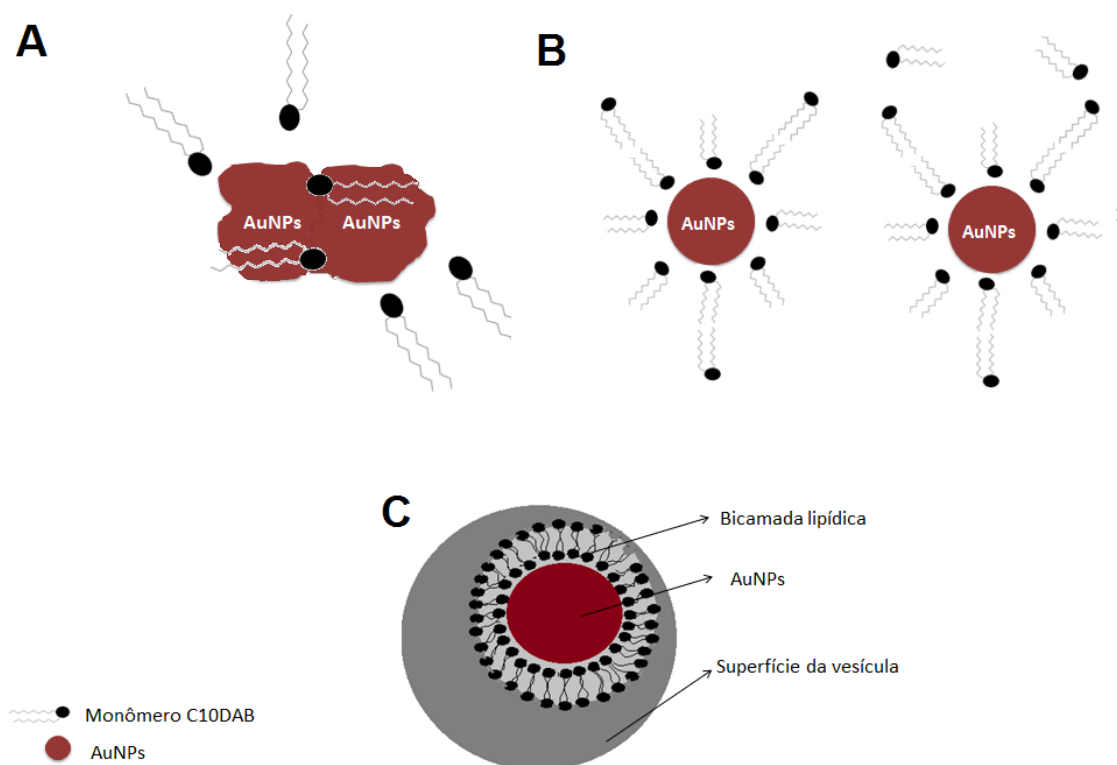
**Figura 18:** Perfil de estabilidade de medições feitas durante 120 min para (A): (a) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$ , (b) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$ , (c) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$ , e (B): (a) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$ , (b) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  e (c) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ .

Quando as AuNPs-CTAB- $10^{-3}$  e AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  são diluídas a 20% v/v, a concentração de surfactante na dispersão cai para  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , abaixo da CMC/CVC, porém ainda garantindo a estabilidade das nanopartículas, apresentando uma variação relativa de  $\lambda_{\text{max}}$  abaixo de 3%. Nesse caso pode-se concluir que monômeros de surfactantes circundam as nanopartículas, protegendo-as da agregação, conforme visto nas Figura 19B e Figura 20B.



**Figura 19:** Proposta de estruturas de AuNPs-CTAB em dispersões diluídas 20% v/v. (A) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$ , (B) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$  e (C) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$ .

Para AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  e AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$  a concentração de surfactante na dispersão diluída 20% v/v cai para  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , um pouco acima da CMC/CVC, assim imagina-se que micelas esferoidais e vesículas circundam as nanopartículas capeando-as completamente, o que confere estabilidade para as dispersões diluídas.



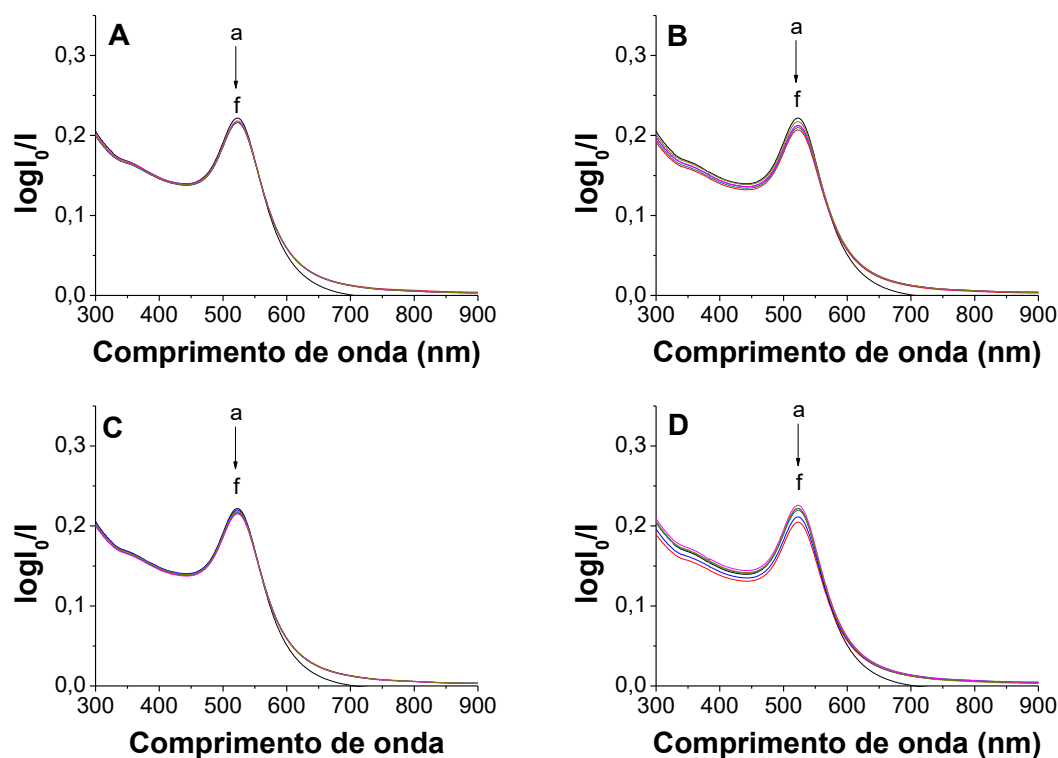
**Figura 20:** Proposta de estruturas de AuNPs-C10DAB em dispersões diluídas 20% v/v. (A) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ , (B) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  e (C) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$ .

### 3.4.

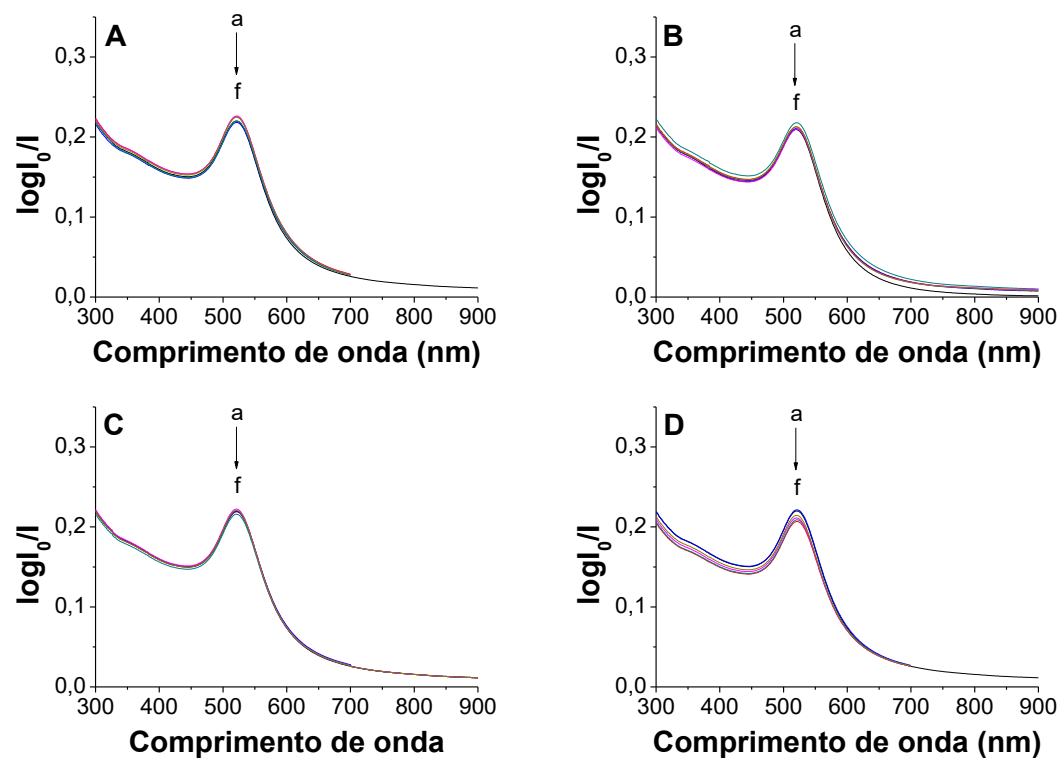
#### Estudo do comportamento das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB na presença de aminoglicosídeos

Um estudo de avaliação da resposta óptica, daquelas dispersões diluídas das nanopartículas (20% v/v) que apresentaram estabilidade por pelo menos 120 min, foi realizado na presença dos AMGs canamicina, estreptomicina, gentamicina e neomicina, todos na forma de sulfato, nos níveis de concentração variando de 12 a 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os perfis espectrais no UV-Vis das dispersões na presença dos AMGs são apresentados nas Figura 21, Figura 22 e Figura 23. Os resultados indicaram que não houve interação significativa dos AMGs com as nanopartículas, possivelmente porque os surfactantes impediram que os grupos amino dos AMGs se ligassem à superfície das nanopartículas.

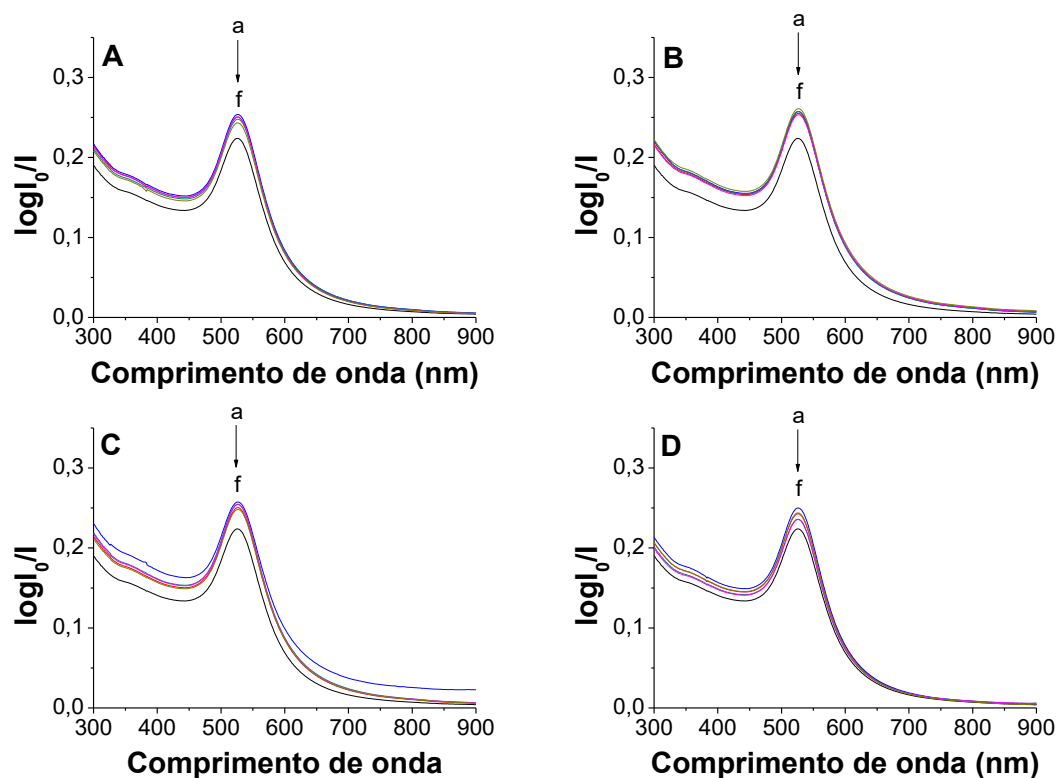
Não foi estudado interação dos AMGs com AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$ , pois concluiu-se que o excesso de surfactante no meio inibe totalmente a possibilidade de interação.



**Figura 21:** AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  em presença de AMGs na variação de: (a) ausência do AMG, (b)  $12 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $120 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  e (f)  $1200 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo em (A) sulfato de canamicina, (B) sulfato de estreptomicina, (C) sulfato de gentamicina, e (D) sulfato de neomicina.



**Figura 22:** AuNPs-CTAB- $10^{-3}$  em presença de AMGs na variação de : (a) ausência do AMG, (b)  $12 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $120 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  e (f)  $1200 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo em (A) sulfato de canamicina, (B) sulfato de estreptomicina, (C) sulfato de gentamicina, e (D) sulfato de neomicina.



**Figura 23:** AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  em presença de AMGs na variação de : (a) ausência do AMG, (b)  $12 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $120 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  e (f)  $1200 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo em (A) sulfato de canamicina, (B) sulfato de estreptomicina, (C) sulfato de gentamicina, e (D) sulfato de neomicina.

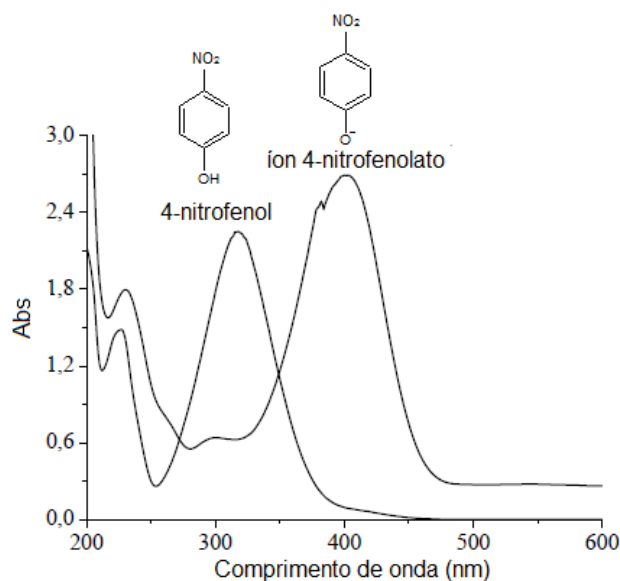
### 3.5.

#### Avaliação da atividade catalítica das AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB

Uma vez que as nanopartículas obtidas não interagiram como se esperava com os AMGs, fez a medição da atividade catalítica das mesmas, de forma a verificar se havia diferença em relação ao tipo de recobrimento/concentração do surfactante. Assim, fez-se um estudo cinético modelado pela redução do 4-nitrofenol por  $\text{NaBH}_4$  a temperatura ambiente, na de AuNPs-CTAB e de AuNPs-C10DAB.

Na Figura 24 é possível observar as banda de absorvância características do 4-nitrofenol ( $\lambda_{\text{max}}$  em 317 nm) e o do íon 4-nitrofenolato ( $\lambda_{\text{max}}$  em 401 nm). Quando se adiciona  $\text{NaBH}_4$  a uma solução de 4-nitrofenol ocorre a formação do 4-nitrofenolato e consequentemente o desaparecimento da banda do 4-nitrofenol. Assim o monitoramento foi feito em 401 nm, de modo a acompanhar o decréscimo gradativo na intensidade da banda quando as AuNPs estavam presentes no meio. O desaparecimento da banda do íon 4-nitrofenolato (consumo) corresponde à formação de 4-aminofenol, que absorve em comprimento de onda mais baixo. É sabido que as nanopartículas de ouro atuam

como transportadores de hidreto, promovendo a redução do grupo nitro, para grupo amina [107].

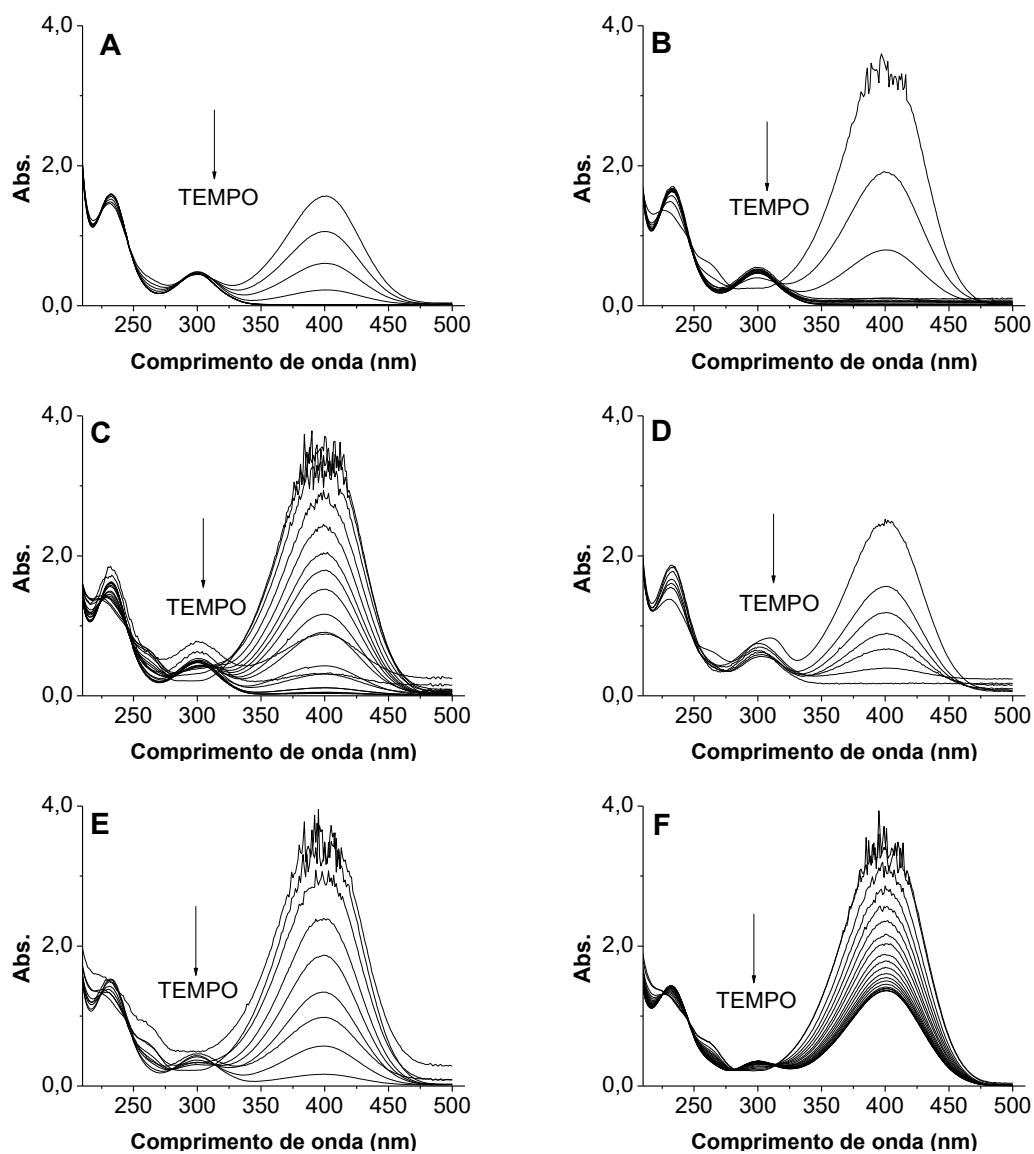


**Figura 24:** Espectro de UV-Vis para o 4-nitrofenol e íon 4-nitrofenolato. Adaptado de Toloza [103].

As taxas de reação (velocidades de reação) podem ser consideradas independentes em relação ao  $\text{NaBH}_4$  devido ao seu grande excesso, podendo-se assumir, para este experimento, que a cinética de primeira ordem (sob condições de pseudo-primeira ordem) pode ser usada para modelar o efeito catalítico das nanopartículas. Deste modo, as constantes de velocidade aparente podem ser calculadas a partir da diminuição da intensidade da banda do íon 4-nitrofenolato a 401 nm (Figura 25), seguindo o raciocínio proposto por Seoudi e Said [103].

As taxas de constante de velocidade aparente ( $k_1$ ) e demais parâmetros do modelo cinético são apresentadas na Tabela 10. Verificou-se que o aumento da concentração de surfactante no meio promoveu o aumento da velocidade de reação, sendo maior para o surfactante catiônico de 1 cauda (CTAB), que para o de 2 caudas (C10DAB). Para a redução catalítica com AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$ , mesmo após 10 h de monitoramento, não foi possível observar o completo desaparecimento da banda do íon 4-nitrofenilato, o que prova que fato o recobrimento das nanopartículas não é efetivo e que as nanopartículas podem aglomerar perdendo o efeito de confinamento, conforme visto em estudos anteriores. Todavia, o curioso é que para AuNPs-CTAB- $10^{-4}$  o

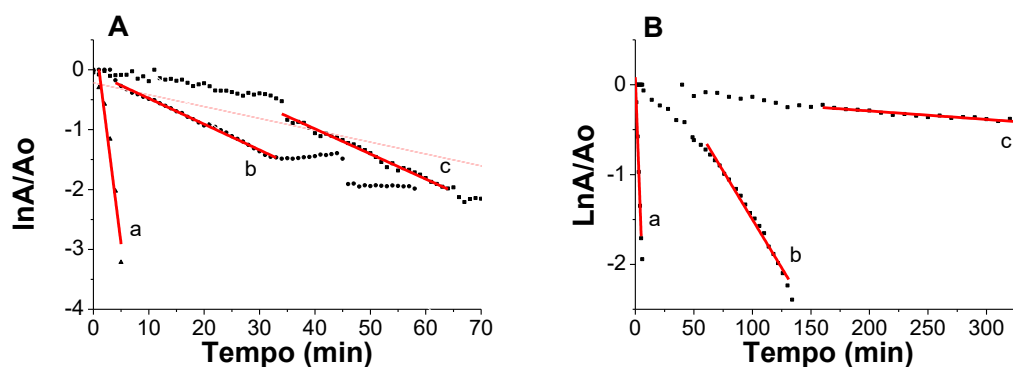
comportamento não foi o mesmo, sendo o íon 4-nitrofenolato consumido em até 180 min.



**Figura 25:** Espectros UV-Vis para a redução catalítica do 4-nitrofenol. Redução catalisada por: (A) AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  – Até 8 minutos, (B) AuNPs-CTAB- $10^{-3}$  – Até 20 minutos, (C) AuNPs-CTAB- $10^{-4}$  – Até 180 minutos, (D) AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$  – Até 12 minutos, (E) AuNPs-C10DAB- $10^{-3}$  – Até 80 minutos e (F) AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$  – Até 600 minutos.

**Tabela 10:** Parâmetros da atividade catalítica das nanopartículas.

ID	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	Equação	R <sup>2</sup>	Faixa de tempo linear (min)
AuNPs-CTAB-10 <sup>-2</sup>	1,5 x 10 <sup>-2</sup>	y = -0,9269x + 1,4781	0,98	2 – 6
AuNPs-CTAB-10 <sup>-3</sup>	7,1 x 10 <sup>-4</sup>	y = -0,0426x - 0,0564	0,99	5 – 34
AuNPs-CTAB-10 <sup>-4</sup>	6,8 x 10 <sup>-4</sup>	y = -0,0405x + 0,6112	0,98	35 – 65
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-2</sup>	5,9 x 10 <sup>-3</sup>	y = -0,3572x + 0,1265	0,99	0 – 6
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-3</sup>	4,7 x 10 <sup>-4</sup>	y = -0,0218x + 0,6808	0,98	62 – 132
AuNPs-C10DAB-10 <sup>-4</sup>	2,8 x 10 <sup>-5</sup>	y = -0,0017x + 0,0325	0,95	160 – 220

**Figura 26:** Perfil temporal do decréscimo de  $\ln(A/A_0)$  para o íon 4-nitrofenolato (401 nm) na presença de **(A):** AuNPs em CTAB (a), AuNPs-CTAB-10<sup>-2</sup> (b) AuNPs-CTAB-10<sup>-3</sup>, (c) AuNPs-CTAB-10<sup>-4</sup> e **(B):** AuNPs em C10DAB (a), AuNPs-C10DAB-10<sup>-2</sup>, (b) AuNPs-C10DAB-10<sup>-3</sup> e (c) AuNPs-C10DAB-10<sup>-4</sup>.

Satapathy *et al.* [115], ao estudaram a redução catalítica do 4-nitrofenol na presença de AuNPs capeadas por CTAB e também concluíram que o aumento da concentração de surfactante aumenta a taxa de reação. O processo de adsorção molécula-metal é acompanhado por uma transferência de carga significativa da superfície para o átomo-N do grupo nitro. Assim, quanto maior a carga da superfície das nanopartículas, maior a eficiência catalítica, sendo os dados de potencial  $\zeta$  da Tabela 6, um bom indício para o fato de que as taxas de reação das nanopartículas capeadas em CTAB (potenciais  $\zeta$  mais elevados) terem sido maiores que para as capeadas em C10DAB [10].



## 4

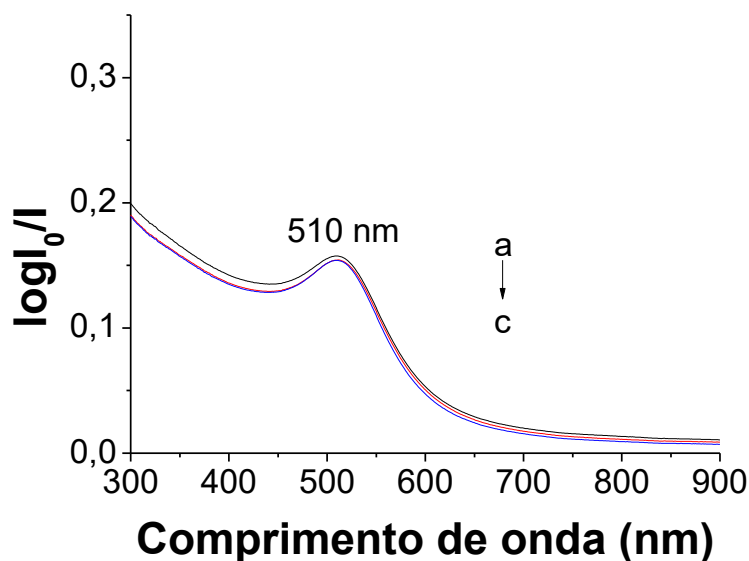
# Avaliação do potencial analítico das nanopartículas de ouro dispersas em água sem capeamento orgânico (AuNPs-H)

### 4.1.

#### Síntese das AuNPs-H

Para a realização dos estudos quantitativos, as AuNPs-H foram obtidas seguindo o procedimento descrito por Xu *et al.* [31], adaptando a síntese para ser realizada em reator, conforme descrito no capítulo III. Como inicialmente se obteve boa repetição de perfil espectral e intensidade de banda LSPR nas triplicatas de sínteses (conforme visto na Figura 27), um total de oito partidas (de 360 mL cada) foram realizadas e seus conteúdos misturados até se obter um volume de aproximadamente 3 L de AuNPs-H. Isso foi realizado, pois para se realizar o estudo de cunho quantitativo houve a necessidade de maior quantidade de dispersão de AuNPs-H. Em conformidade com o descrito no capítulo III, após as sínteses todas as dispersões foram mantidas em repouso em copos Becker por 2 h, para que em seguida fossem obtidos os perfis espectrais (na dispersão diluída 20% v/v) de forma a assegurar o sucesso na obtenção das nanopartículas antes de proceder a mistura de partidas. Após homogeneização das partidas de sínteses, as dispersões de AuNPs-H foram armazenadas em frascos de vidro ao abrigo da luz, a uma temperatura de 4°C. Um volume de 100 mL da dispersão homogeneizada foi estocado em temperatura ambiente (27 °C) em frasco âmbar, para realização de um breve comparativo quanto à estabilidade de estocagem. O pH da dispersão de síntese homogeneizada foi medido, e obteve-se um valor de 7,1.

A caracterização das AuNPs-H foi feita por DLS e por STEM será detalhada mais a frente nos itens 4.2 e 4.7. A partir do diâmetro médio obtido por DLS ( $11,6 \pm 0,9$  nm) estimou-se a concentração de  $3,1 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> de AuNPs-H, através da Equação 6 e Equação 7, já apresentadas no item 3.1.

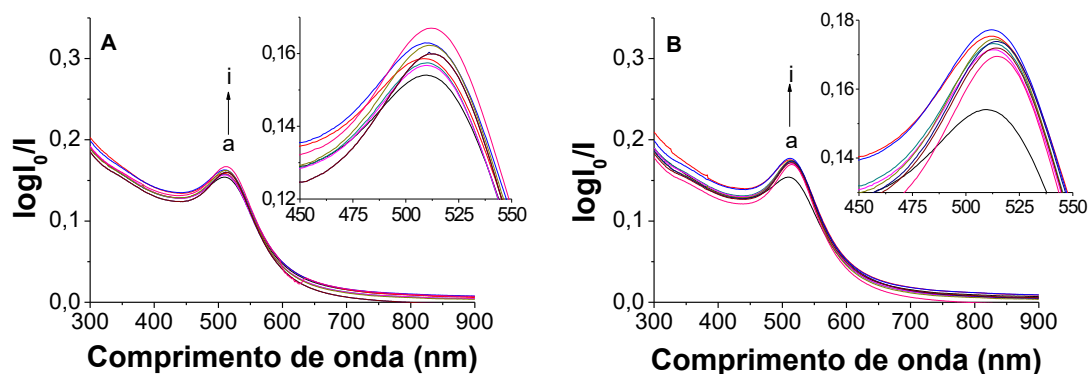


**Figura 27:** Perfis espectrais no UV-Vis das triplicatas (a-c) de sínteses das AuNPs-H.

#### 4.2.

#### **Avaliação da estabilidade estocagem em função da temperatura, e composição de AuNPs-H nas dispersões de trabalho**

Assim como descrito para as demais nanopartículas de ouro, o estudo de estabilidade de estocagem (4 e 27 °C) também foi realizado com AuNPs-H, no período de 1 ano. Para esta avaliação, foram obtidos espectros de extinção no UV-Vis, a partir de dispersões diluídas 20% v/v de AuNPs-H. Para as nanopartículas de ouro estocadas a 4 °C (Figura 28A) observou-se pouca variação na intensidade máxima da banda LSPR (CV de 2,4%), durante o período avaliado. Todavia, constatou-se que após 10 dias da síntese, o comprimento de onda máximo da banda LSPR teve um deslocamento batocrômico de 1 nm, permanecendo estável por 7 meses. Após esse período até completar 1 ano da data de síntese houve um deslocamento de mais 4 nm, de forma o  $\lambda_{\text{max}}$  chegou a 515 nm. A partir desta constatação estabeleceu-se que o tempo útil de utilização dessas nanopartículas seria de até 7 meses da data de obtenção.



**Figura 28:** Perfis espectrais no UV-Vis das AuNPs-H estocadas a 4°C (A) e a 27 °C (B): no dia da síntese (a), 10 dias após a síntese (b), 48 dias após a síntese (c), 105 dias após a síntese (d), 133 dias após a síntese (e), 176 dias após a síntese (f), 259 dias após a síntese (g), 322 dias após a síntese (h) e 358 dias após a síntese (i). Com detalhe da ampliação da variação do  $\lambda_{\text{max}}$  da LSPR

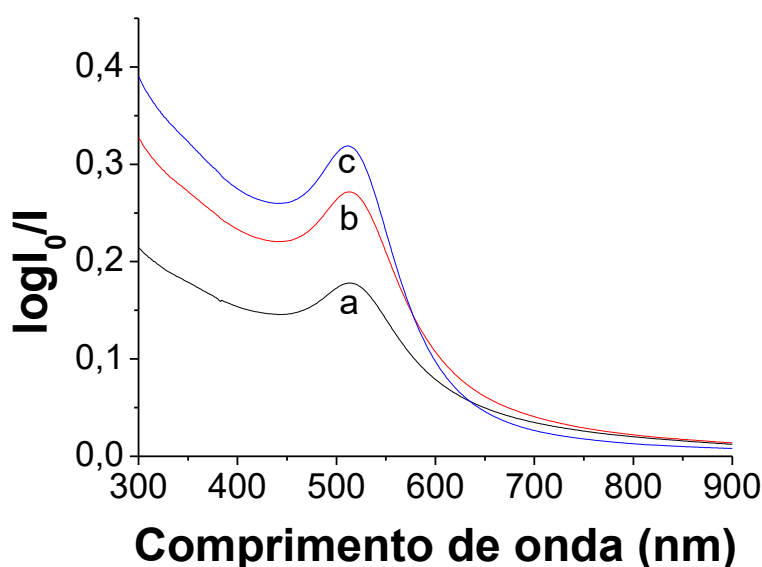
Os resultados para as AuNPs-H estocadas a 27 °C (Figura 28B) indicaram que após 10 dias da síntese também houve um deslocamento batocrômico de 1 nm, todavia esse deslocamento é crescente nas medições seguintes, em 48 dias o  $\lambda_{\text{max}}$  é de 512 nm, chegando até 515 nm em 259 dias. Por outro lado a intensidade máxima da banda LSPR até 10 dias teve uma variação de 13,8%, sendo esta praticamente estável ao relação de período subsequente de monitoramento. Os resultados das medidas de Dh e de potencial  $\zeta$  realizadas no dia da síntese e após 100 dias são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Resultados de Dh e de potencial  $\zeta$  para AuNPs-H estocadas sob refrigeração (4°C) e em temperatura ambiente (27°C).

Temperatura estocagem	Dh no dia da síntese (nm)	Dh após 100 dias da síntese (nm)	Potencial $\zeta$ no dia da síntese (mV)	Potencial $\zeta$ após 100 dias da síntese (mV)
4°C	11,6 ± 0,9	14,3 ± 1,4	-13,8 ± 1,3	-34,5 ± 2,8
27°C	11,6 ± 0,9	16,6 ± 6,0	-13,8 ± 1,3	-43,7 ± 2,4

Os resultados de potencial  $\zeta$  indicam que há um aumento dos íons hidreto recobrando a superfície das AuNPs-H na medida em que o tempo de estocagem aumentou, e este efeito foi maior nas nanopartículas estocadas a 27 °C. Quando ao diâmetro médio também se observa um aumento mais expressivo nas nanopartículas estocadas a 27 °C, como era de se esperar por conta da maior taxa de colisão e agregamento em tais condições. De acordo com os resultados obtidos, os estudos quantitativos foram realizados com AuNPs-H estocadas a 4 °C, por apresentarem maior estabilidade espectral.

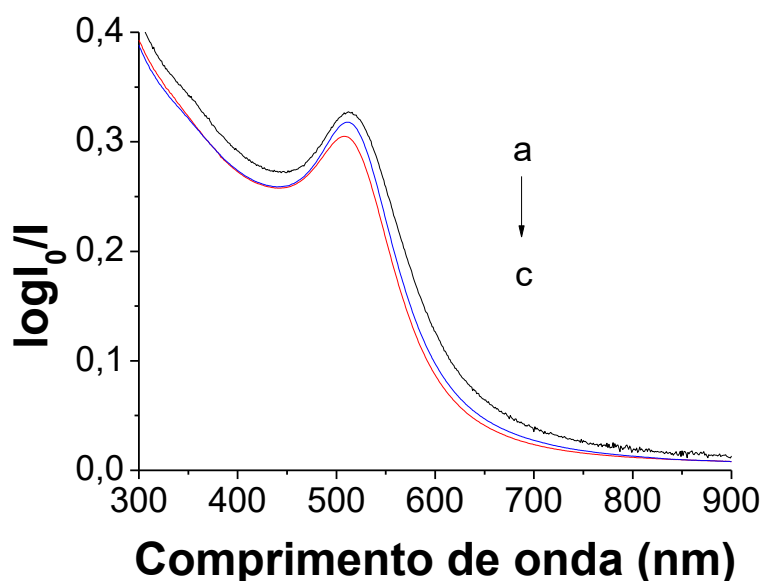
A variação na intensidade da banda LSPR em função da proporção de AuNPs-H dispersas no meio aquoso também foi avaliada. Desta forma prepararam-se dispersões diluídas contendo 20%, 32% e 40% v/v do pool de dispersões de síntese de nanopartículas de ouro, das quais os perfis de UV-Vis são mostrados na Figura 29. Escolheu-se trabalhar com condição de sonda (dispersão de trabalho) contendo 40% v/v de AuNPs-H de síntese, o que equivale a  $1,2 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> de nanopartículas, pois, das três dispersões, é a que tem maior população de nanopartículas disponível para interagir com o analito alvo e tem perfil de extinção na faixa entre 0,2 e 0,3, o que é adequado para observação de variação de sinal. A escolha dessa condição foi conveniente do ponto de vista de intensidade relativa de sinal.



**Figura 29:** Comparação da intensidade máxima da banda LSPR de dispersões de AuNPs-H constituídas por (a) 20% v/v, (b) 32% v/v e (c) 40% v/v.

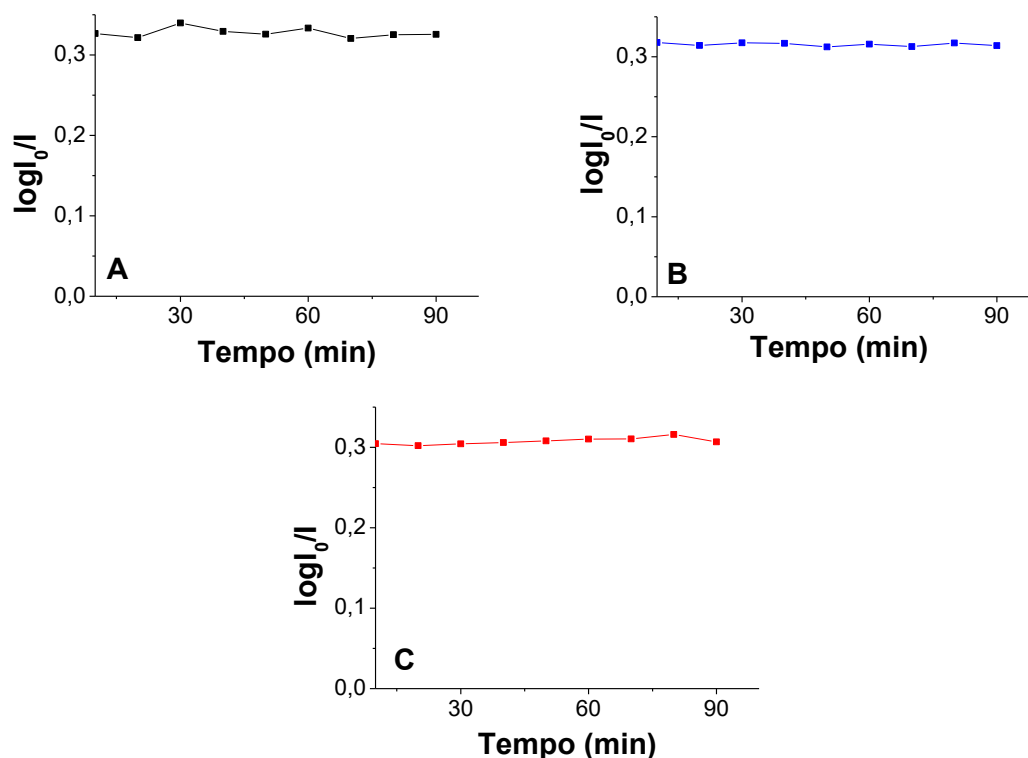
Para que se pudesse utilizar dispersões de AuNPs-H 40% v/v como potencial sonda, foi preciso avaliar o efeito da presença de tampão no sinal original da dispersão (pH original 7,1). Assim foram preparadas dispersões sem tampão, e na presença dos tampões citrato (pH 4,0) e fosfato (pH 7,2), ambos na concentração de ( $5,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>). Os perfis espectrais no UV-Vis dessas dispersões são apresentados na Figura 30. Observou-se que a presença de tampão produz um decréscimo na intensidade do sinal das AuNPs-H. Outras faixas de pH com diferentes tampões também foram avaliadas, porém sem estabilidade de sinal das dispersões 20% v/v ao longo de 90 min, ou quando

estável apresentavam distorção espectral como indicado a seguir: Tampão borato pH 8,9 (instabilidade de sinal com CV > 4%), tampão tris-HCl pH 8,2 (distorção espectral).



**Figura 30:** Perfis espectrais das dispersões de AuNPs-H diluídas a 40% v/v preparadas: (a) sem tampão, (b) na presença de tampão citrato pH 4,0 e (c) na presença de tampão fosfato pH 7,2, ambos na concentração de  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

Em seguida foi verificada a estabilidade das dispersões em um intervalo de tempo que assegurasse a realização de medições confiáveis. Portanto, avaliou-se a estabilidade em um intervalo de tempo de 90 min, monitorando-se o sinal em 511 nm ( $\lambda_{\text{max}}$ ) para dispersões AuNPs-H 40% v/v na ausência e na presença de cada um dos dois tampões (Figura 31). Os resultados indicaram variação aleatória de sinal com CV de 0,7 %, 1,7% e 1,8 % para as dispersões tamponadas com citrato e fosfato, e sem tamponamento, respectivamente. Ou seja, todas as dispersões apresentaram estabilidade em termos de perfil espectral.

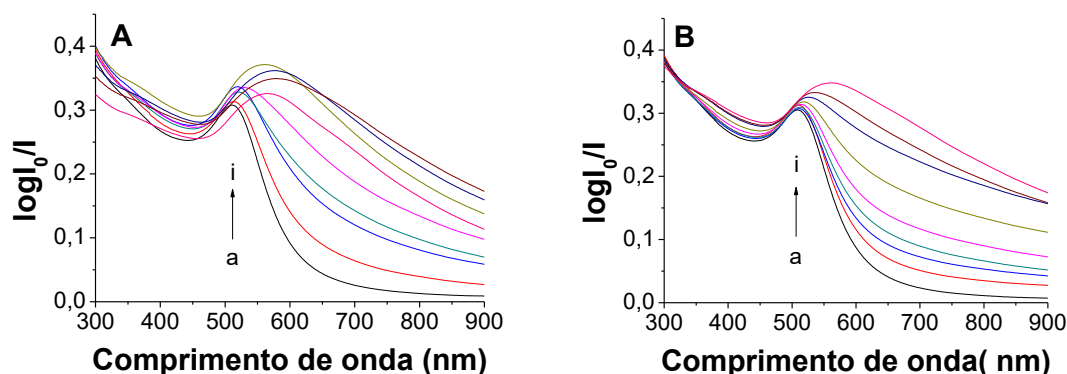


**Figura 31:** Estabilidade do sinal de dispersões de AuNPs-H 40% v/v com monitoramento em 511 nm: (A) sem tampão, (B) na presença de tampão citrato pH 4,0 e (C) na presença de tampão fosfato pH 7,2 ambos na concentração de  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.3.

##### Avaliação da interação AuNPs-H com aminoglicosídeos

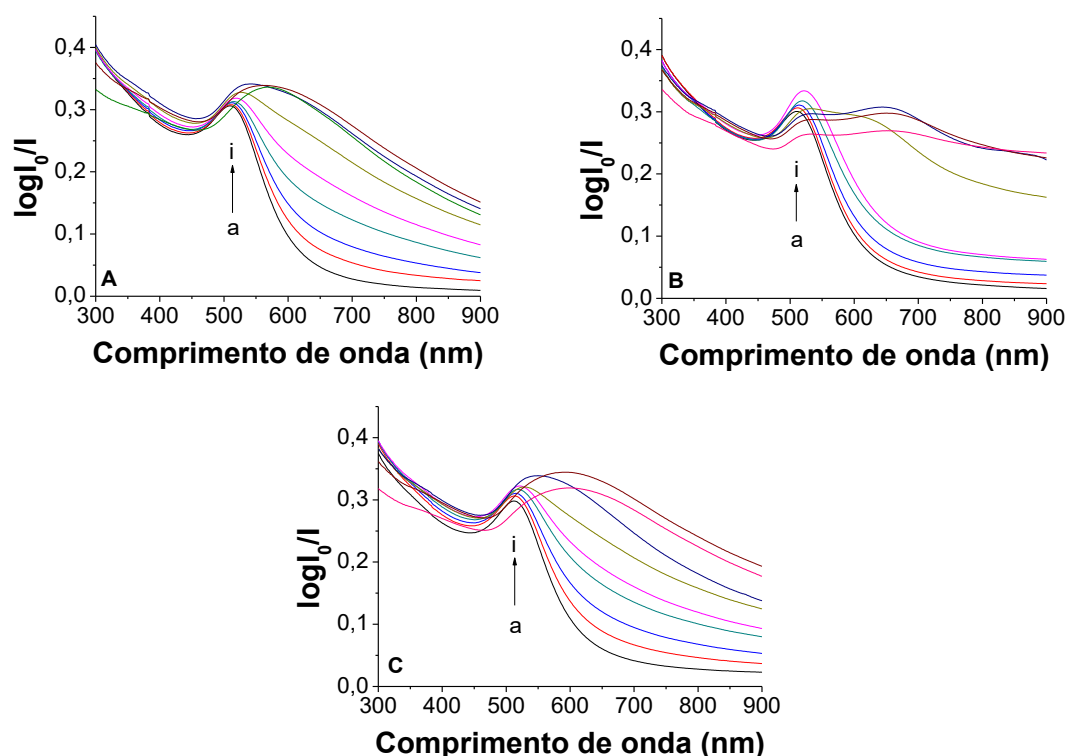
Visto que AuNPs-H tamponadas apresentaram estabilidade similar ao sistema sem tamponamento, foi investigado os potenciais destes como sondas frente ao sulfato de neomicina (na faixa de concentração de 91 a  $1453 \mu\text{g L}^{-1}$ ). No caso, as dispersões de trabalho foram constituídas por 40% v/v de AuNPs e a concentração de tampão citrato ou fosfato foi fixada em  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , de tal forma a dar capacidade de tamponamento ao sistema. Conforme visto na Figura 32, o AMG interagiu com a sonda AuNPs-H tanto em pH 4,0, como em pH 7,2.



**Figura 32:** Espectros de extinção de dispersões 40% v/v de AuNPs-H com sulfato de neomicina: (a) ausência do AMG, (b)  $91 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $182 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $273 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $364 \mu\text{g L}^{-1}$ , (f)  $546 \mu\text{g L}^{-1}$ , (f)  $910 \mu\text{g L}^{-1}$ , (h)  $1183 \mu\text{g L}^{-1}$  e (i)  $1453 \mu\text{g L}^{-1}$ . **(A)** Dispersão tamponada com citrato, pH 4,0 e **(B)** dispersão tamponada com fosfato, pH 7,2, ambos na concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

Com o objetivo futuro de utilizar alíquotas de 1,0 mL de tampão para promover a dessorção dos AMGs de cartuchos SPE (item 4.4), decidiu-se utilizar a partir do presente momento, nas dispersões de trabalho 40% v/v de AuNPs-H, o tampão citrato (pH 4,0; concentração final de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ). O pH ácido foi descrito no trabalho de Kan *et al.* [110], como apropriado para dessorção mais efetiva do AMG da matriz polimérica, por isso não foi escolhido o tampão fosfato para dar continuidade ao trabalho. Todavia o teste foi importante para demonstrar que em ambos os valores de pH (4,0 ou 7,2), não há modificação na resposta óptica da sonda.

A seguir são apresentados espectros das dispersões de trabalho de AuNPs-H na ausência e na presença de sulfato de canamicina, de sulfato de estreptomicina e de sulfato de gentamicina, na faixa de concentração de 91 a  $1453 \mu\text{g L}^{-1}$ .



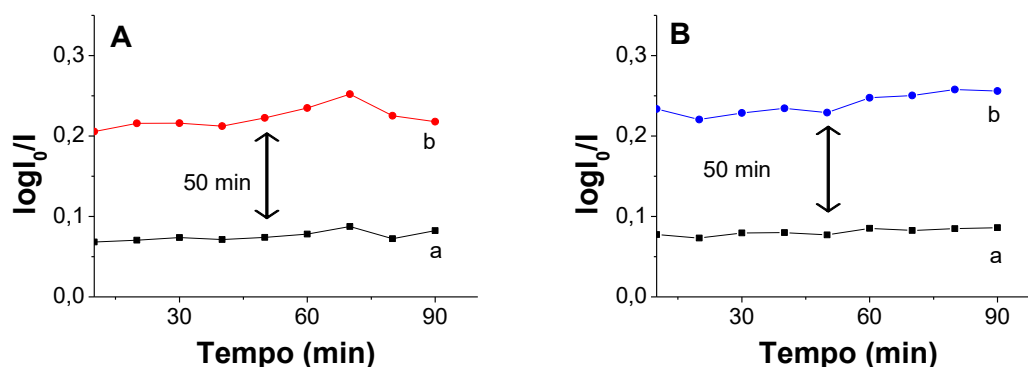
**Figura 33:** Espectros de extinção de dispersões de trabalho 40% v/v de AuNPs-H, tamponadas com citrato, contendo diferentes concentrações de AMGs: (a) ausência do AMG, (b)  $91 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $182 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $273 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $364 \mu\text{g L}^{-1}$ , (f)  $546 \mu\text{g L}^{-1}$ , (f)  $910 \mu\text{g L}^{-1}$ , (h)  $1183 \mu\text{g L}^{-1}$  e (i)  $1453 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo (A) dispersões contendo sulfato de canamicina, (B) dispersões contendo sulfato de estreptomicina e (C) dispersões contendo sulfato de gentamicina.

De modo geral, os AMG testados apresentaram um padrão de interação com as AuNPs-H muito parecido, induzindo uma modificação no perfil da banda LSPR significativamente acima de 500 nm. Há um indício de que para o sulfato de canamicina e de gentamicina a sonda tende a saturar nas duas concentrações mais altas (linhas h e i). Já a resposta óptica para sulfato de estreptomicina se mantém igual a dos demais AMGs somente até a concentração de  $364 \mu\text{g L}^{-1}$  (linha e), em concentrações superiores ocorreu a saturação do sinal da sonda, evidenciada pela distorção espectral.

Isto posto, foram escolhidos, para dar continuidade ao trabalho, os AMGs sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina. A estabilidade das dispersões de trabalho na presença desses AMG foi avaliada fixando-se as concentrações de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  para sulfato de gentamicina, e  $91 \mu\text{g L}^{-1}$  para sulfato de neomicina. O monitoramento da variação do sinal foi feita tanto em 681 nm, quanto na razão de comprimentos de onda 681/511 (Figura 34). Os resultados indicaram que ao longo de 90 min houve tendência de aumento na intensidade medida, sendo a maior variação observada (8,6%) no



monitoramento da razão 681/511 para o sulfato de gentamicina. Em contrapartida, considerando-se 50 min, essa variação decresce significativamente e não ultrapassa 3% para ambos os AMG. Assim esse foi o tempo máximo estabelecido para as realizações das medições analíticas. Analisando mais detalhadamente os gráficos da Figura 34, é possível constatar que em 681 nm a variação do sinal da sonda é menor quando comparado com a razão 681/511.



**Figura 34:** Estabilidade das dispersões de trabalho de AuNPs-H na presença de: (A) sulfato de gentamicina ( $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e (B) sulfato de neomicina ( $91 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Monitoramento em 681nm (a), e razão 681/511 nm (b).

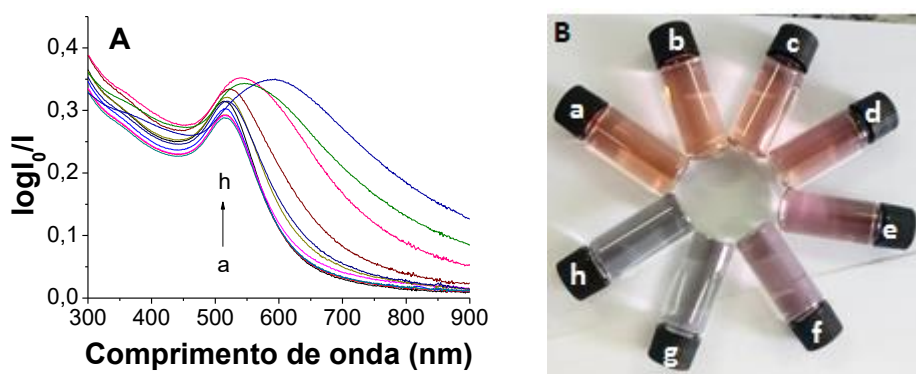
Diante dos resultados apresentados, sumarizados na Tabela 12, a condição das dispersões trabalho foram estabelecidas para a quantificação de sulfato de gentamicina e de neomicina.

**Tabela 12:** Condições estabelecidas para as dispersões de trabalho de AuNPs-H.

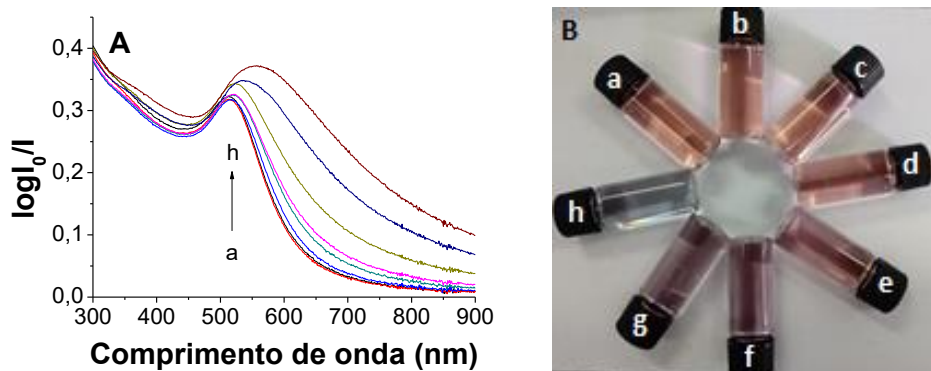
Parâmetro	Condição padronizada
pH da dispersão de trabalho	4,0 (concentração de tampão citrato na dispersão $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ )
Proporção de AuNPs-H na dispersão de trabalho	40% v/v ou $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$
Tempo máximo de medição	50 min
Monitoramento	681 nm e na razão 681/511
Volume final da dispersão de trabalho	5,0 mL

### 4.3.1. Parâmetros de mérito

Como visto, ambos o sulfato de gentamicina e o sulfato de neomicina interagem significativamente com sonda, de maneira proporcional ao aumento da concentração do AMG. Com o objetivo de refinar os resultados para efetiva quantificação desses dois AMGs, foram obtidas respostas a partir de oito dispersões de trabalho na ausência (branco) e na presença de AMG. A faixa linear de resposta em função da concentração de sulfato de gentamicina nas dispersões variou de 0,6 a 600  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e para sulfato de neomicina variou de 7,3 a 550  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Analisando as Figura 35B e Figura 36B podem ser visualizados efeitos macroscópicos de mudança de coloração indo da cor salmão para o azulado proporcional ao aumento das concentrações de sulfato de gentamicina/sulfato de neomicina, respectivamente.



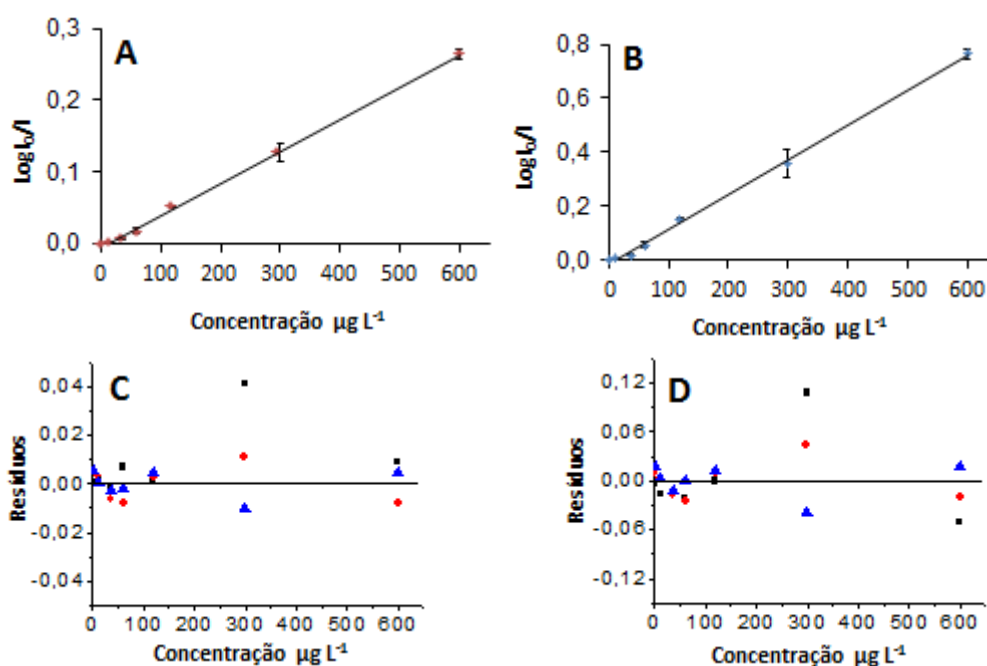
**Figura 35:** (A) Espectros das dispersões de trabalho de AuNPs-H na presença de sulfato de gentamicina nas concentrações de: (a) ausência do AMG, (b) 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (c) 3,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (d) 36,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (e) 60,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (f) 120,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (g) 420,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (h) 600  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (B) mudança de coloração do salmão para azul proporcional ao aumento da concentração de sulfato de gentamicina.



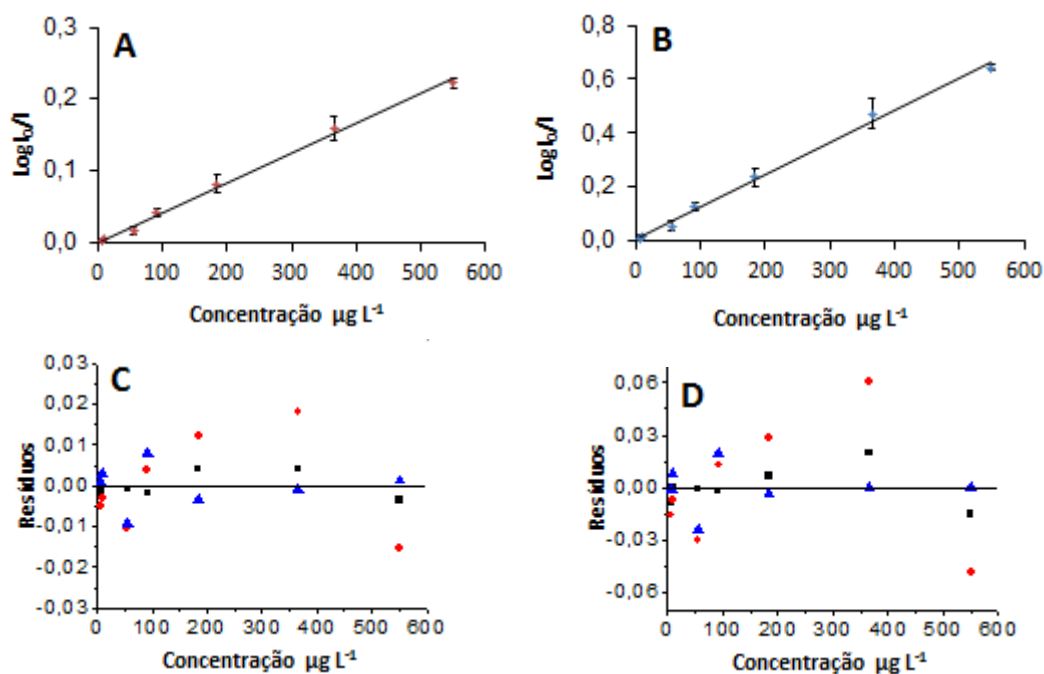
**Figura 36:** (A) Espectros das dispersões de trabalho de AuNPs-H na presença de sulfato de neomicina nas concentrações de: (a) ausência do AMG, (b)  $7,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $9,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $55,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $91,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , (f)  $184,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , (g)  $366,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e (h)  $550,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . (B) mudança de coloração do salmão para azul proporcional ao aumento da concentração de neomicina.

As concentrações de  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  para sulfato de gentamicina, e  $550 \mu\text{g L}^{-1}$  para sulfato de neomicina indicam o máximo que a sonda AuNP-H<sub>2</sub>O consegue detectar sem que ocorra saturação do sinal. Fazendo uma relação de quantidades (razão entre a quantidade de AMG e a quantidade de nanopartículas), pode-se estimar a saturação obtida nos espectros com uma proporção de aproximadamente 800 moléculas de sulfato de gentamicina por AuNPs-H e para sulfato de neomicina esse número é de 500. Em termos de concentração molar, a saturação da sonda ocorreu quando a concentração de sulfato de gentamicina foi de  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , e a de sulfato de neomicina, foi de  $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

O principal fenômeno verificado com a adição dos AMGs na dispersão de AuNPs-H foi referente ao deslocamento da banda LSPR com o aumento significativo da intensidade na faixa de 500 a 900 nm. Diante disto, para efeitos quantitativos, manteve-se o monitoramento no comprimento de onda (681 nm) descritos nos trabalhos de Santos *et al.* [73] e Miranda-Andrades *et al.* [46], pois, assim como nos trabalhos citados, a presente sonda também respondeu proporcionalmente com o aumento da concentração do AMG. Alternativamente outros autores [71] também relatam ser possível encontrar proporcionalidade a partir da razão entre um determinado comprimento de onda e o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ) da banda LSPR. No presente trabalho, de fato constatou-se que essa proposta é possível quando a razão foi obtida a partir dos comprimentos de onda 681 e 511 nm. Desta forma foi possível construir, para cada AMG, duas curvas analíticas com resposta crescente, conforme visto na Figura 37 e na Figura 38.



**Figura 37:** Curvas analíticas em função da concentração de sulfato de gentamicina ( $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $36,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $120,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $420,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $600 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em dispersões de trabalho AuNPs-H (A) curva em 681 nm, (B) curva na razão 681/511, (C) gráfico de resíduos em 681 nm e (D) gráfico de resíduos na razão 681/511.



**Figura 38:** Curvas analíticas em função da concentração de sulfato de neomicina ( $7,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $9,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $55,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $91,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $184,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $366,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $550,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em dispersões de trabalho AuNPs-H (A) curva em 681 nm, (B) curva na razão 681/511, (C) gráfico de resíduos em 681 nm e (D) gráfico de resíduos na razão 681/511.

Observando os gráficos de resíduos das Figura 37(C e D) e Figura 38(C e D) pode-se constatar um comportamento homoscedástico e distribuição aleatória dos resíduos, sendo ressaltada uma variação no penúltimo ponto para todas as curvas e suas triplicatas, de forma que acredita-se que houve uma tendência do aparato de medição utilizado. Esses resultados indicam que o modelo de regressão linear simples foi adequado. O incremento dos coeficientes de extinção em 681 nm e na razão 681/511 apresentaram tendências de reposta linear para os dois AMGs estudados os valores de coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram superiores a 0,992 para todas as quatro curvas. A sensibilidade do incremento do coeficiente de extinção foi de 0,4 e 1,4 ng L<sup>-1</sup> para sulfato de gentamicina monitorado em 681 nm e na razão 681/511, respectivamente e de 0,4 e 1,2 ng L<sup>-1</sup> para o monitoramento de sulfato de neomicina em 681 nm e na razão 681/511, respectivamente. O resumo destes resultados é apresentado na Tabela 13.

**Tabela 13:** Equações das curvas analíticas para sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina obtidas a partir das dispersões de trabalho de AuNPs-H.

AMG	Monitoramento	Equação da curva analítica	R <sup>2</sup>
Sulfato de gentamicina	681 nm	$y = 0,0004x (\mu\text{g L}^{-1}) + 0,0077$	0,9926
Sulfato de gentamicina	Razão (681/511)	$y = 0,0014x (\mu\text{g L}^{-1}) + 0,0233$	0,9986
Sulfato de neomicina	681 nm	$y = 0,0004x (\mu\text{g L}^{-1}) + 0,0016$	0,9987
Sulfato de neomicina	Razão (681/511)	$y = 0,0012x (\mu\text{g L}^{-1}) + 0,0075$	0,9978

Tendo em vista os resultados das curvas analíticas, pode-se então calcular os valores de concentração equivalentes ao LD e ao LQ para determinação de sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina. Os valores são mostrados na Tabela 14 foram obtidos a partir das medições feitas em 10 dispersões-branco, em 681 nm e na razão 681/511. O critério usado foi a concentração de analito que produziu um sinal equivalente ao sinal característico da sonda ( $x_b$ ) somado de 3 vezes (para LD) ou 10 vezes (para LQ) o desvio padrão ( $s_b$ ) ou seja:  $LD = x_b + 3 s_b$  e  $LQ = x_b + 10 s_b$ .

**Tabela 14:** LD e LQ para monitorado do sinal em 681 nm e na razão (681/511).

AMG	Monitoramento	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Sulfato de gentamicina	681 nm	0,2	0,8
Sulfato de gentamicina	Razão (681/511)	0,06	0,9
Sulfato de neomicina	681 nm	6,7	7,3
Sulfato de neomicina	Razão (681/511)	6,2	7,3

As precisões instrumental e intermediária foram calculadas partindo-se de três níveis de concentração para sulfato de gentamicina (6,0; 60; 300,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e para o sulfato de neomicina (9,1; 91,0; 270,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) também com monitoramento em 681 nm e na razão de comprimentos de onda 681/511, obtendo-se valores abaixo de 3,2%. Os resultados são apresentados na Tabela 15 e na Tabela 16.

**Tabela 15:** Precisão instrumental e precisão intermediária da sonda de AuNPs-H em relação á sulfato de gentamicina.

Monitoramento	Precisão intermediária (%)			Precisão instrumental		
	(Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ )			(Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	6,0	60,0	300,0	6,0	60,0	300,0
681 nm	3,1	2,6	3,0	1,2	1,2	1,7
Razão (681/511)	2,1	1,7	2,5	0,9	1,1	1,0

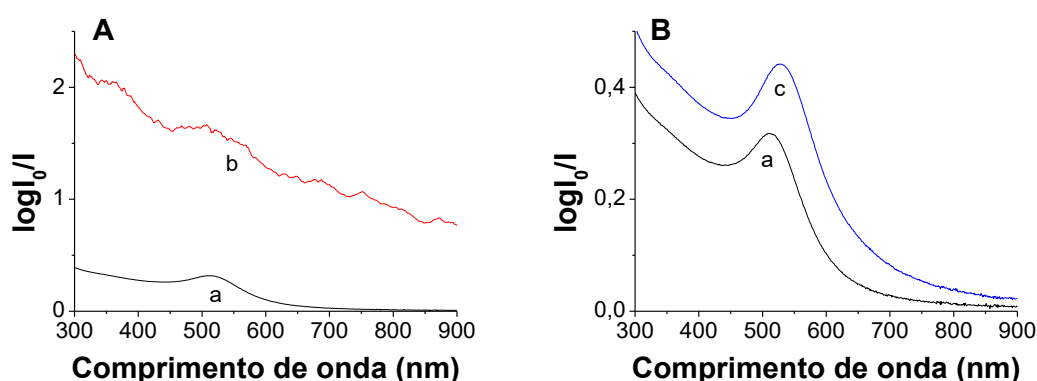
**Tabela 16:** Precisão instrumental e precisão intermediária da sonda de AuNPs-H em relação á sulfato de neomicina.

Monitoramento	Precisão intermediária (%)			Precisão instrumental		
	(Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ )			(Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	9,1	91,0	270,0	9,1	91,0	270,0
681 nm	3,0	2,7	3,0	0,4	1,1	1,8
Razão (681/511)	2,6	1,6	2,8	0,3	0,9	1,7

#### 4.4.

#### Estudo de seletividade da sonda e ajuste de procedimento SPE em cartuchos de polímero impresso molecularmente com AMG

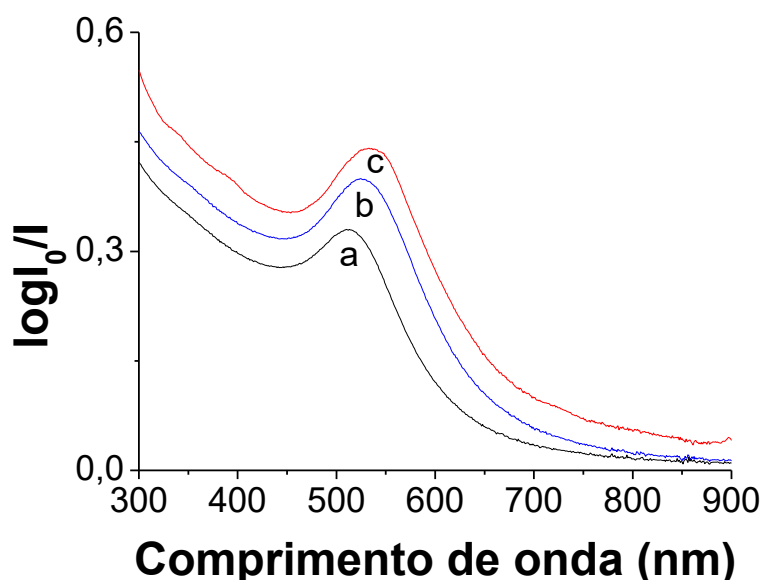
Para habilitar a quantificação de sulfato de gentamicina em amostras de leite integral, foi necessário avaliar se matriz do leite, antes e após desproteinização (*clean up*), causaria interferência na resposta das dispersões de trabalho das AuNPs-H (Figura 39). Constatou-se que, em ambos os casos, havia uma interferência na dispersão de trabalho, sendo esta severa para amostra de leite antes da desproteinização, gerando uma deformação total no perfil espectral da sonda. No entanto, para a amostra após *clean up* percebeu-se que não há distorção de sinal, e sim uma interação que aumenta a intensidade da banda LSPR em aproximadamente 34 % (considerando 511 nm), e causa um deslocamento batocrômico de 14 nm. Desta forma a matriz da amostra de leite interferiu e a sonda não foi seletiva.



**Figura 39:** Comparação dos perfis espectrais de extinção de dispersões de trabalho AuNPs-H antes (a) e após a adição de: (A) amostra de leite integral antes do *clean up* (b) e (B) amostras de leite integral após *clean up* (c). Amostras sem AMG.

A variação causada no sinal da sonda a partir do uso de amostras de saliva humana antes e após o *clean up* (desproteinização com acetonitrila) também foi estudada e os resultados são mostrados na Figura 40. Foi constatado que a amostra de

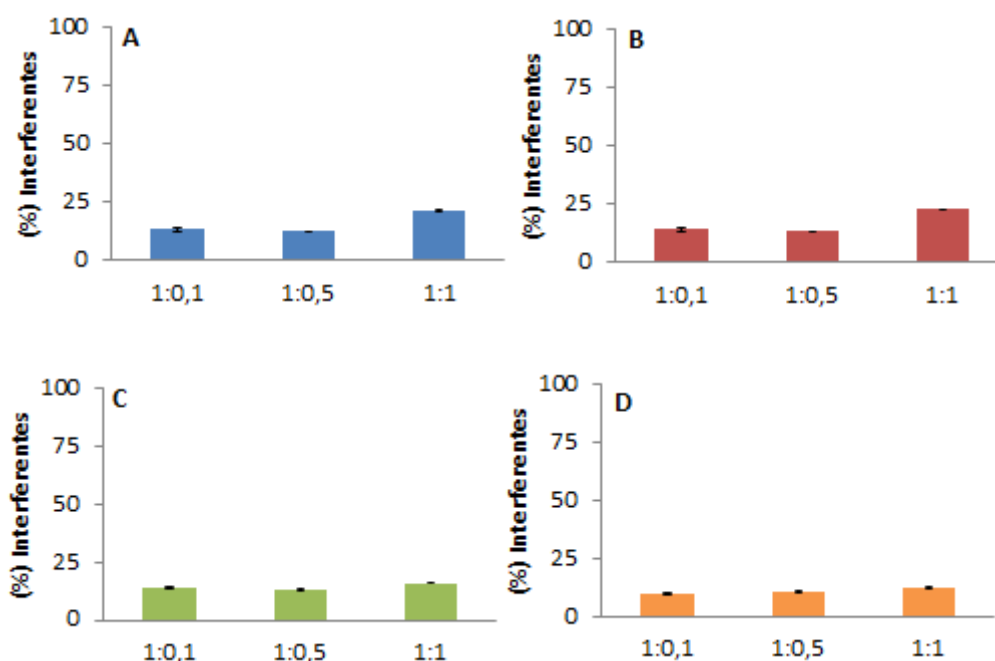
saliva sem tratamento promove aumento de intensidade da banda LSPR em aproximadamente 28 % (considerando 511 nm), e causa um deslocamento batocrômico de 22 nm. Já amostra de saliva desproteïnizada causa uma variação na intensidade de banda LSPR 12% e um deslocamento batocrômico de 14 nm. Portanto, mais uma vez verificou-se que a sonda não apresenta seletividade frente a componentes da saliva humana.



**Figura 40:** Comparação do perfil espectral da dispersão de trabalho de AuNPs-H: (a) sem adição de saliva, (b) saliva após *clean up* e (c) saliva antes do *clean up*. Os espectros a,b e c foram obtidos na ausência de AMG.

Uma vez que um dos alvos do trabalho é quantificar sulfato de neomicina em amostras de medicamento (solução nasal) foi avaliado o potencial interferente das substâncias químicas presentes no mesmo: cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona (co-fármacos). Para tal, adotou-se que os testes seriam feitos fixando-se a concentração sulfato neomicina em  $91 \mu\text{g L}^{-1}$ , e variando-se as quantidade dos co-fármacos na proporção sulfato de neomicina:co-fármaco em 1:0,1 e 1:0,5 e 1:1. Sendo a avaliação feita em relação a  $[\log I_0/I_{\text{sulfato de neomicina}} / \log I_0/I_{\text{sulfato de neomicina+co-fármacos}}] \times 100$ , monitorando-se os sinais tanto em 681 nm e na razão 681/511. A partir dos resultados apresentados na Figura 41 concluiu-se que há interferência na sonda, em todas as proporções testadas com um desvio mínimo entre as triplicatas.



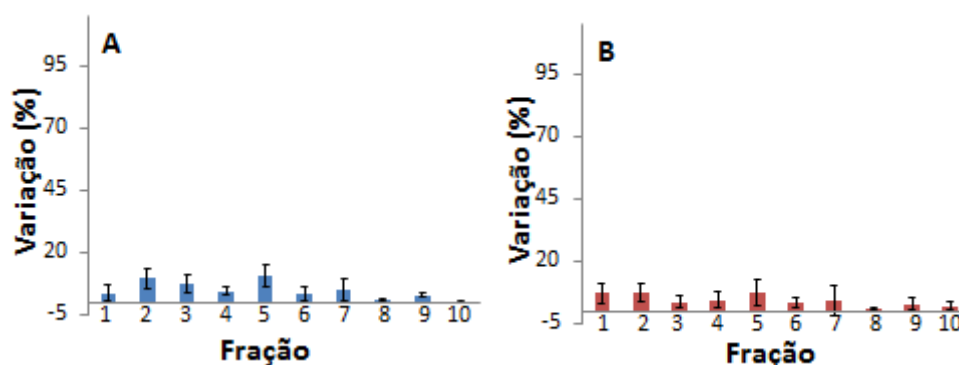


	1: 0,1	1:0,5	1:1
<b>681 nm</b>			
Cloridrato de nafazolina	12,8	11,9	21,2
Fosfato dissódico de dexametasona	14,2	13,0	16,1
<b>Razão 681/511</b>			
Cloridrato de nafazolina	13,7	12,7	22,4
Fosfato dissódico de dexametasona	9,6	10,6	12,3

**Figura 41:** Avaliação de interferência dos co-fármacos em relação ao sinal do padrão de sulfato de neomicina  $91 \mu\text{g L}^{-1}$  em (A) cloridrato de nafazolina em 681 nm, (B) cloridrato de nafazolina na razão 681/511, (C) fosfato dissódico de dexametasona em 681 nm e (D) fosfato dissódico de dexametasona na razão 681/511. Respectivos valores (sem desvio) em destaque

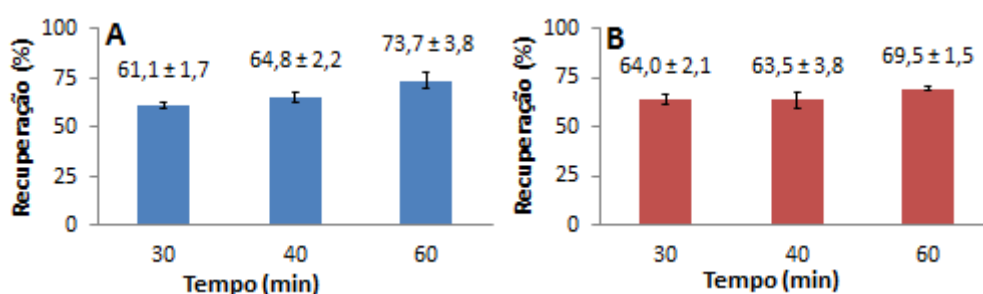
Por conta da sensibilidade da sonda de AuNPs-H frente aos componentes de matriz das amostras de interesse, lançou-se mão da utilização de cartuchos de SPE comerciais de MIP-AMG visando alcançar seletividade. Inicialmente, foi avaliado se as frações que eram eluídas dos cartuchos (e recolhidas em tubos de vidro) promoviam variação no sinal da sonda. Assim três cartuchos foram acondicionados com 1,0 mL de água ultrapura, sendo as frações eluídas descartadas. Em seguida, adicionou-se mais água ultrapura aos mesmos, sendo recolhidas 7 frações de 1,0 mL por cartucho. Finalmente, adicionou-se, em cada cartucho, solução tampão citrato ( $\text{pH } 4,0$ ;  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), sendo coletadas 3 frações de 1,0 mL cada. Aos tubos com dispersões de trabalho adicionados com as frações 1 a 7 foi adicionado 1,0 mL da solução tampão. Já nas dispersões de trabalho adicionadas das frações dos tubos 8 a 10 não foi necessária a

adição de tampão, uma vez que a eluição das frações já foi feita com tampão. O volume final de cada dispersão foi mantido em 5,0 mL, e as medições foram feitas no espectrofotômetro monitorando-se os sinais em 681 nm e na razão 681/511. Os resultados indicaram que na fração 1 (Figura 42) a média da variação de sinal foi inferior a 4%, e na fração 7 a variação foi de 5%. Por outro lado, obtiveram-se variações de 1%, 3% e 2% nas frações 8, 9 e 10 respectivamente. Ou seja, a variação foi considerada adequada em termos do RSD tido como esperado para a resposta analítica do método com sonda de AuNPs-H. Estas variações foram chamadas de branco do MIP-AMG, sendo descontada dos valores para testes com padrões de sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina.



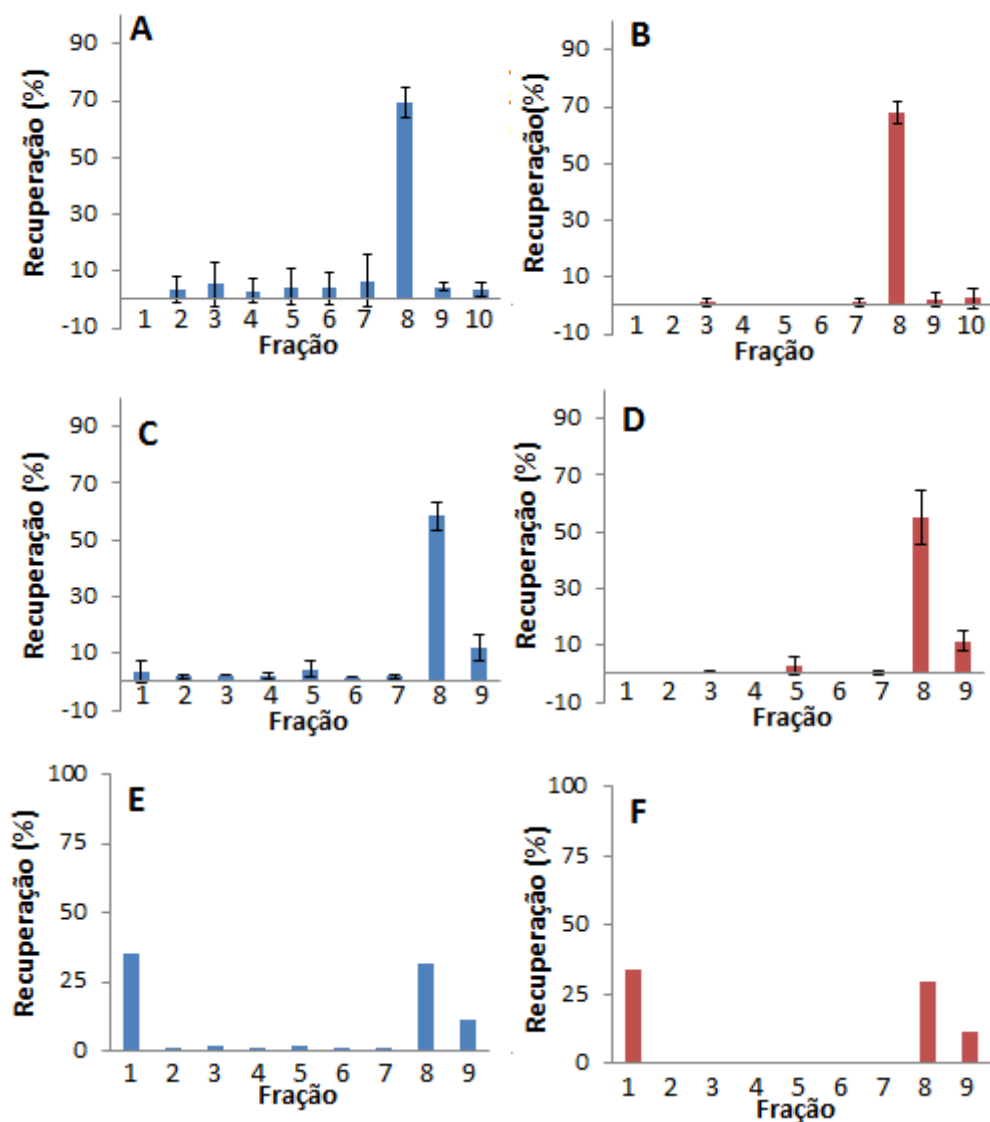
**Figura 42:** Teste de acondicionamento dos cartuchos MIP-AMG, frações 1 a 7 (eluição com água ultrapura) e frações 8 a 10 (eluição com tampão citrato), sendo (A) monitoramento em 681 nm e (B) monitoramento na razão 681/511.

Em seguida foi avaliado o tempo ideal para retenção do AMG no cartucho, para tal, antes do carregamento, cada cartucho foi acondicionado com 1,0 mL de água ultrapura, sendo a mesma, descartada após eluição. Utilizou-se como base para o carregamento, um padrão de sulfato de gentamicina (0,88  $\mu\text{g}$  ou volume de 40  $\mu\text{L}$  de solução padrão  $2,2 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ , o que equivale a 176  $\mu\text{g L}^{-1}$  na dispersão de trabalho de AuNPs-H). Estabeleceram-se os tempos de equilíbrio como sendo 30, 40 e 60 min. Passados esses intervalos de tempo, procederam-se as 10 eluições por cartucho, e as medições foram feitas conforme descrito anteriormente. Os resultados apresentados na Figura 43 indicaram que a maior parte do sulfato de gentamicina é eluída nas frações 8 e 9 (eluição com tampão), sendo as maiores recuperações obtidas em 60 min, portando este tempo de equilíbrio (retenção) foi escolhido para dar continuidade aos testes.

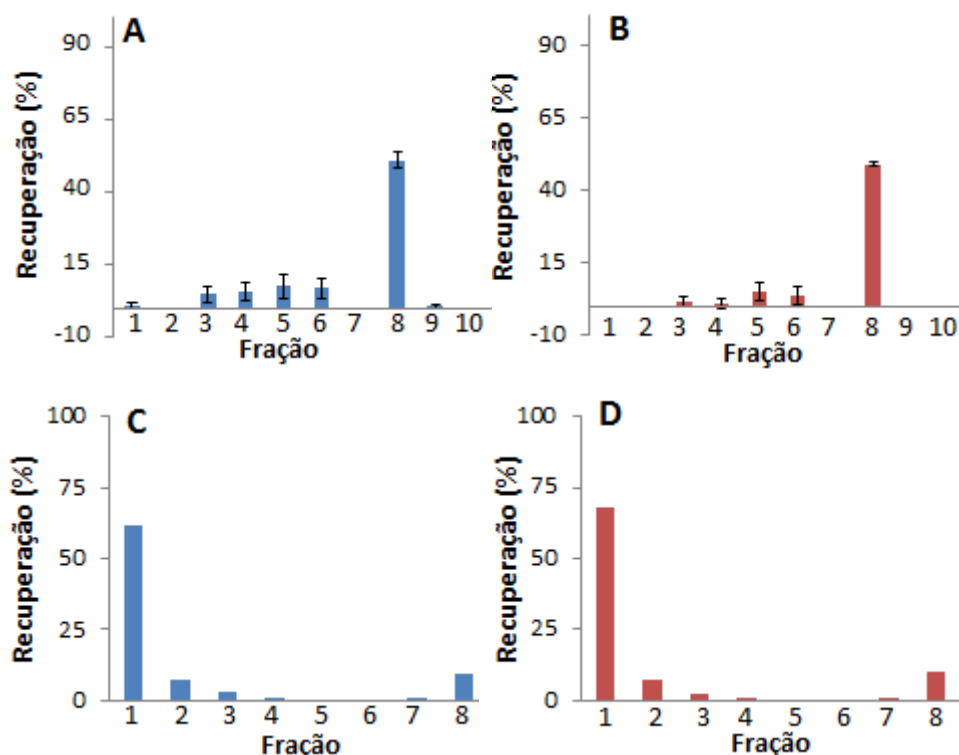


**Figura 43:** Avaliação dos tempos de retenção (30, 40 e 60 minutos) do sulfato de gentamicina nos cartuchos MIP-AMG referentes ao somatório das recuperações das frações 8 e 9, em 681 (a) e na razão de comprimentos de onda 681/511 (b).

Na sequência foram feitos testes de capacidade de carregamento para sulfato de gentamicina usando massas de analito de 0,88; 4,4 e 8,8  $\mu\text{g}$  (o que equivale a 176,0; 880 e 1760  $\mu\text{g L}^{-1}$  nas dispersões de trabalho de AuNPs-H). Para sulfato de neomicina as massas usadas foram 0,84 e 4,2  $\mu\text{g}$  (o que equivale a 168,0 e 840  $\mu\text{g L}^{-1}$  nas dispersões de trabalho de AuNPs-H). Observou-se que nas frações de 1 a 7 houve uma pequena perda de AMG por fração, conforme visto na Figura 44A-D. Para sulfato de gentamicina, verificou-se que a saturação do cartucho (perda considerável do AMG na fração 1) ocorreu somente no carregamento de 8,8  $\mu\text{g}$  do AMG (Figura 44E e Figura 44F), isto significa que os sítios ativos da matriz polimérica já estavam totalmente preenchidos, sendo eluídos aproximadamente 35% de sulfato de gentamicina na fração 1. Na Figura 44A e Figura 44B, percebe-se que na fração 10, praticamente não há mais sulfato de gentamicina no cartucho, o que indica que esta última eluição desnecessária. Foi escolhido que para dar continuidade ao trabalho o carregamento de sulfato de gentamicina por cartucho seria de 4,4  $\mu\text{g}$  (Figura 44B e Figura 44C).



**Figura 44:** Recuperações do padrão de sulfato de gentamicina em dispersões de trabalho de AuNPs-H a partir do carregamento dos cartuchos MIP-AMG com 0,88  $\mu\text{g}$  (monitoramento: (A) 681 e (B) razão 681/511); 4,4  $\mu\text{g}$  (monitoramento: (C) 681 e (D) razão de comprimentos de onda 681/511) e 8,8  $\mu\text{g}$  (monitoramento: (E) 681 e (F) razão de comprimentos de onda 681/511). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e de 8 a 10 eluição com tampão citrato.



**Figura 45:** Recuperações do padrão de sulfato de neomicina em dispersões de trabalho de AuNPs-H a partir do carregamento dos cartuchos MIP-AMG com 0,84 µg (monitoramento: (A) 681 e (B) razão de comprimentos de onda 681/511) e 4,2 µg (monitoramento: (C) 681 e (D) razão de comprimentos de onda 681/511). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e de 8 a 10 eluição com tampão citrato.

Os testes de carregamento com sulfato de neomicina demonstraram que a saturação do cartucho ocorreu bem antes, ou seja, com 4,2 µg do AMG (Figura 45C e Figura 45D). Foi observada a perda de sulfato de neomicina na primeira fração de aproximadamente 68%. Assim foi estabelecido que para este AMG o carregamento devesse ser 0,84 µg de sulfato de neomicina. Verificou-se também que somente uma alíquota de 1,0 mL de tampão citrato (fração 8) era necessária para a remoção do AMG. Na Tabela 17 é apresentado o resumo geral para os testes de carregamento nos cartuchos MIP-AMG com os padrões de sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina.

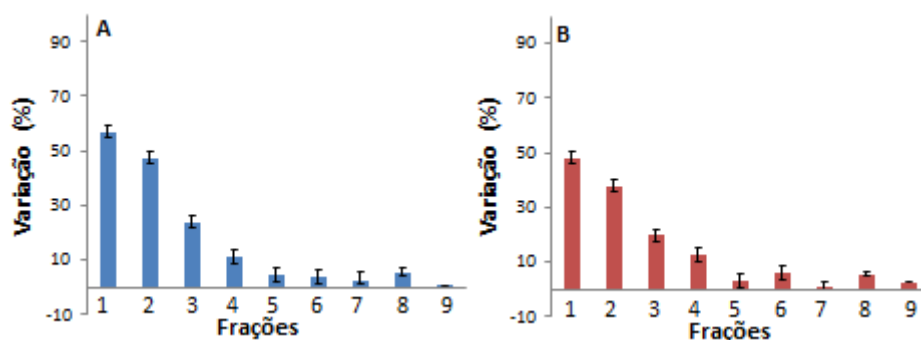
**Tabela 17:** Recuperação em 681 nm e na razão de comprimentos de onda 681/511 dos testes de carregamento nos cartuchos MIP-AMG para sulfato de gentamicina (somatório das recuperações das frações 8 e 9) e sulfato de neomicina (recuperação da fração 8).

Monitoramento em 681 nm			
AMG	Carregamento de AMG (µg)	Recuperação (%)	Recuperação (µg) Recuperação na sonda (µg L <sup>-1</sup> )
Sulfato de gentamicina	0,88	73,6 ± 3,8	0,65 ± 0,03 (129,5 ± 6,7)
Sulfato de gentamicina	4,40	70,4 ± 0,7	3,10 ± 0,03 (619,5 ± 6,2)
Sulfato de gentamicina	8,80	50,2	4,4 (883,5)
Sulfato de neomicina	0,84	51,0 ± 2,6	0,42 ± 0,02 (85,7 ± 4,4)
Sulfato de neomicina	4,20	9,5	0,40 (79,8)
Monitoramento na razão 681/511			
AMG	Carregamento de AMG (µg)	Recuperação (%)	Recuperação (em µg) Recuperação na sonda (em µg L <sup>-1</sup> )
Sulfato de gentamicina	0,88	69,5 ± 1,5	0,61 ± 0,01 (122,3 ± 2,6)
Sulfato de gentamicina	4,40	66,4 ± 6,2	2,92 ± 0,27 (584,3 ± 54,6)
Sulfato de gentamicina	8,80	46,6	4,10 (820,2)
Sulfato de neomicina	0,84	48,9 ± 0,8	0,42 ± 0,01 (82,2 ± 1,3)
Sulfato de neomicina	4,20	9,8	0,41 (82,3)

Ao utilizar MIP-AMG comercial para determinar sulfato de gentamicina em amostras de leite fortificadas usando UPLC acoplado a espectrometria de massa, Moreno-González *et al.* [102], obtiveram recuperações em torno de 70% para este AMG. Verifica-se então que os resultados de SPE obtidos nessa dissertação com solução padrão de sulfato de gentamicina estão de acordo com os resultados do trabalho descrito acima, o que indica limitação na capacidade de retenção do cartucho de aproximadamente 70% para sulfato de gentamicina.

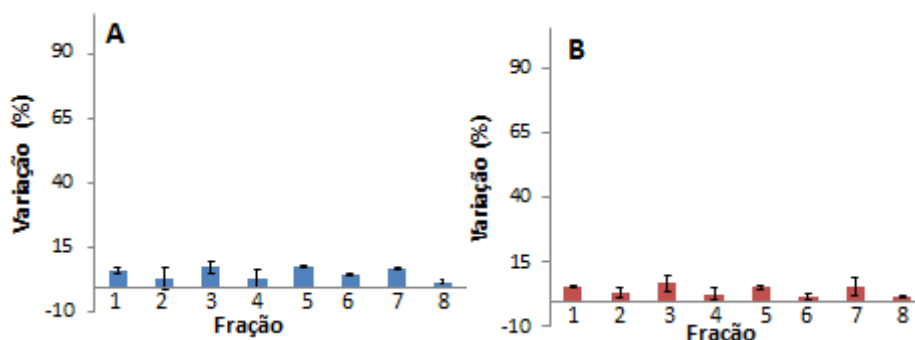
A partir das condições de contorno estabelecidas, as matrizes de leite integral e de saliva, ambas desproteinizadas (sem AMG) foram adicionadas nos cartuchos MIP-

AMG, a fim de verificar se há minimização da interferência do sinal da sonda. Estes testes foram chamados de branco do leite e branco da saliva. Seguiram-se exatamente os protocolos de eluição descrito sendo que para a matriz do leite recolheu-se até a fração 9 e para a matriz de saliva coletou-se até a fração 8. Na Figura 46 são apresentados os resultados para eluição de matrizes de leite (de diferentes produtores de leite), onde se observa que os cartuchos de SPE de MIP-AMG são eficientes, pois grande parte dos interferentes são eluídos nas frações de 1 a 3, sendo que nas frações úteis (8 e 9) nas quais seriam eluídos o AMG se ele estivesse presente, a variação no sinal da sonda é de aproximadamente 5%. Portanto, estabeleceu-se que esse percentual deverá ser descontado quando for feita a quantificação de sulfato de gentamicina em amostras de leite desproteinizadas.



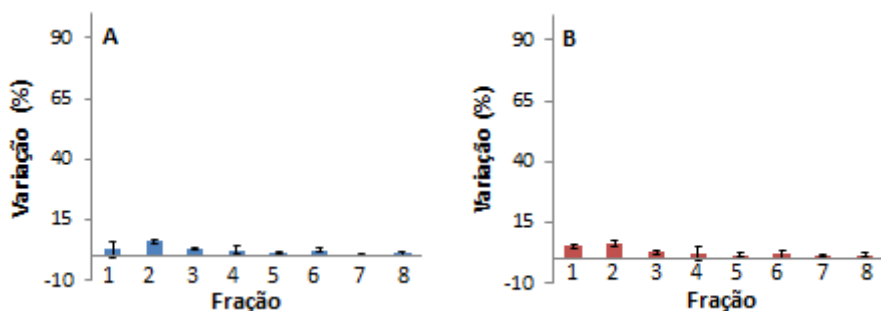
**Figura 46:** Variações das frações eluídas nos cartuchos MIP-AMG de matrizes de leite integral reconstituídas nas dispersões de trabalho de AuNPs-H. Monitoramento em: 681 nm (**A**) e na razão de comprimentos de onda 681/511 (**B**). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e de 8 a 10 eluição com tampão citrato.

Os resultados dos testes com as matrizes de saliva desproteinizadas são mostrados na Figura 47. Estes demonstram que na fração 8 (fração útil) a variação no sinal da sonda é inferior a 2%, o que minimiza interferência na quantificação de neomicina em amostras de saliva.



**Figura 47:** Variações das frações eluídas nos cartuchos MIP-AMG de matrizes de saliva reconstituídas nas dispersões de trabalho de AuNPs-H. Monitoramento em: 681 nm (A) e na razão 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e fração 8 eluída com tampão citrato.

Por fim, foram feitos testes nos cartuchos MIP-AMG com cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona. Aliquotas de 40  $\mu$ L de uma solução contendo 0,13 e 0,08  $\mu$ g de padrões de cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona, respectivamente, foram carregadas em 3 cartuchos SPE seguindo o protocolo estabelecido. Os resultados das eluições, apresentados na Figura 48, indicam que na fração 8 (fração útil analiticamente se o sulfato de neomicina estivesse presente) a variação no sinal da sonda é inferior a 2%. Isto demonstra que o cartucho MIP-AMG habilitaria seletividade para quantificação de sulfato de neomicina nas amostras do medicamento nasal que contém os dois interferentes descritos.



**Figura 48:** Eluição das frações da solução de cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona nos cartuchos MIP-SPE, reconstituídas nas dispersões de trabalho de AuNPs-H. Monitoramento em: 681 nm (A) e na razão de comprimentos de onda 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e fração 8 eluição com tampão citrato.

#### 4.5.

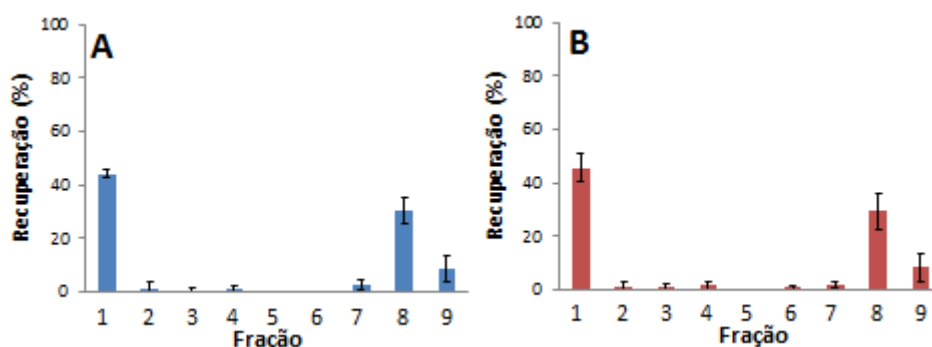
#### Determinação espectrofotométrica de sulfato de gentamicina em amostras de leite integral usando a sonda AuNPs-H



Amostras de leite foram fortificadas com sulfato de gentamicina e desproteinizadas (*clean up*) conforme descrito na sessão experimental. Em seguida, 40  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram carregados em cartuchos de SPE MIP-AMG, e seguiram-se os protocolos analíticos estabelecidos. Os resultados apresentados na Figura 49 indicaram que a maior parte dos interferentes (da matriz da amostra) foi eluída já na primeira fração, sendo o sulfato de gentamicina recuperado (majoritariamente) nas frações 8 e 9. Na Tabela 18 estão sumarizados os valores de recuperações encontradas (descontando-se o branco do leite – item 4.4 pag 111).

Analisando os resultados, e tomando como base as recuperações em 681 nm, o máximo que a sonda poderia ter recuperado de sulfato de gentamicina nas amostras de leite era  $3,10 \pm 0,03 \mu\text{g}$ , o que equivale a  $620,0 \pm 6,0 \mu\text{g L}^{-1}$  nas dispersões de trabalho de AuNPs-H (ou  $70,40 \pm 0,70 \%$ , considerando o máximo que o cartucho de SPE consegue recuperar nas frações 8 e 9). Assim, concluiu-se que como a recuperação foi de  $1,72 \pm 0,03 \mu\text{g}$  (equivalente a  $344,0 \pm 6,0 \mu\text{g L}^{-1}$  nas dispersões de trabalho de AuNPs-H) provavelmente ocorreu perda sulfato de gentamicina durante o processo de *clean up* (perda de aproximadamente 31%).

Tentou-se validar os resultados através por HPLC tanto por detecção absorciométrica no UV-Vis quanto por detecção fluorimétrica, em ambos os casos com derivatização do AMG [5]. Todavia, o elevado limite de detecção desses métodos, comparado aos valores que podem ser detectados com a sonda AuNPs-H, não permitiram tal avaliação já que as concentrações nas frações, considerando também a capacidade de carregamento dos cartuchos de SPE MIP-AMG, não poderiam ser quantificadas por HPLC. Tal tentativa ressaltou que a sonda AuNPs-H tem um potencial analítico considerável por conta do baixo limite de detecção em comparação com métodos por HPLC tradicionalmente usados para detectar AMG [4,5].



**Figura 49:** Recuperações de sulfato de gentamicina em dispersões de trabalho de AuNPs-H, de amostras de leite fortificadas (4,4  $\mu\text{g}$  de sulfato de gentamicina). Recuperações encontradas a partir do

monitoramento em 681 (A), e na razão de comprimentos de onda 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e de 8 a 10 eluição com tampão citrato.

**Tabela 18:** Recuperações de sulfato de gentamicina em amostras de leite fortificadas.

Monitoramento	Quantidade de sulfato de gentamicina* ( $\mu\text{g}$ )	Recuperação (%)	Recuperação ( $\mu\text{g}$ ) Recuperação na sonda ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
681 nm	4,40	$39,1 \pm 0,2$	$1,72 \pm 0,01$ ( $344,1 \pm 1,8$ )
Razão 681/511	4,40	$37,7 \pm 1,7$	$1,66 \pm 0,08$ ( $331,8 \pm 15,0$ )

\* Quantidade de sulfato de gentamicina ( $\mu\text{g}$ ) que deveria existir em 40  $\mu\text{L}$  de amostra (100% estimado).

Trabalhos descritos na literatura (com sondas de nanopartículas de ouro) mostram recuperações de sulfato de gentamicina em amostras fortificadas de leite sem utilização de separação prévia por SPE, por exemplo, o descrito por Wang *et al.* [81]. Os autores descrevem recuperações próximas a 100%, utilizando apenas um pré-tratamento com ácido tricloroacético, provavelmente não levando em conta a interferência da matriz das amostras de leite na sonda. Os mesmos indicaram estudos de interferência separadamente com proteína do leite e sais minerais, relatando interferências que não ultrapassaram 5% em termos de variação de sinal. Uma análise crítica que se faz a esse tipo de trabalho é que é impossível que proteínas interfiram no sinal da sonda com apenas 5%, isso porque é característico para nanopartículas de ouro a forte interação de grupos nitrogenados [69,74].

#### 4.6.

#### Determinação espectrofotométrica de sulfato de neomicina em amostras simuladas, de medicamento e de saliva usando a sonda AuNPs-H

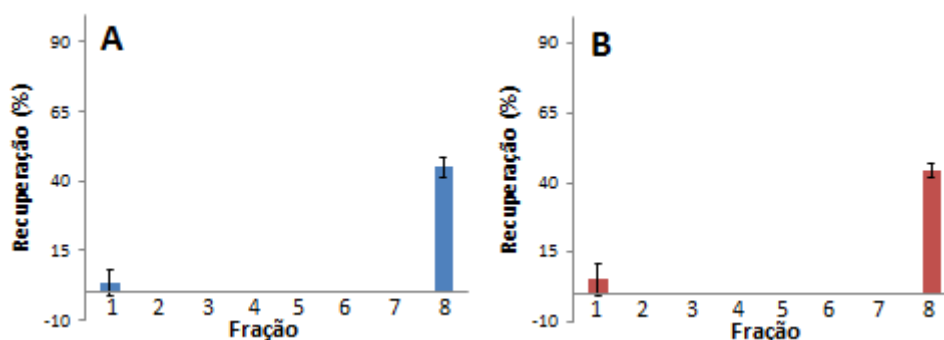
A primeira amostra escolhida para se proceder a determinação de sulfato de neomicina foram as amostras simuladas, onde foram utilizadas soluções padrões em dois níveis de concentração ( $55 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $366,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ), e as recuperações encontradas são mostradas na Tabela 19.

**Tabela 19:** Recuperação de sulfato de neomicina em amostras simuladas.

Monitoramento em 681 nm		
Concentração estimada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

55,0	91,7 ± 3,0	50,4 ± 1,6
366,4	102,6 ± 1,3	375,8 ± 4,8
<b>Monitoramento na razão 681/511</b>		
<b>Concentração estimada (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Recuperação (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
55,0	99,5 ± 3,0	54,7 ± 1,7
366,4	101,5 ± 1,7	372,1 ± 6,3

Posteriormente determinou-se sulfato de neomicina em amostras de medicamento nasal. Conforme testes feitos com soluções estoque de cloridrato de nafazolina e de fosfato dissódico de dexametasona, essas substâncias interferem no sinal da sonda de AuNPs-H. Portanto, uma vez que o medicamento nasal contém essas duas substâncias há a necessidade de eliminá-las da amostra a partir do procedimento SPE com cartuchos MIP-AMG. Assim alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  de solução diluída do medicamento (contendo 0,84  $\mu\text{g}$  de sulfato de neomicina, estimado de acordo com a bula do fabricante, o que equivale a 168  $\mu\text{g L}^{-1}$  em dispersões de trabalho de AuNPs-H) foram carregadas nos cartuchos de SPE. Seguiram-se os protocolos de eluição e medição, e os resultados são apresentados na Figura 50 e na Tabela 20. Observou-se que os interferentes são eluídos na primeira fração, o que comprova que os mesmos não possuem afinidade pela matriz polimérica, uma vez que não guardam relação de semelhança estrutural com os AMGs. Considerando o monitoramento em 681 nm foi possível recuperar  $0,38 \pm 0,03 \mu\text{g}$  ( $45,0 \pm 3,6\%$ ) de sulfato de neomicina, o que equivale a  $74,55 \pm 6,01 \mu\text{g L}^{-1}$  em dispersões de trabalho de AuNPs-H, este resultado mostrou uma recuperação condizente do analito, visto que a recuperação do padrão de sulfato de neomicina nesta mesma concentração foi de  $51,0 \pm 2,6 \%$ .



**Figura 50:** Recuperações de sulfato de neomicina em dispersões de trabalho de AuNPs-H, de amostras de medicamento nasal (0,84  $\mu\text{g}$  considerando o indicado na bula do fabricante). Recuperações encontradas a

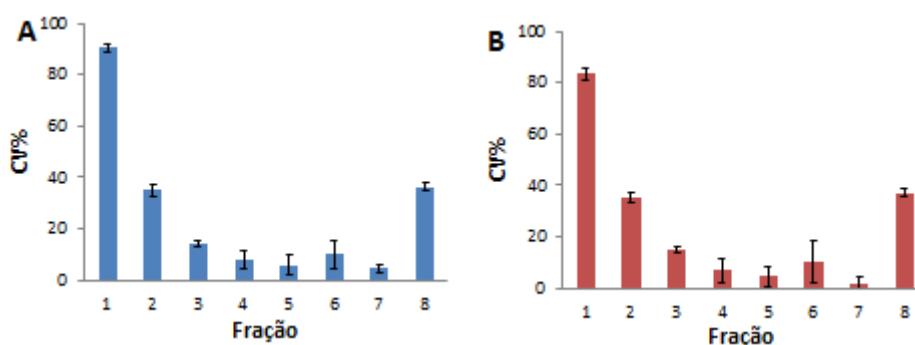
partir do monitoramento em 681 (A), e na razão de comprimentos de onda 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e fração 8 eluída com tampão citrato.

**Tabela 20:** Recuperações de sulfato de neomicina em amostras de medicamento nasal

Monitoramento	Quantidade de sulfato de neomicina* ( $\mu\text{g}$ )	Recuperação (%)	Recuperação ( $\mu\text{g}$ ) Recuperação na sonda ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
681 nm	0,84	$45,0 \pm 3,6$	$0,38 \pm 0,03$ ( $74,6 \pm 6,0$ )
Razão 681/511	0,84	$44,5 \pm 2,5$	$0,37 \pm 0,02$ ( $74,7 \pm 4,3$ )

\* Quantidade de sulfato de neomicina ( $\mu\text{g}$ ) que deveria existir em 40  $\mu\text{L}$  de amostra (100% estimado de acordo com a bula do fabricante).

Por fim, visando a determinação de sulfato de neomicina em matriz de um fluido biológico, foram administradas 3 gotas do medicamento nasal, por narina em um indivíduo, com posterior coleta da saliva. Após a desproteinização da saliva com acetonitrila foram coletadas alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  das amostras, sendo as mesmas carregadas nos cartuchos de SPE MIP-AMG. Seguiram-se os protocolos de eluição e medição, e os resultados são apresentados na Figura 51 e na Tabela 21. Pode-se perceber que grande parte dos interferentes da matriz de saliva é eluída até a segunda fração. Por conseguinte, na fração 8 obteve uma massa recuperada de analito de  $0,36 \pm 0,02$   $\mu\text{g}$  (sulfato de neomicina) o que equivale a uma concentração de  $72,4 \pm 3,3$   $\mu\text{g L}^{-1}$  na dispersão de AuNPs-H.



**Figura 51:** Eluições das amostras de saliva contendo medicamento nasal, reconstituídas em dispersões de trabalho de AuNPs-H, monitoramento em 681 (A), e na razão 681/511 (B). Frações de 1 a 7 eluição com água ultrapura e fração 8 eluída com tampão citrato.

**Tabela 21:** Quantificação de sulfato de neomicina em amostras de saliva.

Monitoramento	Recuperação ( $\mu\text{g}$ ) Recuperação na sonda ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
681 nm	$0,36 \pm 0,02$ ( $72,4 \pm 3,3$ )
Razão 681/511	$0,38 \pm 0,0$

---

 $(75,5 \pm 1,0)$ 

---

#### 4.6.1.

#### Método comparativo espectrofotométrico com derivatização usando ninidrina para determinação de sulfato de neomicina nas amostras simuladas

O teste comparativo de derivatização por ninidrina foi realizado, seguindo o procedimento proposto por Frutos et al. [4], para as amostras simuladas da sulfato de neomicina. A partir dos espectros de absorção (disponível no ANEXO I) fez-se o monitoramento em 400 nm, que originou uma curva analítica para determinação de sulfato de neomicina na faixa linear de 30 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As soluções padrões usadas como amostras para este teste foram preparados em dois níveis de concentração (40 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), e os resultados são mostrados na Tabela 22. Na Tabela 23 é apresentado um comparativos de recuperações percentuais entre o método por derivatização e o método de sonda AuNPs-H. Essa comparação só pôde ser feita utilizando-se as recuperações percentuais, por conta das ordens de grandeza diferentes limites de detecção envolvidos.

**Tabela 22:** Recuperações de sulfato de neomicina em amostras simuladas pelo método de derivatização por ninidrina.

Concentração estimada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
40,0	98,3 $\pm$ 0,8	39,3 $\pm$ 0,3
100,0	100,4 $\pm$ 0,4	101,1 $\pm$ 0,4

**Tabela 23:** Comparativo entre as recuperações percentuais de sulfato de neomicina pelo método de derivatização por ninidrina e pela sonda de AuNPs-H. Nível 1 equivale a menor concentração de sulfato de neomicina, e nível 2 a maior.

Método	Recuperação (%)
UV-Vis (ninidrina)	Nível 1 - 98,3 $\pm$ 0,8
UV-Vis (ninidrina)	Nível 2 - 100,4 $\pm$ 0,4
AuNPs-H com monitoramento em 681 nm	Nível 1 - 91,7 $\pm$ 3,0
AuNPs-H com monitoramento em 681 nm	Nível 2 - 102,6 $\pm$ 1,3
AuNPs-H com monitoramento na razão 681/511)	Nível 1 - 99,5 $\pm$ 3,0
AuNPs-H com monitoramento na razão 681/511)	Nível 2 - 101,5 $\pm$ 1,7

A fim de se comparar estatisticamente os resultados foi usado o teste F (n=3) com um intervalo de confiança de 95%, e o teste *t-Student*. Os valores de  $t_{\text{calculado}}$  para comparação com o método de AuNPs-H foram todos menores que o  $t_{\text{tabelado}}$  (2,776), desse modo, pode-se inferir que os resultados são estatisticamente iguais.

#### 4.6.2.

#### **Método comparativo por HPLC, através de derivatização com OPA, para determinação de sulfato de neomicina nas amostras de medicamento nasal**

No método cromatográfico com detecção fluorimétrica [73] foram avaliados os percentuais de recuperação de sulfato de neomicina das amostras do medicamento nasal, todavia sem a utilização dos cartuchos MIP-AMG, pois o limite de detecção do método cromatográfico não alcançaria o nível de concentração requerido no cartucho. Com a fase móvel utilizada o tempo de retenção do sulfato de neomicina (após derivatização com OPA) de 9,8 min (o cromatograma da concentração  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  do padrão é apresentado no ANEXO II). A curva analítica foi construída na faixa de concentração de  $5,0$  a  $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados para as recuperações do método cromatográfico obtidas por triplicatas das amostras do medicamento nasal são apresentados na Tabela 24. Comparando-se os percentuais de recuperação com os da quantificação do medicamento nasal na sonda AuNPs-H ( $45,0 \pm 3,6 \%$  em 681 nm) e sabendo que só é possível recuperar nos cartuchos MIP-AMG aproximadamente 50% (do que foi carregado), acredita-se que o valores encontrados no método comparativo (93,6%) é condizente com o valor de analito fato presente na amostra.

**Tabela 24:** Recuperações de sulfato de neomicina em amostras de medicamento nasal pelo método cromatográfico.

Concentração estimada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
20,0	$93,6 \pm 5,3$	$19,0 \pm 1,1$

#### 4.7.

#### Comparação AuNPs-H e AuNPs-citrato frente a interação com AMG

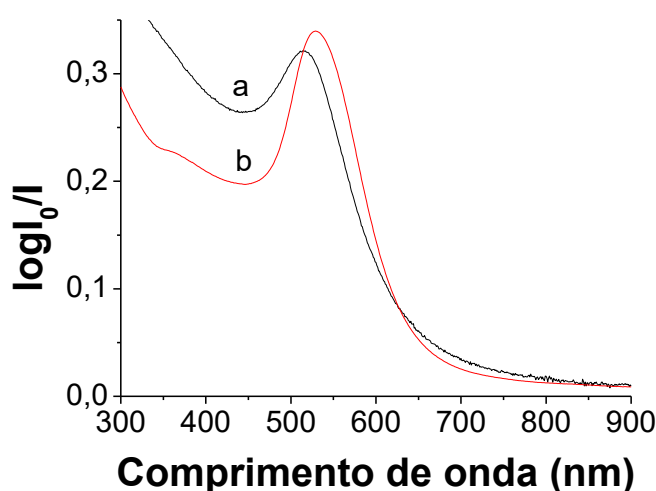
O LEEA-PUC-Rio tem desenvolvido pesquisas com nanopartículas de ouro desde 2012, sendo a primeira dissertação defendida por Santos [7] em 2014. Naquele trabalho, Santos sintetizou nanopartículas de ouro usando citrato de sódio monobásico ou tribásico (como agentes redutores e de recobrimento), e verificou-se que os valores de pH das dispersões de síntese eram diretamente influenciados pelo tipo de citrato de sódio utilizado. As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro médio variando entre de 17 e 45 nm, e uma peculiaridade dessas sínteses era que as mesmas requeriam aquecimento a 100 °C. De uma maneira geral, independentemente da fonte de citrato e da condição de síntese, todas as nanopartículas interagiram com os AMGs, todavia a melhor resposta foi encontrada para as nanopartículas de ouro reduzidas por citrato de sódio monobásico (AuNPs-citrato). Portanto, como as AuNPs-H propostas no presente trabalho também interagiram com os AMGs decidiu-se fazer um estudo comparativo com as AuNPs-citrato, ambas estocadas a 4°C. Na Tabela 25, um resumo em relação aos métodos de obtenção das AuNPs-H e das AuNPs-citrato é apresentado.

Na Figura 52 são mostrados os perfis de UV-Vis de dispersões 40% v/v de AuNPs-H e 32% v/v de AuNPs-citrato. É possível verificar que a dispersão de AuNPs-H apresenta  $\lambda_{\text{max}}$  da banda LSPR (511 nm) menor em comparação com AuNPs-citrato (529 nm). Isto indica que AuNPs-H possuem um diâmetro médio menor que AuNPs-citrato, o que pode ser explicado pelo fato de que AuNPs-H são obtidas partir da redução, por  $\text{NaBH}_4$ , em temperatura ambiente (menor agregação). Observa-se também que a resposta óptica das AuNPs-citrato (linha b Figura 52,  $\log I_0/I$  0,34) é mais intensa que AuNPs-H (linha a Figura 52,  $\log I_0/I$  0,32) mesmo considerando menor população de nanopartículas dispersas no meio.



**Tabela 25:** Diferenças entre os parâmetros de síntese de AuNPs-H e AuNPs-citrato

Parâmetro	AuNPs-H	AuNPs-citrato
Agente redutor	NaBH <sub>4</sub> 0,04 mol L <sup>-1</sup>	Citrato de sódio monobásico 0,05 mol L <sup>-1</sup>
Temperatura de reação	Ambiente	100 °C
Tempo de reação	5 minutos	15 minutos
Ordem de adição	Primeiro fonte de ouro e após agente redutor	Simultânea para fonte de ouro/agente redutor
Concentração de AuNPs	$3,1 \times 10^{-9}$ mol L <sup>-1</sup>	$7,4 \times 10^{-10}$ mol L <sup>-1</sup> [7]
pH da dispersão de síntese	7,1	3,7[7]

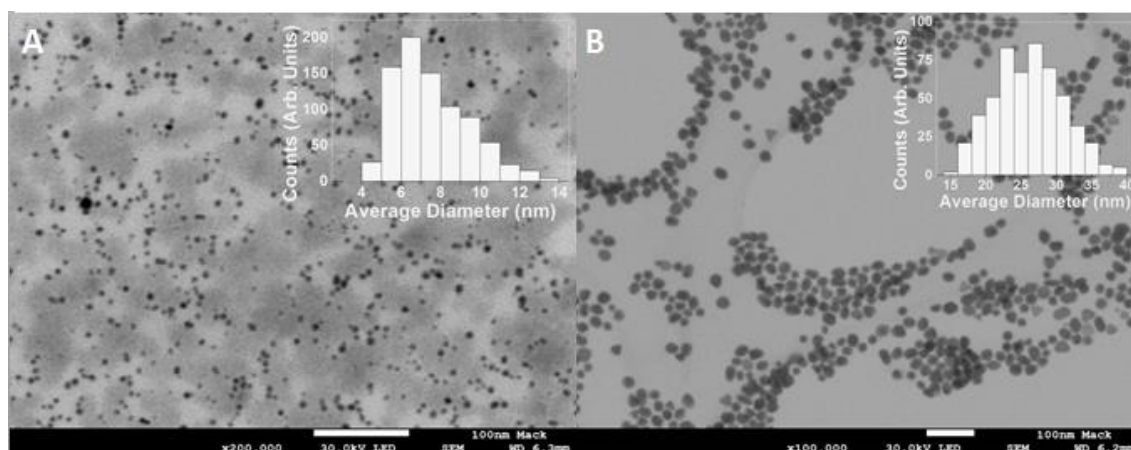
**Figura 52:** Comparação dos perfis de UV-Vis (a) AuNPs-H e (b) AuNPs-citrato.

Na Tabela 26 são mostrados os dados morfológicos, obtidos por STEM, e os parâmetros de Dh e potencial  $\zeta$ . Ambas as nanopartículas apresentam a mesma circularidade e razão de aspecto. Em relação ao potencial  $\zeta$  observa-se que AuNPs-citrato possuem densidade de cargas negativas na superfície ligeiramente maior, todavia os valores são próximos, o que indica que não há uma relação direta, neste caso (do potencial  $\zeta$ ), com o tamanho das nanopartículas. A influência do agente redutor também parece não ter tido relevância em estabelecer diferença na carga superficial.

**Tabela 26:** Valores de potencial  $\zeta$ , Dh, e dados de morfologia obtidos para AuNPs-H e AuNPs-citrato.

Nanopartículas	Potencial $\zeta$ (mV)	Dh (nm)	Diâmetro médio por STEM (nm)	Circularidade	Razão de aspecto
AuNPs-H	$-34,5 \pm 2,8$	$11,6 \pm 0,9$	$7,7 \pm 1,8$	$0,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$
AuNPs-citrato	$-39,8 \pm 0,2$	$34,4 \pm 5,3$	$26,1 \pm 4,9$	$0,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$

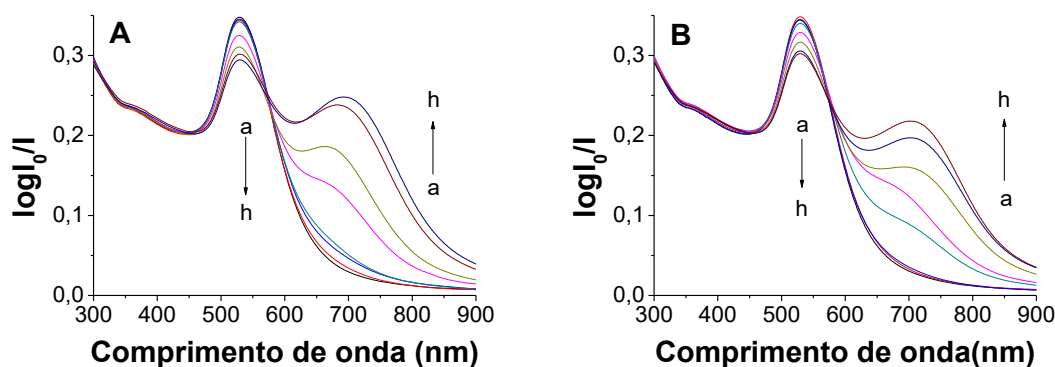
Na Figura 53 são apresentadas as imagens de microscopia por STEM onde se pode perceber que a diferença observada em relação às bandas LSPR é compatível com a diferença de tamanho da AuNPs-citrato em relação à AuNPs-H. Os dados de diâmetro médio por STEM foram maiores que para os Dh para ambos os casos.



**Figura 53:** Imagens obtidas por STEM para: (A) AuNPs-H e (B) AuNPs-citrato.

Em seu trabalho, Santos [7] estudou a interação de AuNPs-citrato com sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina, entre outros AMG. Os espectros da Figura 54, obtidos a partir dos dados da autora, mostram que o aumento da concentração de sulfato de neomicina ou de sulfato de gentamicina promove o decréscimo da intensidade da banda LSPR (banda transversal) em 529 nm e, o aparecimento de uma nova banda. Para AuNPs-H com adição de sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina há somente a deformação da banda LSPR.

A faixa linear para sulfato de gentamicina nas dispersões de AuNPs-citrato ( $2,4$  a  $72,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foi uma ordem de grandeza maior e cobriu uma ordem de magnitude a menos do que a faixa observada para AuNPs-H ( $0,6$  a  $600 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Para o sulfato de neomicina, a concentração mais baixa ( $7,3 \mu\text{g L}^{-1}$  para AuNPs-H) é da mesma ordem de grandeza da obtida com a dispersão de AuNPs-citrato ( $3,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Em relação à saturação da sonda, percebe-se que para AuNPs-H isso só ocorre uma ordem de grandeza acima quando comparada com AuNPs-citrato.



**Figura 54:** Espectros em extinção de dispersões de trabalho de AuNPs-citrato nas concentrações crescentes de (A) sulfato de neomicina de: 3,6 a 58,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  (a) ausência do AMG, (b) 3,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (c) 7,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (d) 14,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (e) 29,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (f) 36,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (g) 54,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (h) 58,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (B) sulfato de gentamicina de: (a) ausência do AMG, (b) 2,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (c) 4,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (d) 16,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (e) 24,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (f) 50,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (g) 64,8,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (h) 72,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Outra diferença constatada entre a interação de AuNPs-citrato e de AuNPs-H com o sulfato de neomicina e com o sulfato de gentamicina é o comportamento da resposta óptica em diferentes faixas de pH. As AuNPs-H, como já mostrado no item 4.3, apresentam resposta óptica linear tanto em pH 4,0 quanto em pH 7,2. Já as AuNPs-citrato passam a não interagir com os AMG a partir do pH acima de 4,2, respondendo somente em condição ácida elevada. Na tentativa de elucidar esse fato, fez-se medições de potencial  $\zeta$  a carga superficial nas nanopartículas em ausência e na presença dos dois AMGs. Para tal utilizou-se tampão citrato (pH 4,0;  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), tampão fosfato (pH 7,2;  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) e tampão borato (pH 9,5;  $4,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ ) para ajustar o pH das dispersões de ambas as nanopartículas de ouro. Sendo que, o tampão borato foi testado somente para a AuNPs-H. Os resultados apresentados na Tabela 27 indicam que para AuNPs-H, quanto maior a concentração de sulfato de gentamicina, mais positiva torna-se a carga superficial das nanopartículas. Tanto em pH 4,0, quanto em pH 7,2 o comportamento é equivalente. Para AuNPs-citrato em pH 4,0, o resultado é semelhante, todavia, em pH 7,2 se observa uma resistência em relação ao aumento da carga superficial, o que pode justificar a ausência de interação da sonda com o AMG. Santos [73] descreveu a natureza da interação AuNPs-citrato-AMG como sendo dependente do pH, por conta de sua natureza eletrostática do processo. Portanto, presume-se que a interação AuNPs-H-AMG não é do tipo eletrostática, por conta da interação acontecer tanto nas faixas básica e ácida onde a carga do AMG tende a ser, respectivamente, desprotonada e protonada.

Para AuNPs-H em pH 9,5, verifica-se que provavelmente há um o excesso de íons  $\text{OH}^-$  presentes no meio, estes podem estar recobrindo a superfície da nanopartículas, deixando os sítios menos disponíveis para interação com o AMG, por isso mesmo, no nível de concentração mais alto de sulfato de gentamicina o potencial não se torna positivo. Isto sugere que provavelmente em pH 9,5 não haja mais interação efetiva.

**Tabela 27:** Potenciais  $\zeta$  de dispersões AuNPs-citrato e AuNPs-H na presença de sulfato de gentamicina em diferentes valores de pH.

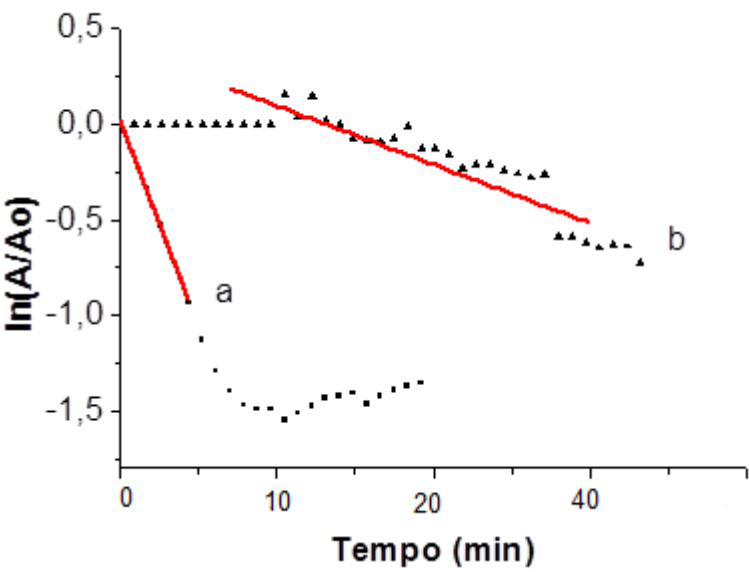
Sonda	Concentração de sulfato de gentamicina ( $\text{mol L}^{-1}$ )	Potencial $\zeta$		
		pH 4,0	pH 7,2	pH 9,5
AuNPs-H	0,0	$-41,0 \pm 0,6$	$-58,7 \pm 0,5$	$-69,1 \pm 1,5$
	$1,0 \times 10^{-8}$	$-39,9 \pm 2,8$	$-57,5 \pm 1,5$	$-69,0 \pm 0,4$
	$1,0 \times 10^{-7}$	$-36,0 \pm 0,7$	$-52,2 \pm 0,9$	$-64,3 \pm 0,9$
	$1,0 \times 10^{-6}$	$-22,5 \pm 2,6$	$-13,4 \pm 4,1$	$-61,9 \pm 0,3$
	$1,0 \times 10^{-5}$	$-0,7 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,7$	$-55,0 \pm 0,2$
	$1,0 \times 10^{-4}$	$6,5 \pm 1,0$	$11,9 \pm 1,3$	$-44,0 \pm 0,3$
AuNPs-citrato	0,0	$-39,8 \pm 0,2$	$-31,8 \pm 1,2$	-
	$1,0 \times 10^{-8}$	$-36,7 \pm 0,6$	$-27,8 \pm 3,4$	-
	$1,0 \times 10^{-7}$	$-36,0 \pm 0,6$	$-34,7 \pm 1,2$	-
	$1,0 \times 10^{-6}$	$-22,7 \pm 2,2$	$-36,8 \pm 1,4$	-
	$1,0 \times 10^{-5}$	$-3,3 \pm 1,2$	$-31,9 \pm 3,0$	-
	$1,0 \times 10^{-4}$	$3,6 \pm 0,5$	$-29,4 \pm 1,1$	-

Uma limitação no estudo de Santos [73] foi não ter conseguido determinar o AMG tobramicina em amostras de saliva, devido a interferência da matriz de fluido biológico. Portanto, o presente trabalho com AuNPs-H representa uma evolução quando comparado ao de Santos [73], pois através de utilização de cartuchos de SPE MIP-AMG foi possível minimizar a interferência da matriz de saliva.

Por fim, foi comparada a atividade catalítica das AuNPs-H e das AuNPs-citrato, frente a redução do íon 4-nitrofenolato. Nesse estudo foram obtidas as taxas de constante de velocidade aparente ( $k_1$ ) e demais parâmetros do modelo cinético (Tabela 28). Constatou-se que AuNPs-citrato encontram-se mais protegidas (blindadas), pois a cinética de atividade catalítica foi mais lenta em comparação com as AuNPs-H. Pelo fato das AuNPs-H não apresentarem capeamento orgânico, havendo sítios mais disponíveis que podem justificar a reação mais rápida.

**Tabela 28:** Parâmetros da atividade catalítica das nanopartículas AuNPs-H e AuNPs-citrato.

Sonda	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	Equação	R <sup>2</sup>	Faixa de tempo linear (min)
AuNPs-H	$4,3 \times 10^{-3}$	$y = -0,2892x - 0,0168$	0,99	0 – 6
AuNPs-Citrato	$6,5 \times 10^{-4}$	$y = -0,0388x + 0,4349$	0,94	9 – 40



**Figura 55:** Perfil de decréscimo de  $\ln (A/A_0)$  para o íon 4-nitrofenolato (400 nm) na presença de: (a) AuNPs-H e (b) AuNPs-citrato

## 5 Conclusões

As sínteses das nanopartículas realizadas no reator Orb apresentaram boa reprodutibilidade. Os perfis espectrais no UV-Vis, obtidos após as sínteses, indicaram que as AuNPs-CTAB obtiveram  $\lambda_{\max}$  variando entre 512 e 522 nm, e que as AuNPs-C10DAB demonstraram uma variação entre 513 e 522 nm. Já as AuNPs-H mostraram  $\lambda_{\max}$  estável e em 510 nm. Para AuNPs-CTAB- $10^{-2}$  e AuNPs-C10DAB- $10^{-2}$  (concentração acima da CMC/CVC), os perfis apresentaram baixa definição da banda LSPR, mas que se tornaram mais definidas com o passar do tempo.

De acordo com as caracterizações por STEM, AuNPs-H revelaram o menor diâmetro médio, de  $7,7 \pm 1,8$  nm, o que é justificado pela ausência de recobrimento orgânico, e as AuNPs-C10BAB- $10^{-2}$  tiveram o maior diâmetro ( $25,7 \pm 6,8$  nm). Considerando-se os dados de DLS, constatou-se que para AuNPs-CTAB o potencial  $\zeta$  tornou-se menos positivo com o passar do tempo, o que indica que as moléculas de CTAB tendem a se desligar da superfície das nanopartículas. Por outro lado, para AuNPs-C10BAB este efeito não foi relevante, pois, em alguns casos observou-se também aumento no valor do potencial  $\zeta$ .

Em relação à estabilidade em situação de estocagem, com o passar do tempo, verificou-se que a 27°C a taxa de aumento do diâmetro médio das nanopartículas foi maior do que quando as mesmas foram estocadas a 4°C. Já as AuNPs-C10BAB- $10^{-2}$  apresentaram maior  $\Delta\lambda_{\max}$  em ambas as temperaturas de estocagem, no período avaliado, sendo a variação da intensidade ( $\Delta\max$ ) de até 85% (em relação ao sinal inicial) quando estas foram estocadas à 27°C. As AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$  (concentração abaixo da CVC) revelaram um comportamento anômalo, pois com o passar do tempo verificou-se decréscimo na intensidade do  $\lambda_{\max}$  até o completo desaparecimento do sinal, sugerindo a perda de confinamento quântico. As AuNPs-H, quando estocadas a 4°C, mostraram boa estabilidade durante o período de 7 meses.

A partir dos resultados de atividade catalítica confirmou-se que quanto maior era a concentração do surfactante na dispersão de nanopartículas, mais acelerada é a cinética de reação, assim concluiu-se que o surfactante foi fundamental no processo de

transferência de hidreto, promovendo a redução do íon 4-nitrofenolato. Em contrapartida, AuNPs-H também apresentam cinética de redução acelerada, pois possuem naturalmente íons hidreto ao redor, recobrando sua superfície.

Em relação à estabilidade de medição das dispersões diluídas, certificou-se que AuNPs-CTAB- $10^{-4}$  e AuNPs-C10DAB- $10^{-4}$  não possuem estabilidade, uma vez que a concentração de surfactante no meio ( $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) encontra-se abaixo da CMC/CVC. Acredita-se que os monômeros de livres de surfactante passem a agir como uma ponte, promovendo a agregação de nanopartículas. Para as demais dispersões diluídas de AuNPs-CTAB e AuNPs-C10DAB, observou-se estabilidade durante todo o período de monitoramento de 120 min. Apesar de apresentarem estabilidade, nenhuma dessas nanopartículas interagiu significativamente com os aminoglicosídeos testados. Alternativamente AuNPs-H mostraram boa estabilidade, tanto ausência quanto na presença do tampão citrato (pH 4.0) ou tampão fosfato (pH 7,2), e interagiram substancialmente com os aminoglicosídeos sulfato de canamicina, sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina. Com a sonda AuNPs-H foi possível realizar o monitoramento de sinal analítico no comprimento de onda de 681 nm e na razão dos comprimentos de onda 681/511. A estabilidade das dispersões de trabalho da sonda AuNPs-H, contendo os tampões citados acima, também foi avaliada na presença de sulfato de gentamicina ( $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ou de sulfato de neomicina ( $91 \mu\text{g L}^{-1}$ ), e o período para realização medições confiáveis foi de até 50 min.

Os estudos de seletividade indicaram que os co-fármacos cloridrato de nafazolina e fosfato dissódico de dexametasona, bem como as matrizes de leite integral e saliva, ambos após desproteinização, interferem no sinal da sonda, comprometendo a seletividade das análises. Portanto, cartuchos de SPE de MIP-AMG foram utilizados para minimizar a interferência e os resultados foram promissores, demonstrando que após a eluição com 7 mL de água ultrapura, a interferência da matriz de leite das frações 8 e 9 (reconstituídas na sonda AuNPs-H) foi reduzida para apenas 5%, e as interferências da matriz de saliva e dos co-fármacos reduzem para 2%. Os cartuchos de SPE habilitou recuperar nas frações 8 e 9 (eluição com tampão citrato, pH 4.0) aproximadamente 70% sulfato de gentamicina, e na fração 8 aproximadamente 50% de sulfato de neomicina.

Os parâmetros de mérito do método desenvolvido usando a sonda de AuNPs-H indicaram valores de LD de 0,06 e  $6,20 \mu\text{g L}^{-1}$ , para sulfato de gentamicina e sulfato de

neomicina, respectivamente. As faixas lineares variaram de 0,6 a 600 e de 7,3 a 550,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para sulfato de gentamicina e sulfato de neomicina, respectivamente.

A determinação de AMG em amostras de leite integral (fortificadas com sulfato de gentamicina) indicou ser possível recuperar quase 40% do analito. Similarmente, a determinação de sulfato de neomicina em amostras de medicamento nasal produziu recuperações de analito próximas a 45%. Nas amostras de saliva conseguiu-se quantificar  $72,4 \pm 3,3 \mu\text{g L}^{-1}$  de sulfato de neomicina e embora tal resultado signifique recuperação abaixo de 50%, tal resultado foi relevante considerando a complexidade das matrizes e pelo fato dos AMGs serem moléculas que dificilmente conseguem ser detectadas por métodos diretos. Tradicionalmente faz-se derivatização, de forma a se obter produtos que possuam absorção e/ou fluorescência, todavia os limites de detecção são altos (que ultrapassam muito a capacidade de retenção por SPE do tipo MIP-AMG). Esse foi um dos entraves para se conseguir validar os resultados através de métodos comparativos, pois a sensibilidade do método AuNPs-H é significativamente maior que a de métodos tradicionais (no caso usando HPLC com derivatização com OPA).

Por fim, a comparação entre AuNPs-citrato e AuNPs-H evidenciaram que embora os agente redutores sejam diferentes (bem como o processo de síntese), a circularidade e a razão de aspecto das nanopartículas não diferem. Todavia, AuNPs-citrato apresentam maior diâmetro médio ( $26,1 \pm 4,9 \text{ nm}$  (medido por STEM)) e maior intensidade de resposta óptica. Em contrapartida a saturação da sonda AuNPs-H na presença de sulfato de gentamicina ou de sulfato de neomicina só é alcançada com concentração uma ordem de grandeza acima em relação a saturação da sonda AuNPs-citrato na presença dos mesmos AMGs. Outra particularidade é que a interação AuNPs-citrato-AMG é de natureza eletrostática e dependente de pH ácido, já a interação AuNPs-H-AMG ocorre tanto em pH neutro quando em pH ácido. Em relação à atividade catalítica as AuNPs-H foram mais reativas.



- [1] SCHATZ, A.; BUGLE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Experimental Biology and Medicine**, 55(1), p. 66–69, 1944.
- [2] OURO FINO - SAÚDE ANIMAL. **Controle de resíduos de antimicrobianos no leite.** Disponível em: <<https://www.ourofinosaudeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/control-de-residuos-de-antimicrobianos-no-leite/>>. Acesso em: 26 maio de 2019.
- [3] CODEX ALIMENTARIUS. **Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CX/MRL 2-2018.** 2018.
- [4] FRUTOS, P. et al. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 21 (2000) 1149–1159.
- [5] CLAES, P. J.; BUSSON, R.; VANDERHAEGHE, H. Determination of the component ratio of commercial gentamicins by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 298, p. 445–457, 1984.
- [6] LIU, J.; PENG, Q. Protein-gold nanoparticle interactions and their possible impact on biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 55, p. 13–27, 2017.
- [7] SANTOS, H. **Interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas de ouro e o desenvolvimento de sonda para a determinação espectrofotométrica ultra traço de tobramicina.** 2014. 219 f. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. 2014.
- [8] MIRANDA ANDRADES, J. R. **Avaliação da resposta óptica decorrente da interação entre gentamicina e nanopartículas de ouro esféricas e em forma de bastão visando aplicação analítica.** 2015. 132 f. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. 2015.
- [9] KHAN, Z. et al. Au(III)-CTAB reduction by ascorbic acid: Preparation and characterization of gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces**, v. 104, p. 11–17, 2013.
- [10] FENGER, R. et al. Size dependent catalysis with CTAB-stabilized gold nanoparticles. **The Journal of Chemical Physics**, p. 9343–9349, 2012.
- [11] LIM, J. et al. Surface Modification of Citrate-Capped Gold Nanoparticles Using CTAB Micelles. **Bulletin-Korean Chemical Society**. 35 (2014) 2567–2569.

- [12] DANIEL, M. C. M.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 293–346, 2004.
- [13] OTUBO, L. **TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS FUNCIONALIZADAS**. [s.d.]. UNICAMP. [s.d.].
- [14] KLABUNDE, K. **Nanoscale materials in chemistry**. 2.ed. John Wiley & Sons, Inc, 2001. 807p.
- [15] EL-SAYED, M. A. Small Is Different: Shape-,Size-, and Composition-Dependent Properties of Some Colloidal Semiconductor Nanocrystals. **Accounts of Chemical Research**, v. 37, n. 5, p. 326, 2004.
- [16] HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 1, p. 13–28, 2010.
- [17] WILLETS, K. A.; Van Duyne, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry** 58 (2007) 267-97.
- [18] CASANOVA, M. C. R. **Síntese , caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis Síntese , caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. Universidade de São Paulo. 2010.
- [19] BOHREN, C. F.; WILEY, J. **Absorption and Scattering of Light by Small Particles**, New York, 1998
- [20] TURKEVICH, JOHN; COOPER, P. H. J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 55, n. c, p. 55–75, 1951.
- [21] NGUYEN, D. T.; KIM, D. J.; KIM, K. S. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. **Micron**, v. 42, n. 3, p. 207–227, 2011.
- [22] HERIZCHI, R. et al. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 596–602, 2016.
- [23] KABASHIN, A. V; WINNIK, M.; MEUNIER, M. Synthesis of Size-Tunable Polymer-Protected Gold Nanoparticles by Femtosecond Laser-Based Ablation and Seed Growth Se. **The Journal of Chemical Physics.**, p. 9526–9531, 2009.
- [24] ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 3–4, p. 638–665, 2013.
- [25] PARAB, H. et al. An anisotropic snowflake-like structural assembly of polymer-capped gold nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 5, p. 2173–2180, 2011.

- [26] POLTE, T. J. et al. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation. **Journal of the American Chemical Society** 132 (2010) 1296–1301.
- [27] GUO, S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, n. 2, p. 181–192, 2007.
- [28] SPERLING, R. et al. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1896–1908, 2008.
- [29] LIU, C. et al. Dichroic Behavior of Gold Nanoparticles Synthesized in Aqueous Solution with Insufficient Reducing Agent. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 7197–7202, 2018.
- [30] SAU, T. K. et al. Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 3, n. 4, p. 257–261, 2001.
- [31] XU, F.; ZHANG, Q.; GAO, Z. Simple one-step synthesis of gold nanoparticles with controlled size using cationic Gemini surfactants as ligands: Effect of the variations in concentrations and tail lengths. **Colloids and Surfaces**, v. 417, p. 201–210, 2013.
- [32] SUBRAMANIAM, A. B. et al. The effect of double-chain surfactants on armored bubbles: a surfactant-controlled route to colloidosomes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 48, p. 6476, 2007.
- [33] OLENIN, A. Y. et al. Formation of surface layers on silver nanoparticles in aqueous and water-organic media. **Colloid Journal**, v. 70, n. 1, p. 71–76, 2008.
- [34] TOLAYMAT, T. M. et al. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. **The Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 999–1006, 2010.
- [35] LI, H.; ROTHBERG, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 101 (2004) 14036–14039.
- [36] PÉREZ, Y.; MANN, E.; HERRADÓN, B. Preparation and characterization of gold nanoparticles capped by peptide-biphenyl hybrids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 359, n. 2, p. 443–453, 2011.
- [37] LIU, X. et al. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. **Colloids and Surfaces**, v. 58, n. 1, p. 3–7, 2007.
- [38] ROSEN, M. J. **Surfactants and interfacial phenomena**, 3.ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2004. 455p.
- [39] MORSY, S. Role of Surfactants in Nanotechnology and Their Applications. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 3, n. 5, p. 237–260, 2014.
- [40] MYERS, D. **Surfactant science and technology**. 3rd ed ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2006. v. 47

- [41] KWON, K. et al. Controlled synthesis of icosahedral gold nanoparticles and their surface-enhanced raman scattering property. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 3, p. 1161–1165, 2007.
- [42] KAZAKOVA, J. et al. A colorimetric study of the interaction of cationic and anionic surfactants with anionic gold nanoparticles. **Colloid and Polymer Science**, v. 295, n. 11, p. 2141–2149, 2017.
- [43] CADORIN, S. et al. Chemical Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. **Sensors & Actuators B**, v. 173, p. 483–490, 2012.
- [44] RAMANATHAN, M. Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications. **Physical Chemistry Chemical Physics**. 15 (2013) 10580-10611.
- [45] STUART, M. C. A.; BOEKEMA, E. J. Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid – detergent systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**. 1768 (2007) 2681–2689.
- [46] MIRANDA-ANDRADES, J. R. et al. Spherical gold nanoparticles and gold nanorods for the determination of gentamicin. **Spectrochimica Acta - Part A**, v. 172, n. May, p. 126–134, 2017.
- [47] BERA, A.; OJHA, K.; MANDAL, A. Synergistic effect of mixed surfactant systems on foam behavior and surface tension. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 16, n. 4, p. 621–630, 2013.
- [48] PATEL, V. et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects pH controlled size / shape in CTAB micelles with solubilized polar additives: A viscometry , scattering and spectral evaluation. **Colloids and Surfaces A**, v. 455, p. 67–75, 2014.
- [49] WULF, A. Determining the Size and Shape of Gold Nanoparticles. **Carthage College**, (2011).
- [50] SEIP, C. T.; CONNOR, C. J. O. The fabrication and organization metallic formed of self-assembled in reverse micelles. **Nanostructured Materials**. 12 (1999) 183–186.
- [51] NIKOOBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods ( NRs ) Using Seed-Mediated Growth Method. **Chemistry of Materials**. 10 (2003) 1957–1962.
- [52] E. JUNQUERA, et al. Self-Organization of the Ternary Didecyldimethylammonium Bromide / Octyl-D-glucopyranoside / Water System. **Langmuir**. 21 (2005) 7143–7152.
- [53] BURGO, P. DEL; AICART, E.; JUNQUERA, E. Mixed vesicles and mixed micelles of the cationic-cationic surfactant system: Didecyldimethylammonium bromide/dodecylethyldimethylammonium bromide/water. **Colloids and Surfaces A**, v. 292, n. 2–3, p. 165–172, 2007.
- [54] SHANE, H. L. et al. Divergent hypersensitivity responses following topical application of the quaternary ammonium compound,

didecyldimethylammonium bromide. **Journal of Immunotoxicology**, v. 14, n. 1, p. 204–214, 2017.

- [55] GRIFFIN, L. R. et al. A Comparison of Didodecyldimethylammonium Bromide Adsorbed at Mica / Water and Silica / Water Interfaces using Neutron Reflection. **Journal of Colloid and Interface Science**. 478 (2016) 365-373.
- [56] ZHANG, L. et al. Didodecyldimethylammonium bromide lipid bilayer-protected gold nanoparticles: Synthesis, characterization, and self-assembly. **Langmuir**, v. 22, n. 6, p. 2838–2843, 2005.
- [57] LUCHINI, A.; VITIELLO, G. Understanding the Nano-bio Interfaces : Lipid-Coatings for Inorganic Nanoparticles as Promising Strategy for Biomedical Applications. **Frontiers in Chemistry** 7 (2019) 1–16.
- [58] ROBERT I. NOONEY, DHANASEKARAN THIRUNAVUKKARASU, A. E. O.; YIMEI CHEN C, R. J. Self-assembly of supermicro- and meso-porous silica and silica/gold nanoparticles using double-chained surfactants. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 75, n. 3, p. 183–193, 2004.
- [59] TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. 3.ed. São Paulo, Atheneu, 2014. 620p.
- [60] OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 21, n. 4, p. 444–452, Dec. 2006.
- [61] RIBEIRO, A. M. F, **Farmacologia dos Antibióticos Aminoglicosídeos**. (Dissertação de mestrado). Porto, 2017. 72p. Faculdade de Ciências da Saúde Universidade Fernando Pessoa..
- [62] KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Basic & Clinic Pharmacology**. 9.ed. McGraw-Hill Medical, 2004.1202p.
- [63] SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/>> Acesso em : 25 de maio de 2019.
- [64] SIKARRA, D. et al. Techniques for solubility enhancement of poorly soluble drugs : an overview. **Journal of Medical Pharmaceutical and Allied Sciences**, v. 1, p. 1–22, 2012.
- [65] EDSON, R. S.; TERRELL, C. L. The Aminoglycosides. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 5, p. 519–528, May 1999.
- [66] GONÇALVES, S. **Avaliação da presença de resíduos de gentamicina em leite de vaca após o tratamento de mastite**. 2008. 77p f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2008.
- [67] SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use , sales , exposure pathways , occurrence , fate and effects of veterinary antibiotics ( VAs ) in the environment. **Chemosphere**. 65 (2006) 725–759. [68] FAROUK, F.; AZZAZY, H. M. E.; NIESSEN, W. M. A. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. **Analytica Chimica Acta**, 2015.

- [68] GRACE, A. N.; PANDIAN, K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles - A brief study. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* . 297 (2007) 63–70..
- [69] WANG, M.T. et al. Silver-Coated Gold Nanoparticles as Concentrating Probes and Matrices for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Aminoglycosides. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**. v. 20, n. 10, p. 1925–1932, 2009.
- [70] WANG, R. et al. Spectral method determination of kanamycin sulfate using both gold nanoparticles and quantum dots. **Analytical Methods**. 5 (2013). 5302-5308.
- [71] APYARI, V. V et al. Label-free gold nanoparticles for the determination of neomycin. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 115, p. 416–420, 2013.
- [72] SANTOS, H. S. et al. Selective determination of tobramycin in the presence of streptomycin through the visible light effect on surface plasmon resonance of gold nanoparticles. **Microchemical Journal**, v. 116, n. September 2014, p. 206–215, 2014.
- [73] YELURI, T. et al. Neomycin and gentamicin detection via molecular recognition with cyclam-decorated gold nanoparticles. **Journal Supramolecular Chemistry**. 27 (2015). 772-779
- [74] JIANG, Y. et al. Ultrasensitive analysis of kanamycin residue in milk by SERS-based aptasensor. **Talanta**, v. 197, n. January, p. 151–158, 2019.
- [75] MCGLINCHEY, T. A. et al. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. **Analytica Chimica Acta** 4 (2008) 1–15.
- [76] TORIBIO-DELGADO, A. F. et al. Is deproteinization necessary in the determination of human plasmatic steroids by GC / IT-MS / MS analysis ?. **Journal of Applied Bioanalysis**.1 (2015) 10–18.
- [77] BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J.L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography**. 975 (2002) 47–70.
- [78] KIJAK, P. J.; JACKSON, J.; SHAIKH, B. Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, 691 (1997) 377–382.
- [79] ES, R. M. VAN et al. Detection of gentamicin in milk by immunoassay and flow injection analysis with electrochemical measurement. **Analytica Chimica Acta**, v. 429, n. 1, p. 37–47, 2001.
- [80] WANG, R. et al. Determination of aminoglycoside antibiotics by a colorimetric method based on the aggregation of gold. **Nano brief reports and reviews**. 8 (2013) 1–9.
- [81] YOUNG, M. S. et al. A Rapid SPE-Based Analytical Method for UPLC/MS/MS Determination of Aminoglycoside Antibiotic Residues in Bovine Milk, Muscle, and Kidney. **Journal of AOAC**. Int. 97-6, (2014). 1737–1742.

- [82] YAN, S. et al. Identification of Aminoglycoside Antibiotics in Milk Matrix with a Colorimetric Sensor Array and Pattern Recognition Methods. **Analytica Chimica Acta**, 2018.
- [83] GUKOWSKY, J. C. et al. Cysteamine-Modified Gold Nanoparticles as a Colorimetric Sensor for the Rapid Detection of Gentamicin. **Journal of Food Science**. 83, (2018). 1631-1638
- [84] FLURER, C. L.; WOLNIK, K. A. Quantitation of gentamicin sulfate in injectable capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A** 663 (1994) 259–263.
- [85] RYAN, J. A. Colorimetric Determination of Gentamicin, Kanamycin, Tobramycin, and Amikacin Aminoglycosides with 2,4-dinitrofluorobenzene. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 73 (1984) 1301–1302.
- [86] ARCELLONI, C. et al. Quantification of gentamicin in Mueller – Hinton agar by high- performance liquid chromatography. **Journal Chromatography B**. 753 (2001) 151–156.
- [87] AL-MAJED, A. A. et al. Fluorimetric Determination of Gentamicin in Dosage Forms and Biological Fluids Through Derivatization with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1 , 3-Diazole (NBD-Cl). **Mikrochimica Acta**. 6 (2003) 1–6.
- [88] ZHENG, H. et al. Determination of Neomycin in Aquatic Products Using an Immunoaffinity Column Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, p. 379–386, 2017.
- [89] POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSKA, J. Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 914 (2001) 59–66.
- [90] LIU, Q. et al. Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in feeds using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering. **RSC Advances**, v. 7, p. 1251–1259, 2016.
- [91] BAZZAN, J. et al. Determination of aminoglycoside residues in milk and muscle based on a simple and fast extraction procedure followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and time of flight mass spectrometry. **Talanta**, v. 154, p. 38–45, 2016.
- [92] HUIDOBRO, A. L.; GARCÍA, A.; BARBAS . C. Rapid analytical procedure for neomycin determination in ointments by CE with direct UV detection. **Journal of pharmaceuticals and biomedical analysis**. 49 (2009) 1303–1307.
- [93] OERTEL, R.; RENNER, U.; KIRCH, W. Determination of neomycin by LC – tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 35, p. 633–638, 2004.
- [94] SHAIKH, B.; JACKSON, J.; GUYER, G. Determination of neomycin in plasma and urine by high- performance liquid chromatography. **Journal Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications** v. 571, p. 189–198, 1991.

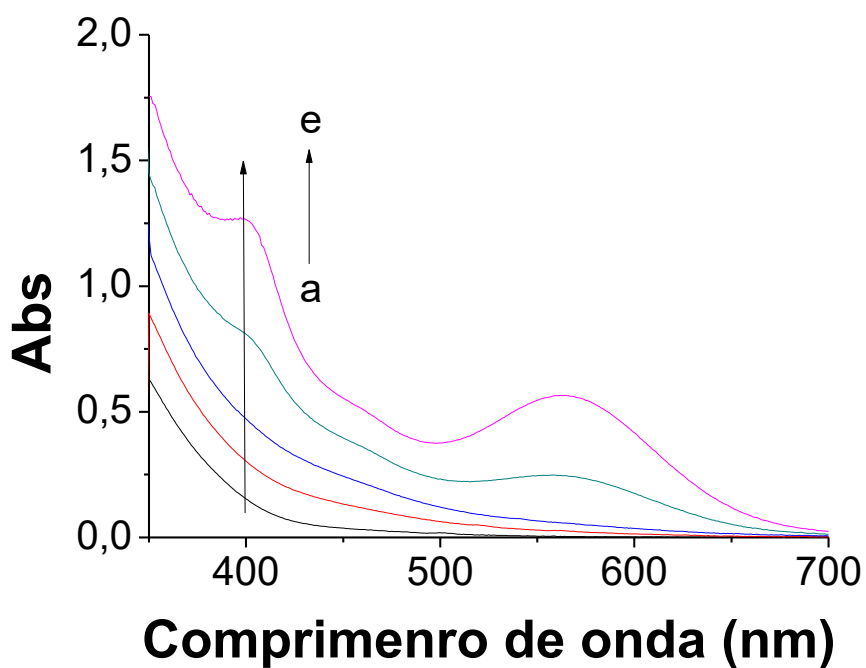
- [95] MIGUEL, E. M. **Determinação de quercetina, kanamicina e piraclostrobina usando métodos fotoluminescentes e polímeros de impressão.** (Tese de doutorado) Rio de Janeiro, 2012. 193p. Departamento de Química, Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro.
- [96] SHAH, N. A Brief Overview of Molecularly Imprinted Polymers: From Basics to Applications A Brief Overview of Molecularly Imprinted Polymers: From Basics to Applications. **Journal of Pharmacy Research** v.5, 2015.
- [97] MOLINS-LEGUA, C.; Campins-Falcó, P. Solid phase extraction of amines. **Analytica Chimica Acta.** 546 (2005) 206–220.
- [98] FIGUEIREDO, E. C. et al. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** 44 (2008).
- [99] HILT, J. Z.; BYRNE, M. E. Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 56 (2004) 1599–1620.
- [100] YE, L. E. I.; MOSBACH, K. The Technique of Molecular Imprinting – Principle , State of the Art , and Future Aspects. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.** (2001) 107–113.
- [101] MORENO-GONZÁLEZ, D. et al. Evaluation of hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry and extraction with molecularly imprinted polymers for determination of aminoglycosides in milk and milkbased functional foods. **Talanta**, 2017.
- [102] TOLOZA, C.A. **Spectroanalytical methods using graphene quantum dots as photoluminescent probes for the determination of analytes of biological and pharmacological interest.** (Tese de doutorado) Rio de Janeiro, 2018. 158p. Departamento de Química, Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro.
- [103] ARAÚJO, I. et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Quanti fi cation of neomycin in rubella vaccine by off / on metal ion mediated photoluminescence from functionalized graphene quantum dots. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 220, p. 117139, 2019.
- [104] ALMEIDA, J. M. S. et al. Determination of gentamicin sulfate by batch-injection amperometry after solid-phase extraction using a kanamycin-template imprinted polymer. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 187–195, 2019.
- [105] FREEMAN, M. et al. The analysis of gentamicin sulphate in pharmaceutical specialities by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 2, n. 9, p. 1305–1317, 1979.
- [106] SEOUDI, R.; SAID, D. A. Studies on the Effect of the Capping Materials on the Spherical Gold Nanoparticles Catalytic Activity. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 01, n. 02, p. 51–61, 2011.



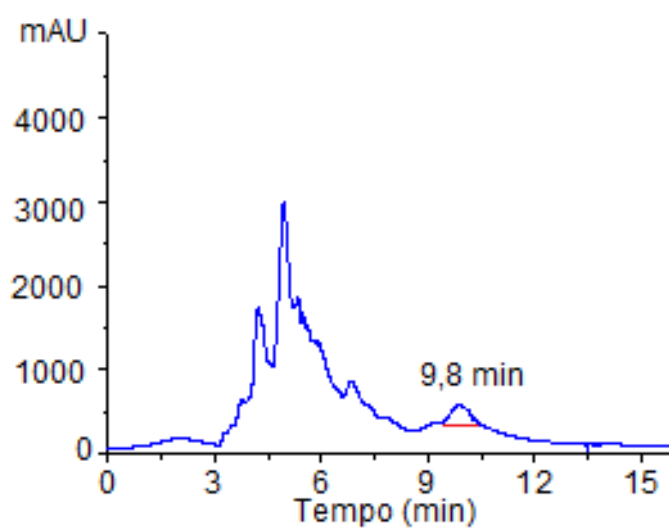
- [107] VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.
- [108] THOMSEN, V. “Precision and The Terminology of Measurement”. The Physics Teacher. **The Physics Teacher**, v. 35, p. 15–17, 1997.
- [109] KHAN, S. et al. Thioglycolic acid-CdTe quantum dots sensing and molecularly imprinted polymer based solid phase extraction for the determination of kanamycin in milk, vaccine and stream water samples. **Sensors & Actuators: B**, 2017.
- [110] MARTÍNEZ-ORTEGA, M. V.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Comparison of different sample preparation treatments for the analysis of wine phenolic compounds in human plasma by reversed phase high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, 502 (2004) 49–55.
- [111] PANALYTICAL, M. **Espalhamento de luz dinâmico (DLS)**. Disponível em: <<https://www.malvernpanalytical.com/br/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- [112] INSTRUTÉCNICA. **Potencial Zeta e estabilidade coloidal**. Disponível em: <<http://www.instrutecnica.com/represen/bic/teoriazeta.html>>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- [113] WEBER, A. **100 questões sobre granulometria**. Disponível em: <<http://www.acilweber.com.br/novidades-e-artigos/artigos/100-questoes-sobre-granulometria/>>. Acesso em: 15 jun. 2019.
- [114] SATAPATHY, S.; MOHANTA, J.; SI, S. Modulating the Catalytic Activity of Gold Nanoparticles through Surface Tailoring. **ChemistrySelect**, v. 1, n. 15, p. 4940–4948, 2016.

## 7 Anexos

### Anexo I – Método comparativo de derivatização por ninidrina



**Figura 56:** Perfis espectrais de padrões de sulfato de neomicina variando de: (a) ausência de AMG, (b) 30 µg mL<sup>-1</sup> (c) 60 µg mL<sup>-1</sup>, (d) 90 µg mL<sup>-1</sup> e (e) 120 µg mL<sup>-1</sup>, derivatizados por ninidrina.

**Anexo II – Método comparativo cromatográfico**

**Figura 57:** Cromatograma do padrão de sulfato de neomicina ( $2,0 \times 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>)