



Universidade de Brasília
Instituto de Física
Programa de Pós-Graduação em Física

Uso de espectroscopia vibracional na caracterização de nanocarreadores
baseados em nanopartículas lipídicas e metálicas carregados com
moléculas bioativas

Alexandre Silva Santos
Orientador: Prof^o. Dr. Sebastião William da Silva

Brasília-DF
Junho de 2023

Universidade de Brasília

Instituto de Física

Uso de espectroscopia vibracional na caracterização de nanocarreadores
baseados em nanopartículas lipídicas e metálicas carregados com
moléculas bioativas

Alexandre Silva Santos

Orientador: Prof^o. Dr. Sebastião William da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Física Experimental.

Orientador: Sebastião William da Silva

Brasília-DF

Junho de 2023

Sumário

Agradecimentos	6
Resumo	8
Abstract.....	9
Lista de Símbolo e Abreviaturas	10
Lista de figuras	11
Lista de Tabelas	14
Capítulo 1	15
Introdução geral.....	15
Capítulo 2	20
Nanopartículas Lipídicas	20
2.1 Lipídios e triglicerídeos	20
2.2 Sistemas Lipídicos Nanoestruturados.....	26
Capítulo 3	32
Resultados e discussões	32
3.1 – Investigação dos processos oxidativos das moléculas formadoras da nanoemulsão (O/A) de óleo de peixe e solutol.....	32
3.1.1 Introdução.....	32
3.1.2 Metodologia.....	33
3.1.3 Resultados e discussões	35
3.1.4 Conclusão	43
3.2 Estudo das interações entre o complexo <i>tris</i> (1,10 fenantrolina) de ferro (II) $[Fe(phen)_3]^{2+}$ e moléculas bioativas em sistema lipídico sólido nanoestruturado por meio das técnicas de espectroscopias vibracionais.....	44
3.2.1 Introdução	44
3.2.2 Metodologia.....	48
3.2.2 Resultados e discussões	50
<i>Espectros FTIR</i>	50
<i>Espectros Raman convencional</i>	55
3.2.4 Conclusão.....	60
3.3 Estudo da bioconjugação do anticorpo anti-SARS-CoV-2 spike na superfície de Nanopartículas de Au.	61
3.3.1 Introdução	61
3.3.2 Metodologia.....	65
3.3.3 Resultados e discussões	68
3.3.4 Conclusão	76

Capítulo 4	77
4 Conclusões gerais	77
Perspectivas de trabalhos futuros	78
Referências	79
Anexo I	90

Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu filho Davi e ao meu avó Raimundo Alexandre (*in memória*), pelo admirável homem que foi servindo para mim de inspiração.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus pelos dons e habilidades confiados a mim por ele, tendo anos magníficos de doutorado, porém árduos e difíceis por estar longe de quem amo.

A minha querida e magnífica esposa Juliana, por ser uma mulher que sempre esteve ao lado em todos os momentos, incentivando e motivando. Essa conquista não teria êxito sem você, ela também é sua, te amo!

Ao meu filho Davi por ser a minha maior fonte de inspiração e amor, onde a sua chegada me transformou, tornando-me um homem com outra mentalidade.

Aos meus pais Maria Antonia Silva Santos e Antonio Carlos Barros da Silva, pelo apoio incondicional e ser minha fonte de incentivo. Aos meus irmãos Carlos Eugênio, Maria Clara e Ana Karlly, minha avó Maria das Dores, meu avô Raimundo Alexandre (*In Memoriam*) e minha avó Raimunda (*In Memoriam*). A todos os meus familiares que embora estejam longe na maior parte do tempo, mas que estão sempre torcendo por mim. A minha sogra Ana Maria, meu sogro João Filho e meu cunhado Gabriel por sempre me apoiarem e serem presentes na minha vida. A minha comadre Vanuze por estar sempre me dando bons conselhos e instruções desde a época do ensino médio, ao seu irmão Cícero, que para mim o considero como um irmão também por todo seu apoio e torcida por mim. Aos seus pais Maria da Natividade e José Eugênio que me tratam como um filho.

Ao meu orientador Sebastião, por seus ensinamentos, paciência e conselhos, oportunidade de realização desta tese, por todo o seu apoio e confiança, pela dedicação e prazer de dividir os seus conhecimentos em todas as etapas deste trabalho. Afinal, foram anos de um bom convívio e orientação no laboratório. De onde saio com pilares acadêmico mais sólidos de que quando cheguei. Aprendendo muito não apenas na área

de pesquisa, como também em estar sempre à disposição para ajudar os outros. Muito obrigado por jamais abdicar o ensinamento quando necessário.

Ao Prof^o. Dr. Ricardo Bentes, Prof^a. Dra. Patrícia Bentes e Prof^o. Dr. Fernando Pavan e seus laboratórios por fornecerem as amostras de nanopartícula de ouro com anticorpo e nanolipídicas sólida, respectivamente, para que parte desse trabalho de tese pudesse ser concretizado. Ao Prof^o. Dr. João Paulo e Prof^a. Dra. Débora Silva e seus laboratórios por fornecerem as amostras de nanoemulsão de óleo de peixe para que parte desse trabalho de tese pudesse ser concretizado.

Aos meus amigos do laboratório que tornam o ambiente mais agradável. Em especial a Dra. Ísis, Dra. Patrícia Bentes, Dr. Marco Antonio, Dra. Maria e MSc. Débora Ezequiel pela incrível parceria nos experimentos. Aos amigos de laboratório Gil, Emanuel, João, Juliano e Jerry pelas discussões e debates, tornando o mesmo um ambiente mais agradável. Aos meus colegas de turma de doutorado Eronildo, Fernando Lessa e Vilmara Paixão.

A todos os meus professores que contribuíram em minha formação desde os primeiros passos na graduação, em especial Prof.^o Dr. Gustavo Gusmão.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio para realização deste presente trabalho- Código de Financiamento 001.

Resumo

Nesta tese as técnicas de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman convencional e Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS) foram utilizadas para estudar nanocarreadores baseados em nanopartículas lipídicas e metálicas carregados com moléculas bioativas. A estabilidade temporal quanto ao estado de oxidação da nanoemulsão a base de óleo de peixe (FO), rico em Ácido Docosahexaenoico (DHA) e Ácido Eicosapentaenoico (EPA) foi avaliada ao longo do tempo de preparo, aos 0, 365 e 730 dias. Os dados de FTIR evidenciaram a presença de diversos marcadores químicos que mostraram uma contínua oxidação da nanoemulsão de FO com o decorrer do tempo de preparo. Os resultados demonstraram que devido às suas características insaturadas, os lipídios estão sujeitos a alterações moleculares, as quais se iniciam com a isomerização das ligações duplas *cis* para dupla *trans*. Essas alterações levam a processos de oxidação e clivagens com a geração de subprodutos. A interação entre diferentes concentrações do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ e nanopartículas lipídicas sólidas foi investigada. Os resultados mostraram formação de uma ligação quelante bidentada entre o grupo carboxilato do oleato de sódio, presente na nanopartícula lipídica, e o íon de Fe^{2+} do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$. Por fim, foi demonstrado o sucesso da funcionalização do anticorpo anti-SARS-CoV-2 na superfície de nanopartículas de Au, pré-revestidas com 3,3'-ditiobis (*Propionato de Sulfossuccinimidil-DTSSP*). Os dados mostraram que os grupos amins primárias do anticorpo estão ligadas covalentemente ao grupo éster succinimidil terminal, formando uma ligação amida secundária pelo ataque nucleofílico da amina ao carbono da carbonila do éster presente na superfície da nanopartícula de Au.

Palavras-chave: FTIR; Raman; sistema de entrega de drogas; lipídio nanoestruturado; nanoemulsão de óleo de peixe; *tris*-(1,10-fenantrolina) ferro (II); SARS-CoV-2.

Abstract

In this thesis, Fourier Transform Infrared (FTIR), conventional Raman spectroscopy and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) techniques were used to study nanocarriers based on lipidic and metallic nanoparticles loaded with bioactive molecules. The temporal stability regarding the oxidation state of the nanoemulsion based on fish oil (FO), rich in Docosahexaenoic Acid (DHA) and Eicosapentaenoic Acid (EPA) was evaluated over time after preparation, at 0, 365 and 730 days. The FTIR data evidenced the presence of several chemical markers that showed a continuous oxidation of the FO nanoemulsion with the course of the preparation time. The results showed that due to their unsaturated characteristics, lipids are subject to molecular changes, which begin with the isomerization of double bonds cis to trans. These changes lead to oxidation processes and cleavages with the generation of by-products. The interaction between different of $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ complex contents and solid lipid nanoparticles was investigated. The results showed the formation of a bidentate chelating bond between the carboxylate group from sodium oleate, present on lipid nanoparticle, and the Fe^{2+} ion of the $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ complex. Finally, the successful functionalization of the anti-SARS-CoV-2 antibody onto Au nanoparticles surface, precoated with 3,3'-dithiobis (Sulphosuccinimidyl Propionate-DTSSP) was demonstrated. The data showed that the primary amine groups of the antibody are covalently bound to the terminal succinimidyl ester group, forming a secondary amide bond by the nucleophilic attack of the amine to the ester carbonyl carbon present on the Au nanoparticle surface.

Keywords: FTIR; Raman; drug delivery system; nanostructured lipid; fish oil nanoemulsion; *tris*-(1,10-phenanthroline) iron (II); SARS-CoV-2.

Lista de Símbolo e Abreviaturas

NLS -Sistema Lipídico Nanoestruturado (do inglês <i>Nanostructured Lipid System</i>)	NE -Nanoemulsão
PDT -Terapia Fotodinâmica (do inglês <i>Photodynamic Therapy</i>)	LSPR - Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (do inglês <i>Localized Surface Plasmonic Resonance</i>)
NP -Nanopartícula	ATR-FTIR - Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês <i>Attenuate Total Reflectance-Fourier-Transform InfraRed</i>)
AuNP - Nanopartículas de Ouro (do inglês <i>Gold Nanoparticle</i>)	PUFAs -Ácidos Graxos Poli-Insaturados (do inglês <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>)
	GPL - Glicerofosfolipídios (do inglês <i>glycerophospholipids</i>)
SERS - Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (do inglês <i>Surface-Enhanced Raman Scattering</i>)	DHA - Ácido docosaheptaenoico (do inglês <i>Docosahexaenoic Acid</i>)
EPA - Ácido eicosapentaenoico (do inglês <i>Eicosapentaenoic Acid</i>)	NEW3 -Nanoemulsão de Óleo de Peixe
BBS -Óleo de babaçu	FO - Óleo de Peixe (do inglês <i>Fish Oil</i>)
ν_s -estiramento simétrico	ν_{as} -estiramento assimétrico
δ -Modo de vibração deformação	BSA - Albumina de Soro Bovina (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
	DTSSP - Propionato de Sulfossuccinimidil
CCD - Charge-Coupled Device	DTSSP@AuNP - Nanopartícula de Ouro recoberta com Crosslinker
Fen - Fenantrolina	PBS - Tampão Fosfato-Salino
SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (do inglês <i>Severe acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>)	pAbS1N36@AuNPs -Nanopartícula de ouro recoberta com crosslinker e anticorpo
pAbS1N - Anticorpo	

Lista de figuras

Figura 2.1: Estrutura molecular do glicerol (a) e triglicerídeo (b).....	22
Figura 2.2: Diferente arranjos de TAG.	22
Figura 2.3: Estrutura molecular do esfingolipídico típico de uma ceramida (figura adaptada da referência [31]).	23
Figura 2.4: Estrutura molecular do colesterol.	24
Figura 2.5: Estrutura molecular da fosfatidilcolina (figura adaptada da referência [33]).	25
Figura 2.6: Representação esquemática dos tipos de nanoemulsões e suas conformações espaciais. Óleo em água (O/A) (a), água em óleo (A/O) (b), água em óleo em água (c) (A/O/A) e óleo em água em óleo (O/A/O) (d) (figura adaptada da referência [9]).....	29
Figura 3. 1.1: Espectro FTIR da amostra NEW3 e seus constituintes: (i) FO, (ii) NEW3-0, (iii) NEW3-365, (iv) NEW3-730 e (v) solutol HS.	35
Figura 3.1.2: Espectro de absorção FTIR das amostras NEW3 na região de 2600 -3700 cm^{-1} em diferentes tempos de produção. (b) Gráfico de barra da razão entre as intensidades integradas da banda $\nu(OH)$ com relação às bandas $\nu_s(CH_2)$ – $(I_{\nu OH}/I_{\nu s CH_2})$ e $\nu_{as}(CH_2)$ $(I_{\nu(OH)}/I_{\nu as}(CH_2))$	
Figura 3. 1. 3: Espectro de absorção FTIR das amostras NEW3 com diferentes tempos de produção. Fittings dos espectros de absorção FTIR das amostras NEW3 das regiões de 1300-1500 cm^{-1} (a) e 1500-1800 cm^{-1} (b). Gráfico de barra da razão entre as áreas integradas $I_{\nu s}(COO-)/I_{\delta}(CH_2/CH_3)$, $I_{\nu as}(COO-)/I_{\delta}(CH_2/CH_3)$ e $I_{\nu}(C=O)/I_{\delta}(CH_2/CH_3)$ (c).	39
Figura 3. 1. 4: Espectro de absorção FTIR das amostras NEW3 com diferentes tempos de produção. Ampliações das regiões de 600-1010 cm^{-1} associados aos modos cis e trans (não conjugado e conjugado) (a) e 2950-3050 cm^{-1} ao modo cis (b). Gráfico de barra da	

razão entre as áreas integradas $I(=CH)_{cis}/I\delta(CH_2/CH_3)$ (c) e $I(=CH)_{trans}/I\delta(CH_2/CH_3)$ (d).	40
Figura 3.2.1: Estrutura molecular da 1,10-fenantrolina.	46
Figura 3.2.2: Estrutura molecular da tris-(1,10—fenantrolina).	47
Figura 3.2.3: (a) Espectros FTIR das amostras de tensor ativo (i), NLS (ii), NLS@[Fe(phen) ₃] ²⁺ nas concentrações de 0,75 (iii), 1,5 (iv) e 3,0 (v) mg/mL de complexo de [Fe(phen) ₃] ²⁺ . (b) Amostras constituintes da NLS@[Fe(phen) ₃] ²⁺ com as atribuições vibracionais observadas em (a) e destacadas com as linhas pontilhadas, associadas as amostras de [Fe(phen) ₃] ²⁺ (i), fosfatidilcolina (ii), eumulgin (iii), colesterol (iv) e oleato de sódio (v).	52
Figura 3.2.4: Ampliações de regiões dos espectros FTIR das amostras NLS (i), NLS@[Fe(phen) ₃] ²⁺ nas concentrações de 0,75 (ii), 1,5 (iii) e 3,0 (iv) mg/mL de complexo de [Fe(phen) ₃] ²⁺ . Para a região do colesterol, eumulgin e fosfatidilcolina são apresentadas ampliações das regiões de 790-860 cm ⁻¹ (a) 1075-1130 cm ⁻¹ (b) e 1710-1750 cm ⁻¹ (c), em que não é observado mudanças no número de onda, associado ao modo vibracional da região. Na região característica do oleato de sódio, são apresentadas ampliações da regiões de 690-710 cm ⁻¹ (d), 1443-1450 cm ⁻¹ (e), 1455-1475 cm ⁻¹ (f) e 1550-1570 cm ⁻¹ (g), associado as mudanças na posição do pico referente ao modo vibracional.	53
Figura 3.2.5: (a) Espectros Raman convencional das amostras de NLS (i), NLS@[Fe(phen) ₃] ²⁺ nas concentrações de 0,75 (ii), 1,5 (iii) e 3,0 (iv) mg/mL de complexo de [Fe(phen) ₃] ²⁺ . (b) Amostras constituintes da NLS@[Fe(phen) ₃] ²⁺ com as atribuições vibracionais observadas em (a) e destacadas com as linhas pontilhadas, associadas as amostras de [Fe(phen) ₃] ²⁺ (i), fosfatidilcolina (ii), eumulgin (iii), colesterol (iv) e oleato de sódio (v).	57

Figura 3.2.6: Ampliações de regiões dos espectros Raman convencional das amostras NLS (i), complexo-[Fe(phen)₃]²⁺ (ii), NLS@[Fe(phen)₃]²⁺ nas concentrações de 0,75 (iii), 1,5 (iv) e 3,0 (v) mg/mL de complexo de [Fe(phen)₃]²⁺. Para as regiões de 540-615 cm⁻¹ (a) 720-890 cm⁻¹ (b), 1420-1480 cm⁻¹ (c), 1500-1600 cm⁻¹ (d) e 1610-1690 cm⁻¹ (e) são apresentadas as principais mudanças vibracionais associadas as amostras NLS e o complexo-[Fe(phen)₃]²⁺. 59

Figura 3.3.1: Funcionalização das AuNPs com DTSSP seguida da formação da ligação cruzada do anticorpo..... 66

Figura 3.3.2: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de Au (AuNPs) (a) e das AuNPs conjugadas com anti-SARS-CoV-2 spike (pAbS1N36@AuNPs) (b) (figura adaptada da referência [88])...... 67

Figura 3.3.3: Espectro FTIR para amostras de pAbS1N (a), pAbS1N36@AuNPs (b) e AuNPs (c). 70

Figura 3.3.4: Espectro SERS (i) e espectro Raman convencional (ii) para DTSSP@AuNPs e DTSSP em pó, respectivamente. 72

Figura 3.3.5: (a) Espectros SERS de AbS1N36@AuNPs (i), pAbS1N (ii) e BSA (iii). (b) Zoom de espectros SERS na faixa 1530-1680 cm⁻¹ para pAbS1N36@AuNPs (linha preta), pAbS1N (linha verde) e BSA (linha vermelha). 75

Lista de Tabelas

Tabela 3. 1: Atribuições dos modos vibracionais de FTIR das amostras HS, FO e NEW3 [8], [59]–[62].	37
Tabela 3. 2: Atribuições dos modos vibracionais dos picos e suas moléculas associadas, das medidas FTIR das amostras Oleato de sódio, NLS e NLS@[Fe(Phen) ₃] ²⁺ e Raman das amostras [Fe(Phen) ₃] ²⁺ , NLS e NLS+[Fe(Phen) ₃] ²⁺	54
Tabela 3. 3: Bandas SERS observadas nos espectros registrados das amostras DTSSP, DTSSP@AuNPs, BSA, pAbS1N e pAbS1N@AuNPs e as tentativas de atribuições. ...	73

Capítulo 1

Introdução geral

A nanotecnologia é definida como a capacidade de projetar, produzir, caracterizar e aplicar estruturas, equipamentos e sistemas por meio do controle da forma e do tamanho em escala nanométrica. Ela apresenta grande potencial em vários setores produtivos, indo desde a indústria pesada até a alimentícia, incluído a biomedicina [1], [2].

A pesquisa e o desenvolvimento de sistemas nanométrico vêm crescendo nos últimos anos, promovendo grandes benefícios para a sociedade. No setor agrícola, por exemplo, a nanotecnologia tem proporcionado uma melhora tanto na produção de alimentos quanto no seu teor de nutrientes [3]. Também tem contribuído para o prolongamento do tempo de armazenamento, na detecção e combate de patógenos e toxinas [4]. Devido a maior proporção superfície/volume os sistemas nanoestruturados exibem uma maior atividade catalítica, elevada capacidade de adsorção e reatividade enzimática. A modificação da superfície das nanopartículas (NPs) possibilita a solubilidade e o transporte de drogas e moléculas bioativas a alvos previamente selecionados. Além do mais, a baixa dimensão destes sistemas leva a efeitos quânticos que por sua vez afetam as propriedades físicas dos materiais, como por exemplo, as elétricas, ópticas e magnéticas [1], [5].

Na biomedicina, os sistemas nanoestruturados como as nanopartículas metálicas, magnéticas, poliméricas, lipídicas sólidas e nanoemulsões funcionalizadas com diferentes moléculas e biomoléculas tem sido empregada nas mais diversas aplicações [6], [7]. As nanoemulsões (NEs) por exemplo, possuem um grande potencial como dispersões de gotículas deformáveis que podem conter propriedades de fluxo, variando do líquido ao sólido, e que também apresentam propriedades ópticas que variam do opaco ao

translúcido [8], [9]. Por sua vez, os sistemas lipídicos sólidos nanoestruturados, por serem solúveis em água, tem sido empregados no transporte de substâncias bioativas a alvos específicos [2]. Já as NPs metálicas têm sido amplamente utilizadas como etiquetas de detecção por causa de suas excelentes propriedades ópticas [10]. Outra promissora abordagem para o desenvolvimento de biomarcadores é a associação de NPs metálicas funcionalizada com anticorpo, podendo ser usado como sonda de marcação e captura.

As aplicações das NEs têm sido relatadas em diversos campos, desde a indústria de alimentos e cosméticos até o farmacêutico. Existe também um interesse crescente na engenharia de NEs para aplicações na indústria de petróleo e gás. Isso ocorre porque as propriedades comuns das NEs incluem, alta área de superfície em volume, relativamente insensível à gravidade, melhor eficiência de varredura, baixa tensão interfacial e outras condições ambientais, bem como alta incorporação e solubilização de óleo [11]. Além destas diversas aplicações citadas, as NEs atualmente estão sendo bastante utilizadas para administração oral de fármacos e suplementos alimentares bem como na aplicação em Terapia Fotodinâmica (do inglês *Photodynamic Therapy*-PDT). Na PDT as NEs podem ser usadas para encapsular os agentes fotossensibilizantes (PS), promovendo assim sua solubilidade e conseqüentemente sua eficiência, já que melhora sua penetração no tecido alvo, minimiza os efeitos colaterais fototóxicos, aumenta a biodisponibilidade e a estabilidade [12].

Além das NEs, os sistemas lipídicos nanoestruturados (do inglês *Nanostructured Lipid System - NLS*), tem sido intensivamente investigados pois apresentam grande potencial de aplicações em diversas áreas. Os NLS é um sistema de transporte de moléculas bioativas de segunda geração com matriz sólida à temperatura ambiente. Este sistema carreador é constituído por materiais lipídicos e surfactantes fisiológicos, biodegradáveis e biocompatíveis e é aceito pelas autoridades reguladoras para aplicação

em diferentes sistemas de liberação de fármacos. Os NLS exibem vantagens superiores sobre outros transportadores coloidais, como nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, lipossomas, SLN etc. e, portanto, têm sido explorados em maior extensão na tecnologia farmacêutica. Entre as vantagens dos NLS estão sua maior capacidade de carregamento de drogas, prevenção à expulsão de drogas, maior flexibilidade para a modulação da liberação do fármaco e versatilidade por várias vias de administração. Além de possuir outras vantagens como: alta carga útil de drogas, sem biotoxicidade do transportador, evita solventes orgânicos, não apresenta problemas em relação à produção em larga escala e esterilização e aumenta a estabilidade do medicamento [13].

Um outro sistema nanoestruturado que têm atraído interesse significativo como uma nova plataforma para nanobiotecnologia e biomedicina [14], devido à conveniente bioconjugação de superfície com sondas moleculares e notáveis propriedades ópticas são sistemas relacionados com a Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (do inglês *Localized Surface Plasmonic Resonance-LSPR*). A LSPR é um fenômeno de ressonância envolvendo oscilações coletivas de carga superficial de elétrons livres em um metal [15]. As propriedades extraordinárias do LSPR, como fortes campos elétricos locais, variações espaciais drásticas em uma única partícula ou alta sensibilidade a mudanças ambientais em escala nanométrica, oferecem uma maneira atraente de realizar a manipulação de radiação eletromagnética na faixa do infravermelho ao ultravioleta, dependendo apenas da composição das NPs (Au, Ag e liga) e de seu tamanho. Os LSPR possibilita a construção de biosensores altamente sensível e livre de rótulos para sondar a afinidade entre moléculas biológicas e tem sido amplamente utilizado em biologia, bioquímica e engenharia genética.

Dentre todas as NPs plasmônicas citadas anteriormente, as AuNP (do inglês *Gold Nanoparticle-AuNP*) têm sido amplamente empregado na genômica [16], biosensores

[17], imunoenaios [18], detecção e controle de microorganismos [19], entrega direcionada de drogas ou outras substâncias [20], entre outras.

As técnicas de espectroscopia vibracional, como espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier-Transform InfraRed-FTIR*), Espectroscopia Raman convencional e Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (do inglês *Surface-Enhanced Raman Scattering-SERS*) usadas nesta tese, são fortemente dependentes das estruturas químicas e físicas dos sistemas nanoestruturados, bem como de suas interações com o meio vizinho. Em razão disso, estas técnicas tornaram-se ferramentas essenciais para a análises químicas e estruturais de materiais nanoestruturados e de ensaios biológicos. As informações sobre o arranjo molecular são obtidas pela interpretação dos espectros vibracionais, permitido assim, correlacionar as alterações químicas e conformacionais decorrentes das interações moleculares por meio do deslocamento de suas energias vibracionais, do alargamento da banda associada ao modo vibracional, bem como da intensificação ou do surgimento de novos modos, quando comparados às moléculas livres [7]. Portanto, as alterações espectrais podem ser usadas para estudar os efeitos diretos ou indiretos das interações inter e intramolecular de grupos químicos das moléculas de interesse em virtude de suas interações.

Assim, o objetivo deste trabalho é investigar as interações entre moléculas bioativas e sistemas nanoestruturados, como nanoemulsões a base de óleo de peixe, nanopartícula lipídica sólida carregadas com complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ e nanopartículas de ouro bioconjugadas com anticorpo anti-SARS-CoV-2. Para isso, às técnicas de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman convencional e Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS) forma empregadas.

Esta tese está organizada em quatro capítulos. Com o objetivo de fundamentar as ideias do Capítulos 3, o Capítulo 1 aborda uma introdução geral, Capítulo 2 relata, de forma breve, os sistemas lipídicos nanoestruturados (na forma de nanoemulsões e nanopartículas lipídicas sólidas). No Capítulo 3 são apresentados os resultados referentes ao estudo do estado de oxidação de Nanoemulsões de óleo de peixe, ricos em ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA) (Seção 3.1). Em seguida são abordados o estudo da interação entre o complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ e sua matriz hospedeira (nanopartículas lipídicas sólidas) (Seção 3.2) e por fim, a funcionalização do anticorpo anti-SARS-CoV-2 sobre nanopartículas de Au. No Capítulo 4 é feita uma conclusão geral do trabalho.

Capítulo 2

Nanopartículas Lipídicas

2.1 Lipídios e triglicerídeos

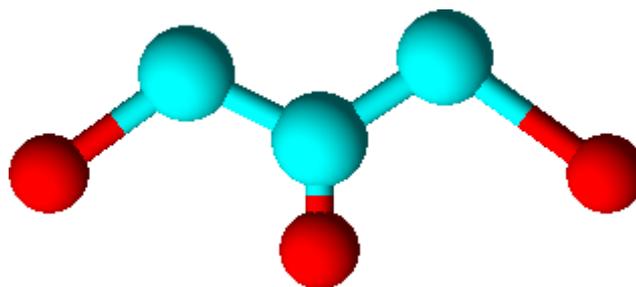
Os lipídios estão entre os grupos de biomoléculas mais abundantes em nosso organismo, eles constituem um grupo heterogêneo de moléculas orgânicas, com característica de ser insolúvel em água, ou seja, hidrofóbica [21]. Estando em meio aquoso, essa classe de molécula tende a apresentar agregação com estruturas diversas, formando tipicamente lamelas, vesículas e micelas. Apresentando dimensões microscópicas ou nanoscópicas. Uma das principais funções biológicas dos lipídios são o isolamento térmico e reserva de energia, que podem exercer funções regulatórias, além de serem componentes de membrana celulares. Alguns dos exemplos mais comuns de lipídios são os triacilgliceróis, compostos esteroidais, ácidos graxos (AG), esfingolipídios e glicerofosfolipídios (do inglês *glycerophospholipids*-GPL) [8], [22].

Os ácidos carboxílicos são ácidos graxos com cadeias abertas de hidrocarbonetos com comprimento variando de 4 a 36 átomos de carbono, onde o grupo carboxila é encontrado em uma das extremidades da cadeia. Os AG podem ser divididos em duas grandes famílias, chamadas de AG saturados, quando não têm ligações duplas, ou AG insaturados quando têm de 1 a 6 ligações duplas. Os AG insaturados podem ser ainda denominados como monoinsaturados quando têm uma ligação dupla ou poli-insaturados—PUFAs (do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*-PUFAs) quando têm mais de uma ligação dupla. O seu ponto de fusão fica mais alto à medida que o comprimento da cadeia aumenta. Os AG de cadeia curta são geralmente líquidos a temperatura ambiente, enquanto os com 10 ou mais átomos de carbono são geralmente sólidos à temperatura ambiente [23].

Estes ácidos graxos insaturados podem ser apresentados tanto na configuração de isomeria *cis* quanto na *trans*. Simplificadamente, o isômero *cis* possui em cada átomo de carbono da ligação dupla um ligante igual que está no mesmo lado do plano espacial. Já no isômero *trans* apresentam forma similar ao isômero *cis*, mas em lados opostos do plano espacial. No caso dos ácidos graxos, esse ligante é o hidrogênio. Na maior parte dos ácidos graxos naturais as ligações duplas estão na isomerização *cis*, pois a *trans* ocorre em processos de hidrogenação, enzimáticos ou oxidativos [24], [25]. Usualmente, a nomenclatura dos ácidos graxos representa o número de carbonos da cadeia e o número de ligações duplas, separada por dois pontos [26]. Por exemplo, a representação para o ácido oleico é 18:1 *cis*-9, ou seja, 18 carbonos com uma ligação dupla na posição 9, com hidrogênios na configuração *cis*.

No corpo humano os ácidos graxos livres são difíceis de serem encontrados, pois eles costumam estar ligados a um glicerol (Fig. 2.1 (a)), constituindo assim, os triacilgliceróis (TAG) ou esfingosina, formando os esfingolipídios[22]. Os TAG, são constituídos por três moléculas de ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol (Fig. 2.1 (b)). Essa ligação ocorre entre os terminais polares das moléculas hidroxila do glicerol e carboxila dos ácidos graxos, tornando assim a molécula de TAG essencialmente apolar, hidrofóbica e insolúvel em meio aquoso. A maioria dos TAGs encontrados na natureza contém as cadeias de ácidos graxos diferentes entre si [27].

(a)



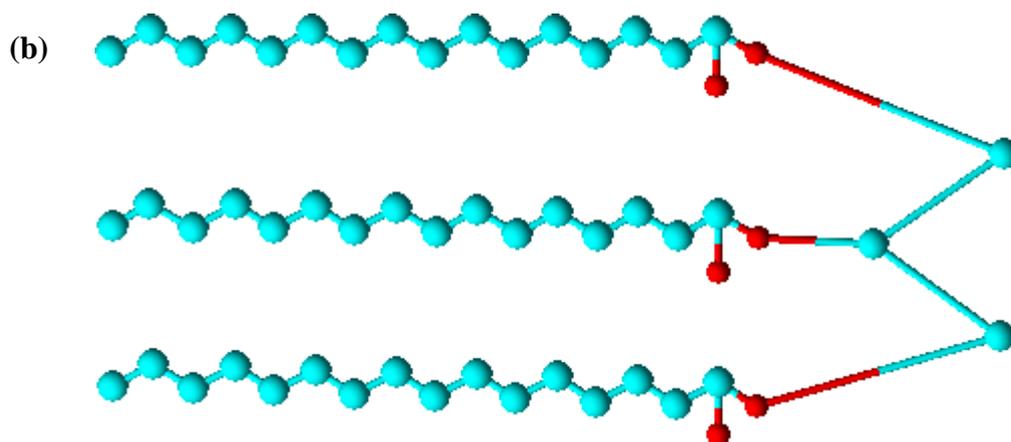


Figura 2.1: Estrutura molecular do glicerol (a) e triglicerídeo (b).

A disposição química de uma molécula TAG em fase sólida possui frequentemente uma geometria análoga a um diapasão ou a letra *h* do alfabeto (Fig. 2.2), com duas cadeias retas ligadas nas posições *sn-1* e *sn-2* (sentido oposto) e uma cadeia dobrada ligada na posição *sn-3*, estando paralela a direção *sn-1*, que possui ligação *gauche* nas proximidades do grupo éster ligado ao glicerol [28], [29].

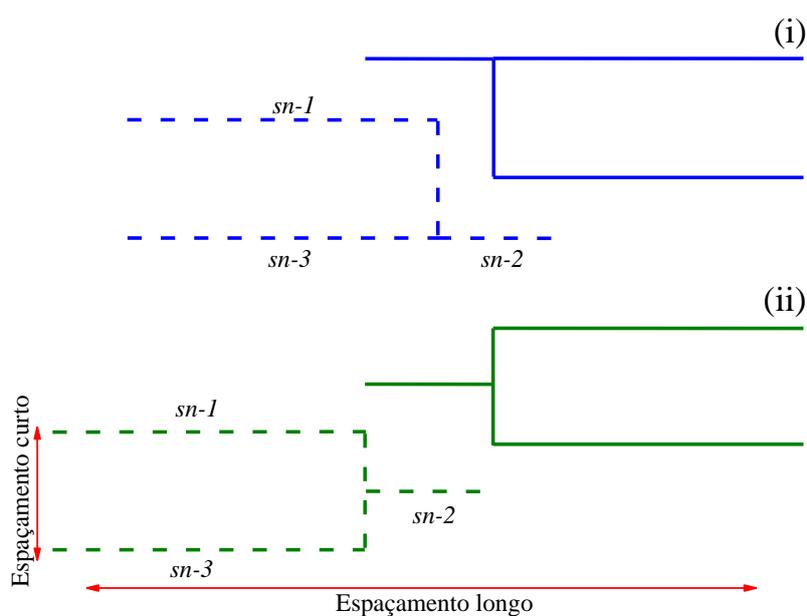


Figura 2.2: Diferente arranjos de TAG.

Os esfingolípídios são uma das três principais classes lipídicas em todas as células eucarióticas, onde elas funcionam como moléculas estruturais de membranas, assim como, podem atuar como moléculas de sinalização altamente ativas [30]. Nos neurônios por exemplo, a sua cobertura é geralmente feita por ceramidas e bainhas de mielina (esfingomielina). Na Fig. 2.3 abaixo é mostrada a estrutura molecular da esfingolípídio, sendo sua estrutura composta por um ácido graxo insaturado.

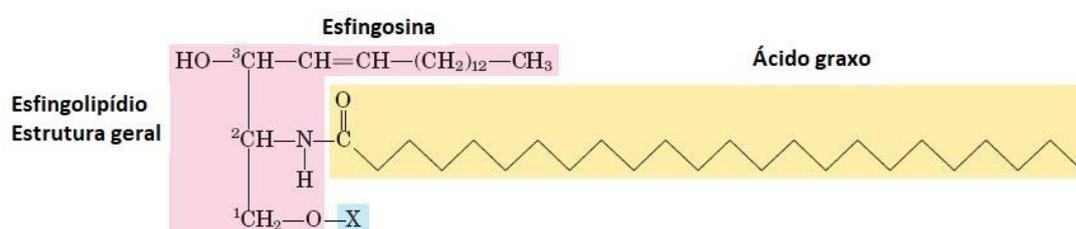


Figura 2.3: Estrutura molecular do esfingolípídico típico de uma ceramida (figura adaptada da referência [31]).

Os esteroides são compostos lipossolúveis, que não possuem AG em sua estrutura. Sendo originado do ciclopentanoperidrofenantreno, composto que possui uma estrutura com quatro anéis não-planares fundidos entre si, denominado núcleo esteroide. Três desses anéis apresentam seis átomos de carbono e o quarto anel tem cinco carbonos. Para a formação de esteroides, uma substância fundamental é o colesterol, que possui um grupo hidroxila ligado em uma extremidade do núcleo esteroide e uma cadeia de hidrocarbonetos na outra extremidade, como mostrado na Fig. 2.4 [8], [22].

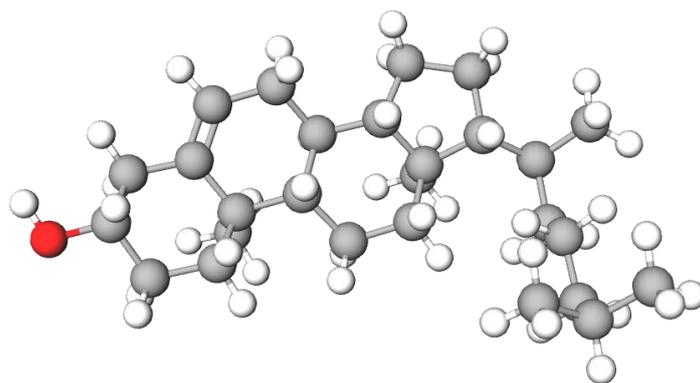


Figura 2.4: Estrutura molecular do colesterol.

Os glicerofosfolipídios (GPL), assim como os esfingolipídico apresentam uma infinidade de funções em sistemas vivos, tendo papel importante na composição das membranas biológicas, influenciando diretamente a estabilidade e a permeabilidade da membrana. Desempenhado um papel importante no transporte de íons, indução de sinais e tráfico de substâncias. Os GPL são substâncias anfifílica, com uma componente polar composto por um glicerol e uma porção de fosfato, que também pode ser ligar a outros grupos, como por exemplo, a colina. Na parte lipofílica a GPL contém resíduos de ácidos carboxílicos insaturados, que são substratos perfeitos para oxidação livre-radical devido à presença de ligação $C=C$ [32].

Nos GPLs, as cadeias *sn-1* e *sn-2* apontam para as mesmas direções e o grupo principal polar para direção oposta, como mostrado a Fig. 2.5. Devido estas características, a molécula dos glicofosfolipídios contém uma região polar (grupo fosfato e seus ligantes) e outra apolar (devido aos ácidos graxos ligantes por meio do glicerol). Assim, por conterem fosfato, os glicerofosfolipídios são denominados fosfolipídios [7].

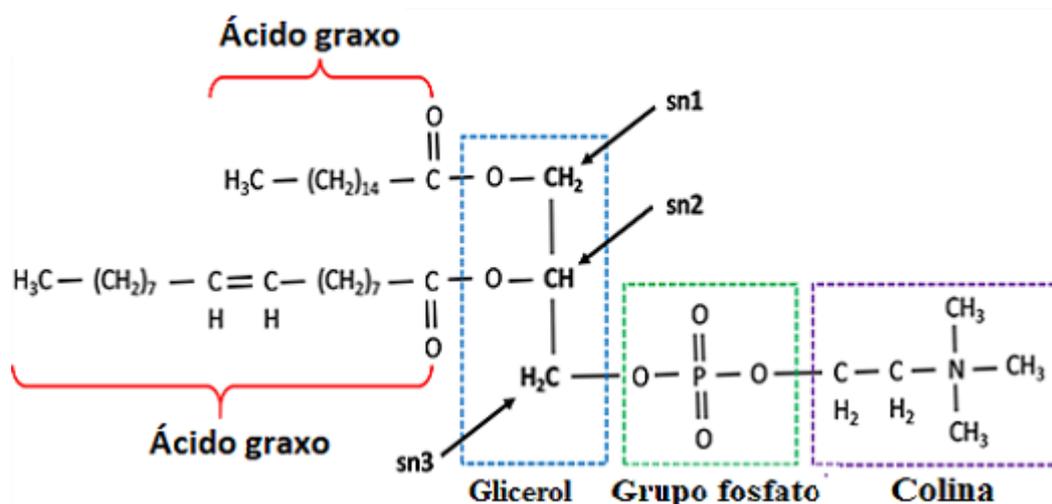


Figura 2.5: Estrutura molecular da fosfatidilcolina (figura adaptada da referência [33]).

O óleo de peixe – FO (do inglês *Fish Oil* - FO) é classificado com um gordura boa e seu consumo regular é altamente recomendado, pois ele atua na modulação da resposta anti-inflamatória, na prevenção de doenças cardiovasculares e nos distúrbios autoimunes. Encontrado em abundância nas carnes de peixes gordos, o óleo de peixe é uma fonte rica em ômega 3 e PUFAs, contendo 90% de TAGs [34]. Os ácidos graxos exercem importantes funções biológicas, com funções especiais no equilíbrio homeostático, e em componente estrutural das membranas celulares e do tecido cerebral, além de representar uma fonte de energia fundamental para o corpo humano. O ômega 3 por sua vez, age na formação de um componente dos neurônios, a bainha de mielina, e é responsável pela manutenção do sistema nervoso central. A principal substância na composição do ômega 3 é o ácido alfa linolênico que resulta na produção dos ácidos EPA (do inglês *Eicosapentaenoic Acid-EPA*) e DHA (do inglês *Docosahexaenoic Acid-DHA*) no organismo, que atuam em prol da diminuição de triglicérides – um tipo de gordura que, em níveis elevados, prejudica a saúde do corpo – e o aumento do colesterol bom (HDL). O principal pilar para uso do óleo de peixe fundamenta-se na questão de que os mamíferos

não são capazes de sintetizá-lo naturalmente no corpo, sendo necessário adquirir as substâncias DHA e EPA por meio de dietas usando óleo de peixe [35].

A composição de ácidos graxos dos óleos derivados de peixes e algas variam em torno de 30,9 a 64,4% de PUFAs, 5,1 a 12,7% de EPA e 10,5 a 52,4% de DHA. Onde a estabilidade relativa do DHA, muda após 48h. Assim, esses ácidos apresentam variações de acordo com sua composição de PUFAs, estados físicos e coloidais dos lipídios, assim como, o conteúdo de antioxidante [14].

Os óleos ricos em PUFAs com *n-3* de cadeia longa tem sido bastante utilizado por sua importância nutricional [14]. Porém, uma das grandes incógnitas é a sua instabilidade ao longo do tempo, devido a sua oxidação. Todos os lipídios contendo PUFAs oxidam facilmente ao longo do tempo, sejam eles em cápsulas ou grandes recipientes, levando a um sabor rançoso. Nos óleos ricos em DHA e EPA, a degradação está ligada ao odor ou sabor do peixe [15].

Por ser altamente hidrofóbicos os FOs são mal absorvidos oralmente devido à sua baixa solubilidade na água. A biodisponibilidade oral dos ácidos graxos DHA e EPA em fontes de FO está fortemente ligada à solubilização no trato gastrointestinal, e sua estrutura lipídica pode influenciar sua biodisponibilidade [24]. Uma das formas de driblar esta limitação é a ingestão dos FO na forma de nanoemulsões a base de óleo de peixe, justificando assim, o estudo da estabilidade destas nanoemulsões.

2.2 Sistemas Lipídicos Nanoestruturados

Nos últimos anos tem havido uma crescente demanda e interesse na indústria farmacêutica e de alimentos para incorporar, proteger e entregar compostos bioativos em sistemas lipídicos nanoestruturados. Embora alguns compostos bioativos possam ser

administrados diretamente no organismo, moléculas hidrofóbicas muitas vezes não são eficientemente conduzidas ao alvo desejado devido à sua hidrofobicidade. Resultando em baixas concentrações destes compostos no local desejado, o que leva a uma atividade biológica reduzida. Para superar esse problema, tem sido proposto o uso de sistemas de entrega coloidal, o qual tem-se mostrado ser um agente competente para superar as dificuldades inerentes às moléculas hidrofóbicas.

O pequeno tamanho das partículas nos sistemas coloidais ($D < 1000$ nm) tem levado a uma série de benefícios para diversas aplicações, tais como: capacidade de solubilizar ingredientes farmacêuticos ativos com características hidrofílicas ou lipofílicas, aumentar a biodisponibilidade e a estabilidade a longo prazo dos fármacos, possuir alta clareza óptica, ser formado a partir de ingredientes simples, entre outros [25], [26],[40]. Assim, os sistemas coloidais podem ser usados como substitutos para lipossomas e vesículas, contribuindo assim, para a melhora da estabilidade física e na solubilização de drogas lipofílica. Elas possuem também gotículas de maior área superficial, proporcionando maior absorção de suplementos solúveis em óleos, podendo ser formulado nas formas de espumas, cremes, sprays e líquidos [28].

Entre os vários tipos de sistemas de entregas coloidais de compostos bioativos os Sistema Lipídico Nanoestruturado (do inglês *Nanostructured Lipid System* – NLS) tem se destacado. Para moléculas lipofílicas, vários tipos de sistemas de entrega baseados em lipídios como nanoemulsões lipídicas (do inglês *Nanostructured Lipid Carriers* - NLC), nanopartículas de lipídios sólidos (do inglês *Solid Lipid Nanoparticles* -SLN), lipossomas e emulsões têm recebido atenção considerável [41].

Emulsões são sistemas coloidais metaestáveis constituído por gotículas de um líquido, de um determinado tamanho, disperso dentro de outro líquido imiscível. São produzidas a partir do cisalhamento mecânico para formar uma única fase. Para a

formação de uma emulsão não basta a presença de somente dois líquidos imiscíveis puros. Para que uma suspensão de um líquido em outro seja estável, um terceiro componente deve estar presente. O terceiro componente é chamado de agente emulsificante ou surfactante, que geralmente é um agente tensoativo [7], [32]. O surfactante tem como objetivo reduzir a tensão interfacial existentes entre as moléculas das duas fases. Os surfactantes são de natureza anfifílica com uma cabeça polar e uma cauda apolar que se orientam na interface das fases duas fases líquidas, geralmente óleo e água [27], [28].

Atualmente, existe uma confusão considerável na literatura científica sobre o uso dos termos “microemulsões” e “nanoemulsões”. No entanto, estes são tipos distintos de dispersões coloidais: uma microemulsão é termodinamicamente estável, enquanto uma nanoemulsão não é [44]. Portanto, é importante distinguir entre elas, pois isso afeta os métodos usados para fabricá-las, as estratégias usadas para estabilizá-las e as abordagens usadas para projetar seus atributos funcionais. Em geral, existem três tipos principais de sistemas de emulsão: (1) macroemulsões, emulsões opacas de partículas com diâmetros > 400 nm; (2) microemulsões, dispersões transparentes de partículas com diâmetros < 100 nm de tamanho; e (3) nanoemulsões, um tipo azul-esbranquiçado, com diâmetros de partículas entre os dois primeiros tipos (100–400 nm) [44], [45]. Em contraste com as microemulsões, onde o emulsificante é geralmente de 15 – 30% da fase óleo, nas nanoemulsões o emulsificante é geralmente da ordem de 1-3% da fase óleo. As nanoemulsões são geralmente usadas na preparação de cosméticos e em sistemas de liberação de fármacos farmacêuticos.

A estrutura da nanoemulsão pode ser produzida sob condições especiais para suprir as necessidades da aplicação desejada [28]. Diante disto, existem quatro tipos de nanoemulsão (Fig. 2.6) que são: óleo em água (O/A), água em óleo (A/O), água, óleo e água (A/O/A) e óleo, água em óleo (O/A/O), respectivamente. Portanto, as três

componentes principais que tornam uma nanoemulsão estável são: fase aquosa, oleosa e surfactante [33], como ilustrado na ampliação (Fig. 2.6 (a-d)).

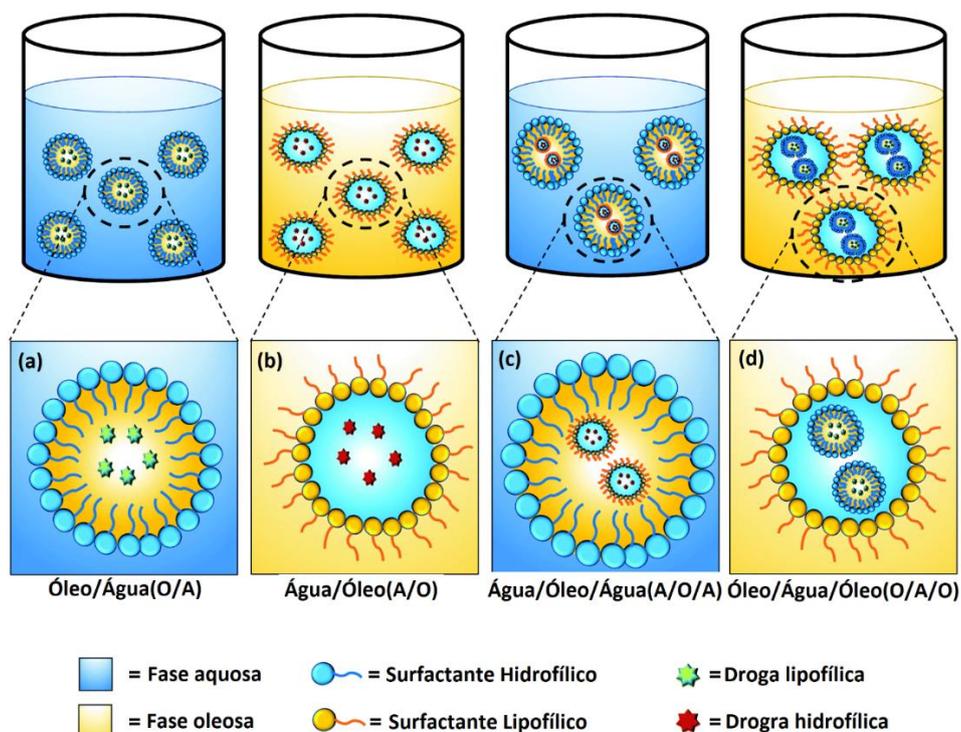


Figura 2.6: Representação esquemática dos tipos de nanoemulsões e suas conformações espaciais. Óleo em água (O/A) (a), água em óleo (A/O) (b), água em óleo em água (A/O/A) (c) e óleo em água em óleo (O/A/O) (d) (figura adaptada da referência [9]).

Na formulação das nanoemulsões a fase oleosa pode incluir triglicerídeos, *tri-*, *di-*, ou monoacilgliceróis, ácidos graxos, óleos minerais e vegetais [34]. A seleção dos óleos geralmente é baseada na solubilidade do fármaco. As fases oleosas que suporta alta carga de droga são geralmente usadas para desenvolvimento de nanoemulsões. Vários surfactantes com diversas características (iônicas ou não iônicas) têm sido utilizados para a fabricação das nanoemulsões. Os mais amplamente utilizados para a entrega de drogas são, geralmente ingredientes alimentares como: *span* (ésteres de ácidos graxos de sorbitanos), polissacarídeos (derivados de goma e amido), proteína anfifílicas (isolado e

caseinato de proteína de soro e leite), fosfolipídios (soja, ovo ou lecitina láctea), tweens (polioxietileno (POE) derivados de éster de ácido graxo de sorbitano), Cremophor[®] EL (óleo de rícino polioxil-35) e macrogolglicerídeos de lauroil (Gelucire[®] 44/14) [27].

Nanopartículas lipídicas sólidas–SLN representam um sistema de transporte alternativo para os transportadores coloidais tradicionais, como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas [48]. As SLNs são produzidas usando lipídios que são sólidos à temperatura ambiente e corporal. Na preparação das SLNs, o componente do núcleo lipídico é aquecido acima de seu ponto de fusão, homogeneizado com o composto ativo desejado, e em seguida, submetido a tecnologia de microemulsão, ou seja, misturado a uma solução aquosa e submetido ao cisalhamento mecânico para formar uma única fase. A principal dificuldade associada à produção de SLNs é controlar o polimorfismo lipídico. Os triglicerídeos, por exemplo, podem estar presentes em três estruturas cristalinas diferentes α , β' e β , o que produz nanopartículas com diferentes formatos [49]. Outras desvantagens são: alta compactação da matriz lipídica cristalizada, pois oferece pouco espaço para encapsulamento do fármaco, levando a uma baixa capacidade de carregamento do fármaco, expulsão do fármaco após a cristalização durante o armazenamento [50].

Os surfactantes utilizados para a estabilização de SLNs também podem modificar o comportamento da fase lipídica e influenciar a taxa e a temperatura da cristalização lipídica e transições polimórficas. Por exemplo, se o emulsificante cristalizar mais cedo que o lipídio do núcleo das partículas, esse emulsificante pode agir como impureza catalítica e acelerar a nucleação superficial da fase do óleo. Além do mais, as moléculas emulsificantes na interface muitas vezes aumentam a ordenação das moléculas de óleo a um nível suficiente para formar núcleos de tamanho crítico para iniciar a cristalização [51].

As SLN combinam as vantagens dos sistemas tradicionais, mas evita algumas de suas principais desvantagens como a baixa estabilidade física e a impossibilidade de secar o sistema nanoparticulado. Uma das principais vantagens dos SLNs está relacionada a imobilização dos compostos ativos pela estrutura sólida da partícula, levando a uma maior proteção química, menor vazamento e liberação sustentada. Esta propriedade física permite um melhor controle da estabilidade física (contra a recristalização) e química (contra a degradação) dos nutrientes fornecidos. Portanto, as NLSs podem ser uma estratégia promissora para a proteção de compostos ativos lipofílicos a serem incorporados em alimentos [52].

Capítulo 3

Resultados e discussões

3.1 – Investigação dos processos oxidativos das moléculas formadoras da nanoemulsão (O/A) de óleo de peixe e solutol.

3.1.1 Introdução

Óleos ricos em ômega 3, ricos em DHA e EPA, como os óleos de peixe e de algas marinhas, atuam na modulação das reações inflamatórias, pois produzem mediadores biológico de baixo potencial inflamatório [16]. Além disso, o EPA é um nutriente que ajuda a manter os triglicerídeos em níveis saudáveis. Este efeito favorece a saúde cardiovascular e previne problemas circulatórios. Por outro lado, o DHA é um ótimo alimento para o cérebro, visto que 20 % dos lipídios presentes no cérebro são DHA.

Contudo, os mamíferos não são capazes de sintetizar naturalmente esses ácidos graxos, tornando necessário obtê-los a partir da dieta alimentar. Os níveis recomendados de DHA e EPA podem ser obtidos por meio da ingestão de peixes ou de suplementos [54]. Todavia, por serem hidrofóbicos, os ácidos graxos DHA e EPA são poucos absorvidos por via oral, pois apresentam baixa solubilidade no trato gastrointestinal. Outro ponto importante a ser considerado é que por possuírem várias insaturações em sua cadeia lipídica, os ácidos graxos DHA e EPA, são muito suscetíveis a processos oxidativos, os quais comprometem a integridade das duplas ligações e a funcionalidade desses ácidos, além de colocarem em risco a saúde humana [55].

Para contornar essas limitações, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido pesquisas para a produção e aplicação de nanoemulsões a base dos ácidos graxos contendo DHA e EPA, com o objetivo de aumentar a absorção desses ácidos graxos pelo trato gastrointestinal e protegê-lo de processos oxidativos inerentes ao seu envelhecimento

durante a armazenagem. Neste contexto este trabalho tem como objetivo analisar os processos oxidativos de nanoemulsões a base de FO por meio de técnicas de espectroscopia vibracional.

3.1.2 Metodologia

Amostras

A preparação da nanoemulsão de óleo de peixe rico em ômega 3 (NEW3) foi realizada utilizando o método da temperatura de inversão de fase, segundo Solans e Solé, com adaptações [56]. Para a preparação foi utilizado cápsulas de óleo de peixe (ômega-3: Nu3 Health DHA-500) contendo uma mistura de 0,5 g e 0,1 g de DHA e EPA, respectivamente, obtido comercialmente da Natue Trade in Food Products Ltda). Para a formulação da amostra NEW3 foram consideradas os ácidos graxos DHA e EPA, nas concentrações de 6,25 mg/mL e 1,25 mg/mL de nanoemulsão, respectivamente. Ambos contidos em 12,25 mg/mL de FO. A fim de prevenir oxidação, os ácidos graxos DHA e EPA foram previamente solubilizados em óleo de babaçu (BBS) na concentração de 5,0 mg/mL de nanoemulsão. A água ultrapura Milli-Q foi utilizada como veículo na formulação e o Solutol[®] HS 15-polioxietileno ésteres do ácido 12-hidroxiesteárico (Sigma-Aldrich, EUA) foi usado como emulsificante.

A amostra NEW3 foi avaliada quanto a seu estado de oxidação em diferentes tempos (0, 365 e 730 dias). Neste período, as amostras foram armazenadas a 25°C em ambiente escuro. Os diâmetros hidrodinâmico médios $\langle D_{DLS} \rangle$ e polidispersão (PDI), determinados por espalhamento dinâmico de luz, foram, de $160,0 \pm 3,5$ nm ($0,234 \pm 0,013$) para o dia 01 e de $145,2 \pm 6,6$ nm ($0,210 \pm 0,034$) para o dia 365. Estes resultados indicam que a amostra NEW3 não apresentou sinais de instabilidade macroscópica [35].

O estado oxidativo da amostra NEW3 foi avaliada por FTIR nos tempos 0, 365 e 730 dias. A amostra NEW3 foi produzida no Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia-IB na Universidade de Brasília.

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR foram obtido em um espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier-FTIR da marca Bruker, modelo Vertex 70, na configuração de Refletância Total Atenuada (ATR). Foram executadas em média 96 scans, com resolução espectral de 4 cm^{-1} , na região de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , com background realizado antes de medir cada amostra. Sendo usado em cada medição $5\mu\text{L}$ de amostra. É importante mencionar que a precisão do número de onda do instrumento é melhor que $0,01\text{ cm}^{-1}$ até uma região de 2000 cm^{-1} na medição ATR-FTIR (Bruker Vertex 70). Portanto, deslocamentos do número de onda da ordem de 1 cm^{-1} são considerados significativos.

A análise de dados foi realizada usando o LabSpec[®] para correção da linha de base e normalização pela intensidade da banda. Para plotagem dos dados foi utilizado o OriginPro[®] 9 e o fitting das razões das bandas foram realizadas no Peakfit[®]. Todas as medidas experimentais foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica-LEO do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

É importante mencionar que os espectros Raman convencional da amostra NEW3, medidos nos tempos 0, 365 e 730 dias podem ser encontrados na referência [35].

3.1.3 Resultados e discussões

Para investigar a estabilidade química da nanoemulsão NEW3 em função do tempo de preparo, foram realizadas medidas de FTIR em $t = 0$, 365 e 730 dias. Os espectros de FTIR da amostra NEW3, com idades de 0 (ii), 365 (iii) e 730 (iv) dias são mostrados na Fig. 3.1.1. Para comparação os espectros de FTIR do óleo de peixe puro (FO) e do surfactante solutol HS são mostrados em (i) e (v), respectivamente.

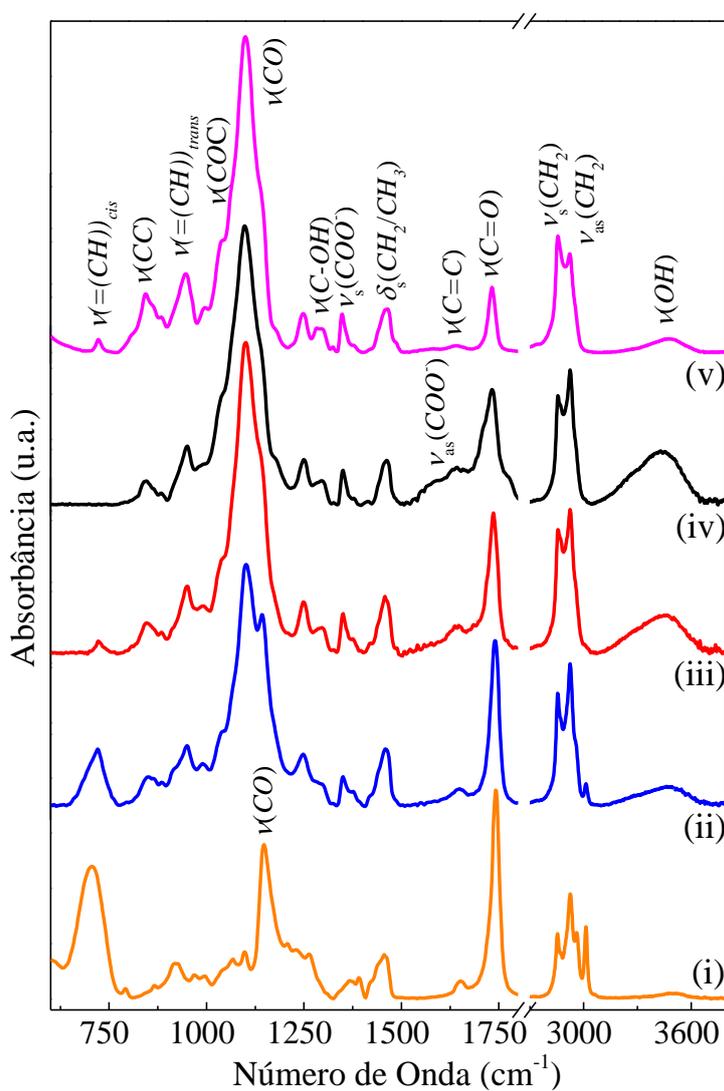


Figura 3. 1.1: Espectro FTIR da amostra NEW3 e seus constituintes: (i) FO, (ii) NEW3-0, (iii) NEW3-365, (iv) NEW3-730 e (v) Solutol HS.

Para facilitar as comparações os espectros foram normalizados segundo a intensidade da banda localizado em torno de 1460 cm^{-1} , associada às vibrações de deformação das ligações CH_2 e CH_3 . Note da Fig. 3.1.1 que os espectros da amostra NEW3, com diferentes idades, são semelhantes entre si, e aparentam ser superposições dos espectros do surfactante solutol HS e do óleo de peixe (FO). Contudo, uma análise mais aprofundada mostra diferenças espectrais importantes.

Na região de mais alta energia, a banda em torno de 3430 cm^{-1} é atribuída a contribuições de uma variedade de modos de estiramento $O-H$. Grupos carboxilas e hidroxilas presentes nas amostras certamente contribuem para esta banda. O perfil espectral desta banda indica que vários grupos contendo $-OH$ estão presentes em diferentes ambientes químicos. As bandas centradas em 2850 e 2930 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento simétrico e assimétrico do grupo CH_2 . Por sua vez, os modos de estiramento simétrico e assimétrico do grupo CH_3 são encontrados em aproximadamente 2870 e 2960 cm^{-1} , respectivamente.

As vibrações de estiramento do grupo éster carbonil $C=O$ e da dupla ligação insaturada $C=C$ são observados em ~ 1740 e 1640 cm^{-1} , respectivamente. As bandas centradas em torno 1460 cm^{-1} são principalmente devido às vibrações de deformação dos grupos alifáticos CH_2 e CH_3 . Vibrações de estiramento dos grupos $C-O-C$ e COH são encontradas em 1100 cm^{-1} e 1150 para o HS e 1150 cm^{-1} para o FO. Para a amostra NEW3 é observado uma aparente superposição destas duas bandas, cuja intensidades aumenta com a idade da amostra. A banda em torno de 3010 cm^{-1} , presente no espectro de absorção da amostra NEW3 e da amostra FO é devido ao estiramento axial CH , adjacente a dupla ligação insaturada ($=CH$). Os modos de flexão CH fora do plano, adjacente às ligações $(C=C)_{cis}$ são encontrados em torno de 720 cm^{-1} . Por sua vez, os modos de flexão adjacentes às ligações $(C=C)_{trans}$ não conjugados e conjugados são encontradas em torno

de 950 e 988 cm^{-1} , respectivamente [57], [58]. Um resumo das atribuições das bandas de absorção de infravermelho pode ser encontrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Atribuições dos modos vibracionais de FTIR das amostras HS, FO e NEW3 [8], [59]–[62].

Pico (cm^{-1})	Atribuição
720	$\delta(=CH)_{cis}$
842	$\nu(CC)$
944	$\delta(=CH)_{trans}$ (não conjugado)
988	$\delta(=CH)_{trans}$ (conjugado)
1100	$\nu(COC)$
1150	$\nu(CO)$
1286	$\nu(C-OH)$
1350	$\nu_s(COO^-)$
1460	$\delta(CH_2/CH_3)$
1580	$\nu_{as}(COO^-)$
1640	$\nu(C=C)$
1738	$\nu(C=O)$
2856	$\nu_s(CH_2)$
2871	$\nu_s(CH_3)$
2922	$\nu_{as}(CH_2)$
2960	$\nu_{as}(CH_3)$
3012	$\nu(=CH)_{cis}$
3300-3700	$\nu(OH)$

v-modo de estiramento, ν_s - estiramento simétrico, ν_{as} - estiramento assimétrico, δ -modo de deformação.

As mudanças nos espectros de FTIR da amostra NEW3 durante o processo de envelhecimento mostra um padrão geral que pode estar associado a processos de oxidação que ocorrem com o passar do tempo de preparação. As Fig. (3.1.2 – 3.1.4) mostram as mudanças espectrais mais importantes para os diferentes tempos de preparação.

É conhecido da literatura que lipídios insaturados são altamente suscetíveis a oxidação por radicais livres ou oxigênio singleto devido à presença das duplas ligações [63]. A oxidação produzida por radical livre começa com a subtração do átomo de hidrogênio bisilílico pelo radical livre (X^\bullet) resultando em um radical pentadienil, que combina com O_2 gerando um radical peroxil, que se propaga em reação em cadeia,

subtraindo outro átomo de hidrogênio de outra molécula lipídica [63]. A autoxidação das PUFAs na presença de bons doadores de hidrogênio gera peróxidos (ROO^\bullet) e hidroperóxidos ($ROOH$) como produtos primários de oxidação, os quais são intermediários instáveis que se decompõem em produtos secundários de natureza mais diversa, obtidos por cisão e rearranjos dos peróxidos (aldeídos alifáticos, cetonas, lactonas, álcoois, epóxidos), cujas estruturas dependem da natureza dos ácidos graxos presentes [62]. São justamente a presença destes produtos os responsáveis pelas alterações espectrais observadas nas Fig. (3.1.2– 3.1.4).

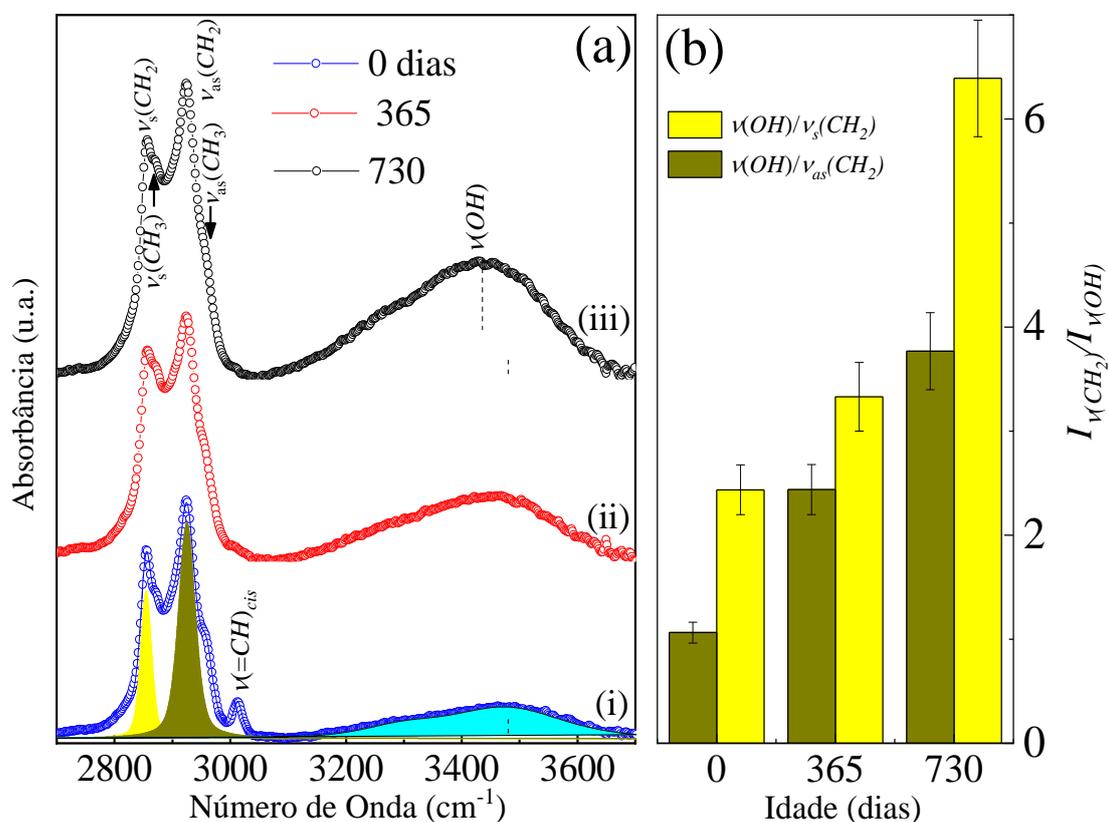


Figura 3.1.2: (a) Espectro de absorção FTIR das amostras NEW3 na região de 2600 - 3700 cm^{-1} em diferentes tempos de produção. (b) Gráfico de barra da razão entre as intensidades integradas da banda $\nu(\text{OH})$ com relação às bandas $\nu_s(\text{CH}_2)$ - ($I_{\nu(\text{OH})}/I_{\nu_s(\text{CH}_2)}$) e $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ ($I_{\nu(\text{OH})}/I_{\nu_{as}(\text{CH}_2)}$).

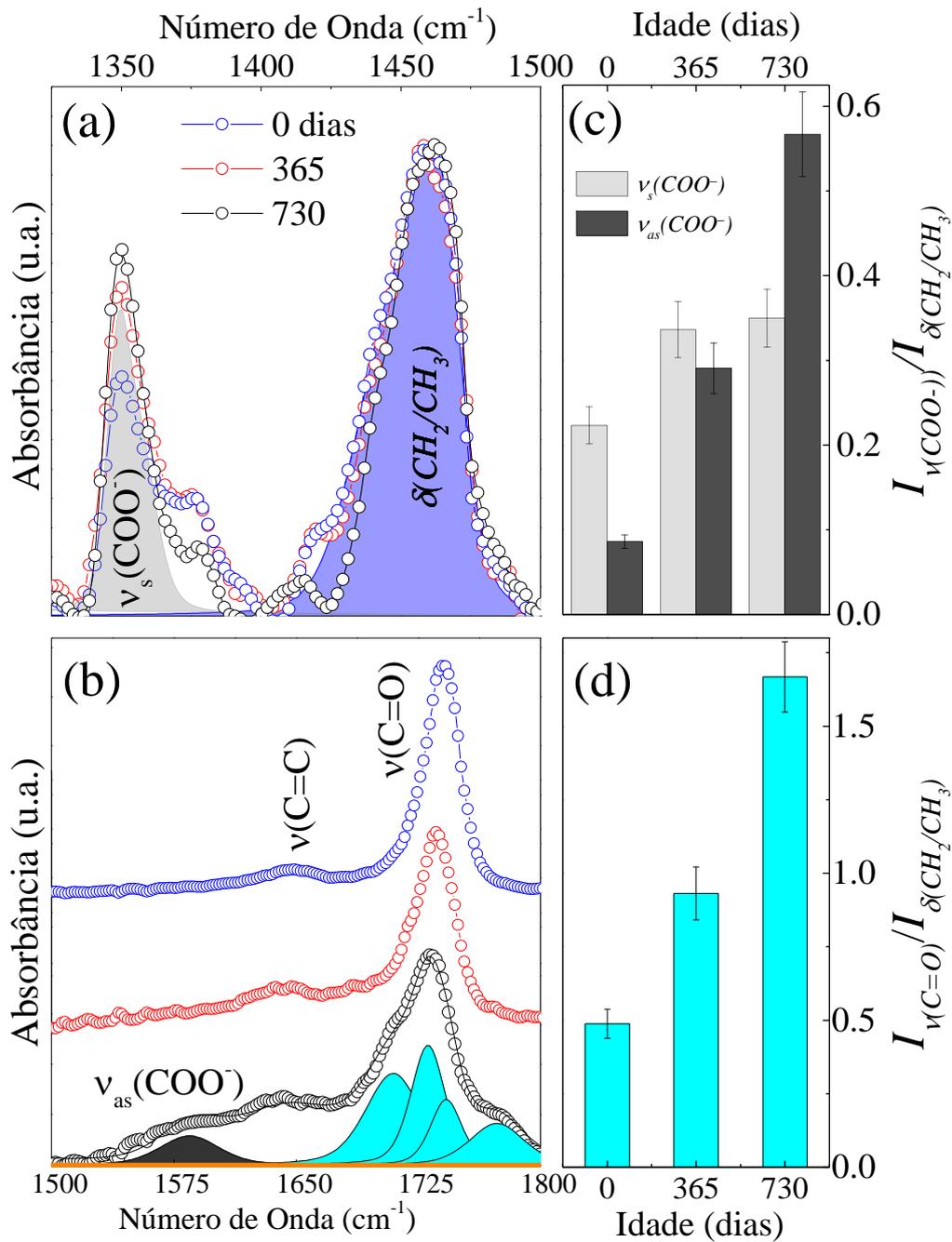


Figura 3.1.3: Espectro de absorção FTIR das amostras NEW3 com diferentes tempos de produção. Fittings dos espectros de absorção FTIR das amostras NEW3 das regiões de 1300-1500 cm⁻¹ (a) e 1500-1800 cm⁻¹ (b). Gráfico de barra da razão entre as áreas integradas $I_{\nu_s(\text{COO}^-)}/I_{\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)}$, $I_{\nu_{as}(\text{COO}^-)}/I_{\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)}$ e $I_{\nu(\text{C}=\text{O})}/I_{\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)}$ (c).

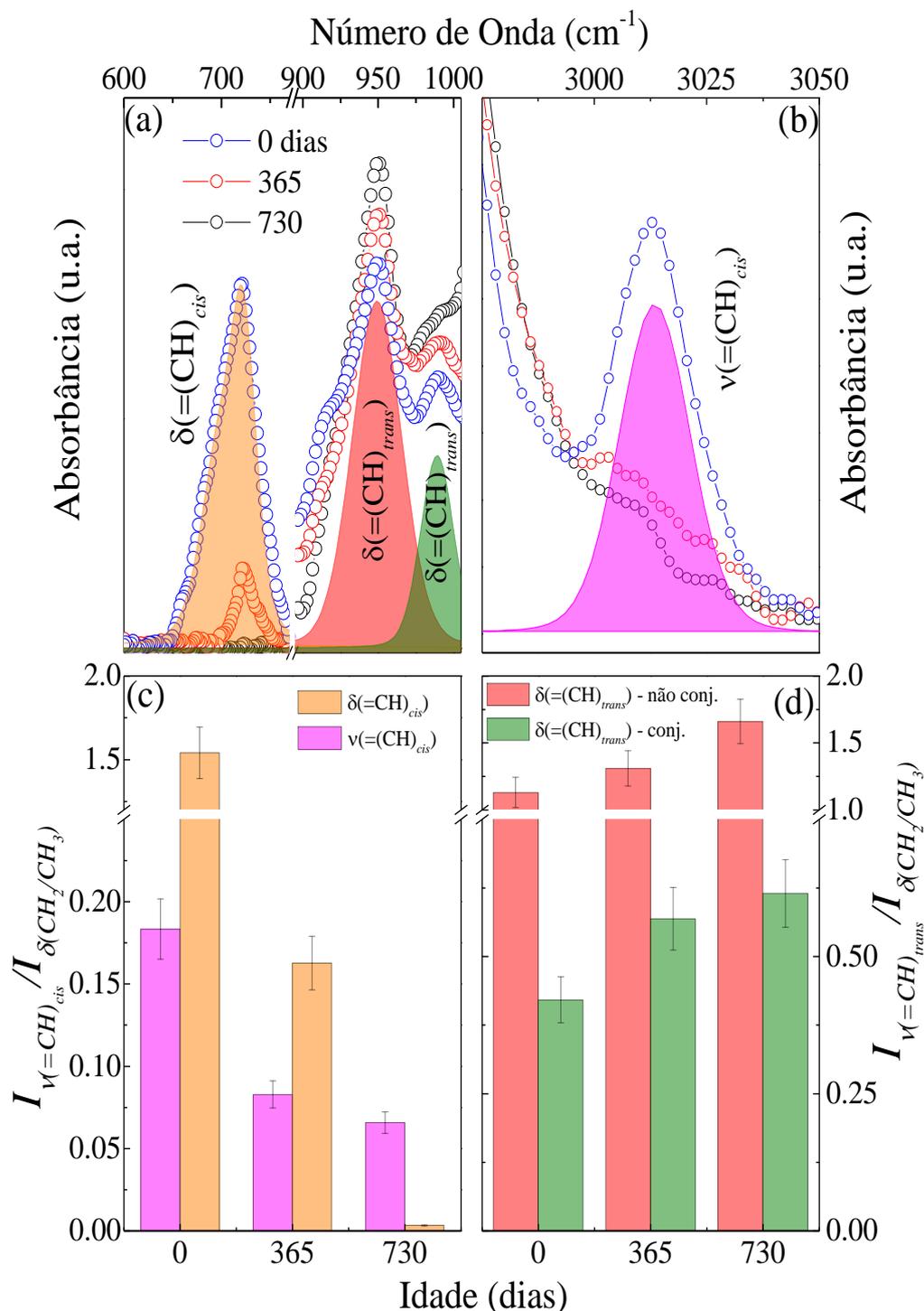


Figura 3.1.4: Espectro de absorção FTIR das amostras NEW3 com diferentes tempos de produção. Ampliações das regiões de 600-1010 cm⁻¹ associados aos modos *cis* e *trans* (não conjugado e conjugado) (a) e 2950-3050 cm⁻¹ ao modo *cis* (b). Gráfico de barra da razão entre as áreas integradas $I_{(=CH)_{cis}}/I_{\delta(CH_2/CH_3)}$ (c) e $I_{(=CH)_{trans}}/I_{\delta(CH_2/CH_3)}$ (d).

Na região 3100 a 3700 cm⁻¹ (Fig. 3.1.2), as bandas de absorção dos grupos *OH* sofrem fortes alterações com o aumento do tempo de preparo. A banda em torno de

3480 cm^{-1} , para a amostra em $t = 0$ dias, originalmente associada a absorção do glicérido éster carbonila, torna-se mais larga e mais intensa enquanto a absorbância máxima é deslocada para menores número de onda (de 3460 cm^{-1} em $t = 365$ dias para 3450 em $t = 730$ dias). De acordo com Guillen e Cabo [64], o deslocamento desta banda deve-se a sobreposição entre a banda original e novas absorções causadas por hidroperóxidos gerados no processo de oxidação. A fim de avaliar o efeito do tempo de preparo na intensidade da absorbância da banda $\nu(OH)$ a Fig. 3.1.2 (b) mostra as razões das intensidades integradas desta banda com relação às intensidades integradas das bandas $\nu_s(CH_2)$ e $\nu_{as}(CH_2)$, as quais não mudam com o grau de oxidação. Como pode ser observado da Fig. 3.1.2 (b) as razões $I_{\nu(OH)}/I_{\nu_s(CH_2)}$ e $I_{\nu(OH)}/I_{\nu_{as}(CH_2)}$ crescem continuamente com o aumento do tempo de preparo. Este comportamento pode ser explicado levando-se em conta a degradação lipídica a qual leva a formação de hidroperóxidos como produtos de primários de oxidação [65]. É conhecido que amostras de óleo que apresentam banda larga na região de 3100 – 3600 cm^{-1} são óleos em que o processo de oxidação já foi iniciado [64].

Efeitos dos produtos secundários de oxidação podem ser observados nas regiões em torno de 1350, 1585, e 1700 - 1750 cm^{-1} , onde são observadas bandas associadas às vibrações do carboxilato ($\nu_s(COO^-)$ e $\nu_{as}(COO^-)$) e carbonila ($\nu(C=O)$), respectivamente (ver Fig 3.1.3 (a) e (b)).

A Fig. 3.1.3 (c) mostra as variações das intensidades integradas das bandas $\nu_s(COO^-)$ e $\nu_{as}(COO^-)$ com relação as intensidades integradas das banda marcadoras $\delta(CH_2/CH_3)$ (usada na normalização dos espectros e que não mudam com o grau de oxidação) para as diferentes tempos de preparação de amostra. Note da Fig. 3.1.3 (a) e (c) que as intensidades das bandas dos grupos carboxilato aumentam com o passar do tempo de preparo. Este comportamento pode estar associado a reações químicas de

desassociação do tipo $HCOOH \rightleftharpoons H^+ + HCOO^-$, decorrente do processo de hidroperoxidação. Adicionalmente, a Fig. 3.1.3 (b) mostra que para $t = 0$, a banda $\nu(C=O)$ apresenta um perfil intenso, estreito e relativamente simétrico, enquanto o perfil da mesma banda, observado em $t = 730$ dias, se apresenta menos intenso, largo e assimétrico. Este comportamento pode ser explicado considerando que com o avanço do estado de oxidação, surgem novos derivados da carbonila. Ajustando os espectros, usando curvas lorentzianas, é possível verificar a presença de ao menos quatro derivados da carbonila os quais poder ser atribuídos a ácidos carboxílicos ($1700 - 1725 \text{ cm}^{-1}$), cetonas ($1705 - 1725 \text{ cm}^{-1}$), aldeídos ($1720 - 1740 \text{ cm}^{-1}$) e ésteres (1730 e 1770 cm^{-1}) [66].

Vale ressaltar que a oxidação lipídica é geralmente precedida da isomerização, já que os isômeros *cis* são termodinamicamente menos estáveis, de modo que as ligações duplas *cis* das cadeias de hidrocarbonetos se reorganizam para formar ligações duplas *trans* [67]. Com isso, ocorre um decréscimo no grau de insaturação *cis* e um aumento no nível de insaturação *trans*. Note que este comportamento pode ser observado na Fig. 3.1.4 (a) e (b), onde é mostrado que as intensidades dos modos vibracionais $\delta=(CH)_{trans}$ (não-conjugado em 950 cm^{-1} e conjugado em 988 cm^{-1}) aumentam com o tempo de preparo, enquanto as intensidades integradas dos modos $\delta=(CH)_{cis}$, $\nu=(CH)_{cis}$, respectivamente em 723 e 3010 cm^{-1} , diminuem com o aumento do tempo de preparo. Com o objetivo de acessar o grau de oxidação da amostra NEW3 ao longo do tempo de preparo, foram tomadas as razões entre as integradas das bandas associadas com as ligações dupla *cis* e *trans*, com relação a banda marcadora $\delta(CH_2/CH_3)$. Estes resultados são mostrados nas Fig. 3.1.4 (c) e (d), respectivamente.

3.1.4 Conclusão

Em resumo, nesta parte do trabalho é reportado à aplicação bem sucedida da técnica de FTIR na investigação do efeito do tempo de preparo no estado de oxidação de nanoemulsão a base de óleo de peixe (FO), rico em ácido docosaheptaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA). A amostra foi investigada nos tempos em $t = 0, 365$ e 730 dias. As crescentes intensidades das bandas *OH*, na região de $3100 - 3600 \text{ cm}^{-1}$, com o tempo de preparo, permitiram concluir que a degradação lipídica leva a formação de hidroperóxidos como produtos de primários de oxidação. Produtos secundários de oxidação foram observados nas regiões de vibração da carbonila e do carboxilato, o que permitiu verificar a geração de derivados da carbonila, tais como: ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos e ésteres. Por fim, mudanças espectrais em torno das vibrações associadas às ligações insaturadas permitiram concluir que o processo de oxidação se inicia com a isomerização das ligações duplas *cis* para dupla *trans*, o que favorece a hidroperoxidação das cadeias de hidrocarboneto.

3.2 Estudo das interações entre o complexo *tris* (1,10 fenantrolina) de ferro (II) $[Fe(phen)_3]^{2+}$ e moléculas bioativas em sistema lipídico sólido nanoestruturado por meio das técnicas de espectroscopias vibracionais

3.2.1 Introdução

O uso de íons metálicos nos processos biológicos é conhecido há muito tempo. Por exemplo, a hemoglobina, que tem em sua estrutura um derivado da porfirina de ferro, é a proteína responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos. Já, uma das várias funções do íon de magnésio é regular o transporte de cálcio e potássio através de membranas celulares. Em complemento, há relatos de cerca de 5000 anos que remetem ao uso medicinal dos metais no tratamento de enfermidades [68]. Os chineses e os árabes, por exemplo, usaram o ouro em vários medicamentos há mais de 3500 anos, na crença de que metais preciosos possuem valor medicinal. O cloreto de mercúrio, por sua vez, foi usado como diurético durante o período renascentistas na Europa. Por fim, Paul Ehrlich, denominado fundador da quimioterapia, desenvolveu a arsfenamina (Salvarsan - a base de arsênio), usado no tratamento da sífilis [69].

A introdução de íons ou compostos metálicos em um sistema biológico tem provado ser útil tanto para fins diagnósticos quanto terapêuticos. Um dos exemplos mais emblemáticos do uso de íons metálicos para o diagnóstico de enfermidades são os agentes de contraste contendo isótopos de metais radioativos ou o uso do íon Gd^{3+} como agente de contraste na ressonância magnética. No que diz respeito ao tratamento de enfermidade destaca-se o complexo *cis*-diaminodicloroplatina (II)-*cis* $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, comumente chamado de “*cisplatina*”, e que é um dos compostos metálicos mais utilizados no tratamento de câncer.

Os metalofármacos também são muito utilizados como agentes antimicrobianos e antiparasitário como os a base de arsênio e o antimônio usados no tratamento da tripanossomíase (doenças de chagas) e leishmaniose cutânea, respectivamente [68]. No entanto, devido a sua toxicidade, muitos dos metalofármacos atualmente utilizados, vem sendo substituídos por drogas menos tóxicas, com os a base de Bi, Ag, Cu e Fe.

O complexo de coordenação de íons metálicos com ligantes nitrogenados, como 1,10 fenantrolina (1,10-fen), exibem propriedades farmacológicas. Este composto funciona como quelante para o cobre, rutênio e ferro, com isso promovem processos antioxidantes e oxidativos. Assim, os complexos metálicos podem interagir com proteínas e ácidos nucleicos, quando complexados com aminoácidos. Portanto, a 1,10 fenantrolina é um composto heterocíclico policondensado da classe dos agentes quelante, pertencente à família dos ligantes α, α' diiminas. A força do composto ligante é dada pela perspectiva eletrônica que ocorre devido a sua habilidade como aceitador π de elétrons que é responsável pela força de ligação com o metal, contribuindo para a formação do complexo [70].

Como mostrado na Fig. 3.2.1, a 1,10-fen possui em sua estrutura 14 elétrons π , constituída por ligações de $C-C$ e $C-N$, onde a ligação com o complexo metálico é feita pelo nitrogênio, ou seja, $Me-N$ [70]. A estrutura molecular da 1,10-fen, vem sendo amplamente utilizada com um ligante em química analítica e de coordenação, possuindo características hidrofóbica, planar, rígida e seus átomos de nitrogênio possuem propriedades favoráveis à ligação de cátions. Estas características estruturais determinam a capacidade de coordenação em relação a íons metálicos [71].

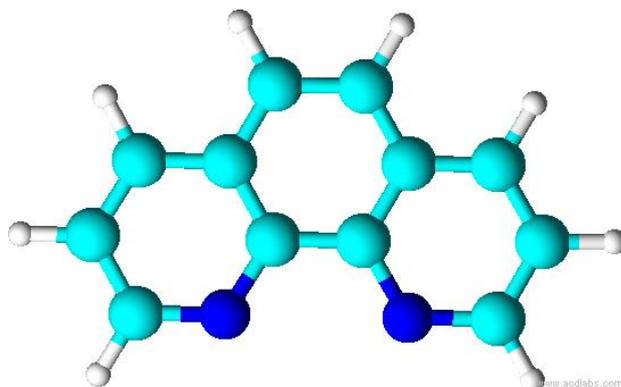


Figura 3.2.1: Estrutura molecular da 1,10-fenantrolina.

A integração de íons metálicos na estrutura do medicamento oferece diversidade estrutural, possível acesso a vários estados de oxidação do metal e o potencial de aumentar a eficácia de um medicamento orgânico estabelecido por meio de sua coordenação com o metal [72]. Entre os candidatos a metalofármacos promissor está fenantrolina a base de Fe (*tris*- (1,10-fenantrolina) ferro (II) ($[Fe(phen)_3]^{2+}$), um composto químico barato e disponível comercialmente.

Complexo $[Fe(Phen)_3]^{2+}$

O Fe está entre os elementos de transição mais abundantes na natureza, sendo um dos micronutrientes essenciais utilizados por quase todos os organismos vivo para realizar processos bioquímicos. Ele também é importante para a realização de processos metabólicos e fisiológicos em seres vivos. Possuindo a capacidade de formar complexos de grande estabilidade nos estados bi e trivalente. A formação do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$, como mostrado na Fig. 3.2.2, é resultante da complexação do íon de ferro (II) com moléculas de 1,10-fenantrolina.

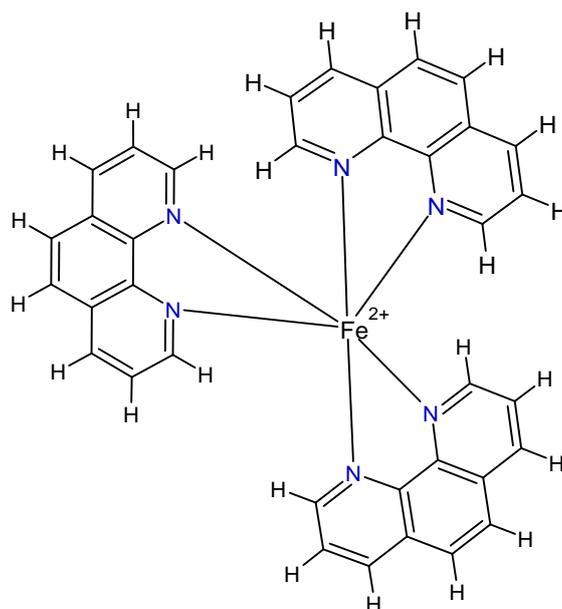


Figura 3.2.2: Estrutura molecular da *tris*-(1,10—fenantrolina).

O complexo $[Fe(Phen)_3]^{2+}$ tem sido utilizados como indicadores redox úteis para à absorção na região da luz visível e a mudança de cor que produzem nas reações de oxidação. Assim, o complexo $[Fe(Phen)_3]^{2+}$ ultimamente tem sido utilizado não apenas como reagentes catalíticos, como também materiais para células solares sensibilizadas por corante, bioquímica, na capacitação de coordenação de DNA e catalisadores [73].

Existem numerosos exemplos em que complexos de metais de transição mostraram inibir o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis* - bacilo patógeno responsável pela tuberculose) *in vitro*. Pesquisas recentes mostraram que o *M. tuberculosis* pode ser altamente suscetível a tipos específicos de espécies reativas de oxigênio (ROS) [74]. É justamente neste contexto que a fenantrolina a base de Fe (*tris*-(1,10-fenantrolina) ferro (II) - $[Fe(phen)_3]^{2+}$) tem se destacado, pois ela exibe grande potencial redox e tem sido amplamente utilizado como precursor de outras reações químicas, que leva a atividades antifúngicas [75].

A baixa solubilidade dos compostos metálicos em água prejudica a atividade biológica em animais. Por este motivo, têm se buscado alternativas para veiculação destes compostos metálicos por meio de estratégias tecnológicas que visam compartimentalizar, de maneira efetiva, diversos grupos de moléculas e modificar seu comportamento no organismo. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivos produzir e caracterizar nanocarreadores a base de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com o complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$, com diferentes concentrações, e estudar a interação molecular entre eles.

3.2.2 Metodologia

Amostras

Oleato de sódio, colesterol e $[Fe(phen)_3]^{2+}$ foram adquiridos da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). A fosfatidilcolina de soja foi adquirida na Lucas Meyer GmbH & Co (Hamburgo, Alemanha). A solução tampão de fosfato foi preparada a partir de monohidrogenofosfato de sódio e di-hidrogenofosfato que foram adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha). O óleo de rícino hidrogenado polioxil-40 foi adquirido da Pharma Special (Itapevi, São Paulo, Brasil).

A NLS carregada com complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ é composta por 10% de fase oleosa (colesterol), 10% de surfactante (uma mistura de soja, oleato de sódio e Eumulgin® HRE 40 [Óleo de rícino polioxil hidrogenado 40]; 3:6:8) e 80% de fase aquosa (tampão de fosfato salino [PBS], pH 7.4). A mistura foi sonicada usando um sonicador de haste (Q700 da QSonica®, Newtown, CT, EUA), 700 watts, em modo descontínuo por 10 minutos com intervalo de 30 segundos a cada minuto, usando um banho de gelo durante

o processo. Em seguida, o NLS obtido foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos. O complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ foi primeiro liofilizado e então carregado na NLS (amostra denominada - $NLS@[Fe(phen)_3]^{2+}$) na concentração de 3000 $\mu\text{g/mL}$, para isso a amostra foi sonicada por 3 minutos [76].

A estabilidade coloidal das amostras NLS foi avaliada por Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering-DLS*) e o potencial ζ . Para isso foi utilizado o equipamento *Malvern* modelo *Zetasizer nanoseries Nano Z590*. Por meio destas técnicas foi verificado que os valores dos diâmetros hidrodinâmicos médios das amostras *NLS* e $NLS@[Fe(phen)_3]^{2+}$, foram de 140 ± 5 nm e 163 ± 7 nm, respectivamente. Por sua vez, o potencial zeta das amostras *NLS* e $NLS@[Fe(phen)_3]^{2+}$ foram de -38 ± 2 mV e -37 ± 2 mV, respectivamente.

Espectroscopias no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Raman convencional.

As medidas FTIR foram realizadas usando um espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier da marca *Bruker*, modelo *Vertex 70*. Usando o módulo de pastilha prensada de Brometo de Potássio FTIR-KBr contendo $\sim 1\text{w/w}$ das amostras investigadas. Foram executadas em média 96 varreduras, com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , sendo realizado a correção do sinal da atmosfera e de sinal de fundo (*background*) antes de cada medição. De cada amostra foi usado $3\ \mu\text{L}$ para a realização da medida. É relevante também informar que a precisão do número de onda do instrumento é melhor do que $0,01\text{ cm}^{-1}$ em 2000 cm^{-1} na medição FTIR. Portanto, os deslocamentos do número da ordem de 1 cm^{-1} são considerados significativos. A pastilha de KBr, foi preparada usando 10 mg de KBr macerada usando

um almofariz e em seguida gotejada 3 μL , e posteriormente colocado na prensa usando 8 T por 2 minutos, para posteriormente ser produzido a pastilha e colocada no FTIR para medida no modo absorbância.

As medidas micro Raman foram feitas usando o espectrômetro LabRam HR Evolution, da marca HORIBA Scientific. O espectrômetro Raman é equipado com microscópio confocal, detector CCD (*Charge Coupled Device*) e grade de 1800 linhas/mm. Usando laser de diodo de 532 nm com potência de aproximadamente 25 mW para as amostras líquidas e 50 mW para amostras em pasta, sendo focado com uma objetiva de 50x. As amostras líquidas medidas por espectroscopia Raman foram adicionadas em uma esfera de aço sobrepostas com uma lamínula, para em seguida ser realizada a medida, já as amostras em pasta e pó foram depositadas sobre uma lâmina patológica para posteriormente serem medidas.

A análise de dados foi realizada usando o LabSpec[®] para correção da linha de base e normalização pela intensidade da banda. Para plotagem dos dados foi utilizado o OriginPro[®] 9 e o fitting das razões das bandas foram realizadas no Peakfit[®]. Todas as medidas experimentais foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica-LEO do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

3.2.2 Resultados e discussões

Espectros FTIR

A Fig. 3.2.3 (a) mostra os espectros de FTIR das amostras NLS@[Fe(phen)₃]²⁺ nas concentrações de 0,75 (ii), 1,5 (iii) e 3,0 (iv) mg/mL de complexo [Fe(phen)₃]²⁺. Para

comparação, em (i) é mostrado os espectros de FTIR das amostras NLS (branca - sem o complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$). Os espectros de FTIR dos constituintes individuais de todas as nanoemulsões são mostrados na Fig. 3.2.3 (b): (i) complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$, (ii) fosfatidilcolina, (iii) eumulgin, (iv) colesterol e (v) oleato de sódio. Note da Fig. 3.2.3 (a) que os espectros das amostras NLS@ $[Fe(phen)_3]^{2+}$ com diferentes concentrações de complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ (iii-v) aparentam ser superposições dos espectros dos constituintes: fosfatidilcolina, eumulgin, colesterol e oleato de sódio. Não há, nos espectros, evidências direta da presença do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$. A única evidência espectral da presença da fosfatidilcolina nos espectros absorção IR das nanoemulsões NLS é a forte banda em torno de 1740 cm^{-1} , associada às vibrações $\nu(C=O)$. O mesmo ocorre com o eumulgin, o qual mostra somente uma forte banda em $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$, associada com às vibrações $\nu(C-O)$. O colesterol por sua vez, contribui com bandas em torno de $800, 840\text{ e }920, 960, 1025\text{ e }1055\text{ cm}^{-1}$, sendo as duas primeiras bandas atribuídas às vibrações de estiramento dos anéis do esteroide e as seguintes, às vibrações $\nu(C-C)$ do esqueleto. Por fim, o oleato de sódio é o que mais contribui para as características do espectro das nanoemulsões, com bandas em torno de $725, 1425, 1445, 1460\text{ e }1560\text{ cm}^{-1}$. A primeira banda está associada à vibração do $(=CH)$, as três bandas intermediárias e a última são devido aos modos de estiramento simétrico ($\nu_s(-COO^-)$) e assimétrico ($\nu_{as}(-COO^-)$) do carboxilato, respectivamente. Este resultado indica que os grupos carboxila do oleato do sódio adotam uma configuração protonado. Um resumo das atribuições das bandas de absorção no infravermelho é mostrado na Tabela 3.2.

$[Fe(phen)_3]^{2+}$ nas amostras (ver Fig. 3.2.4 (e-g)). Esses comportamentos sugerem a formação de um complexo coordenação *carboxila* $\cdots Fe^{2+}$, por meio do grupo carboxilato do oleato de sódio.

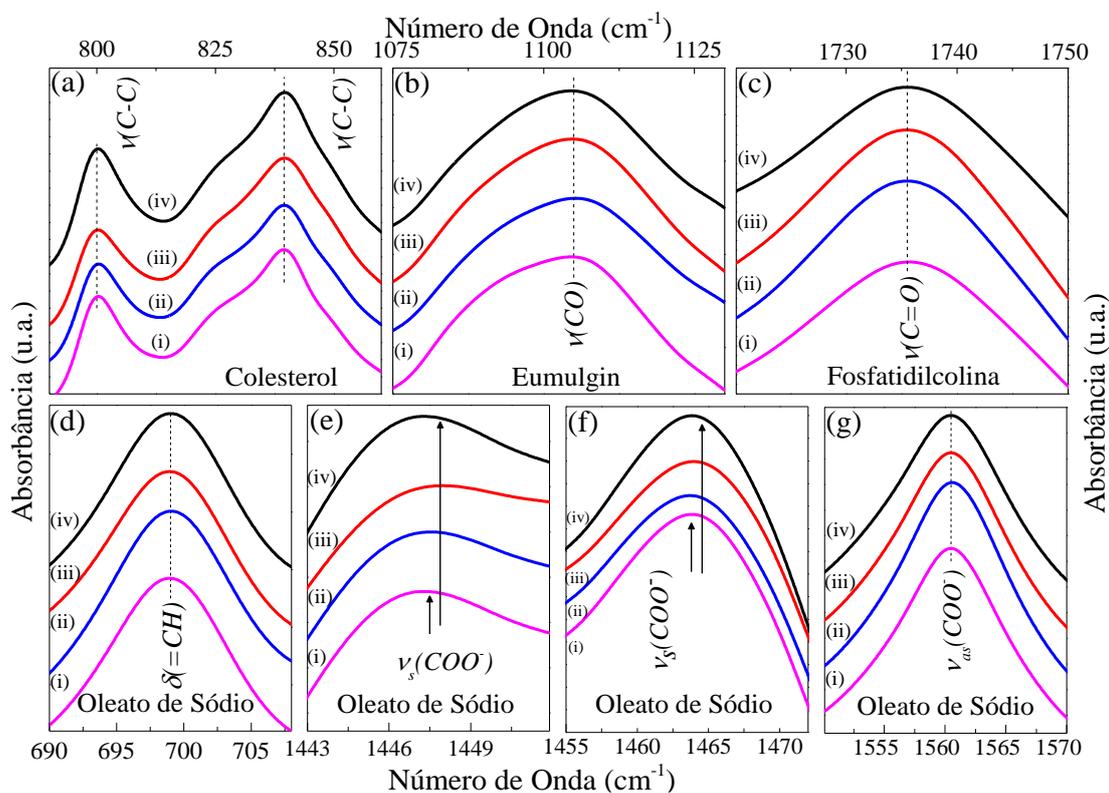


Figura 3.2.4: Ampliações em diferentes regiões dos espectros FTIR das amostras NLS (banca) (i), NLS@[$Fe(phen)_3$] $^{2+}$ nas concentrações de 0,75 (ii), 1,5 (iii) e 3,0 (iv) mg/mL. Para o colesterol, eumulgin e fosfatidilcolina são apresentadas ampliações das regiões de 790-860 cm^{-1} (a), 1075-1130 cm^{-1} (b) e 1710-1750 cm^{-1} (c), respectivamente. Nas regiões espectrais característica do oleato de sódio, são apresentadas ampliações em 690-710 cm^{-1} (d), 1443-1450 cm^{-1} (e), 1455-1475 cm^{-1} (f) e 1550-1570 cm^{-1} (g).

Tabela 3. 2: Tabela com as posições dos modos vibracionais obtidos a partir das técnicas de FTIR e Raman convencional das amostras NLS@[Fe(Phen)₃]²⁺.

Amostras: NLS@[Fe(Phen) ₃] ²⁺			
(cm ⁻¹)	Atribuições		origem
	FTIR	Raman	
310		$\delta(CCC)$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
420		$\nu(CCC)$	Cho
445		$\delta(CCC)$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
560		$\nu(Fe-\delta_{anel})$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
608		$\nu(CCC)$	Cho
700		$\delta(CH_2)$	Cho
700	$\delta(=CH)$		NaOl
738		$\nu(NFeN)$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
800		$\delta(CH_2)$	Cho
878		$\delta(CH)$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
1100	$\nu(CO)$		Eum
1150		$\delta(CCH)_{anel}$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
1210		$\delta(CCH)_{anel}$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
1240	$\tau(CH_2)$		Eum
1300		$\tau(CH_2)$	PC
1340 - 1380	$\delta(CH_2)$		Cho
1430 - 1465	$\nu_s(-COO^-)$		NaOl
1440	$\delta(CH_2)$		PC
1455		$\delta(CCH)_{anel}$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
1485		$\nu_s(COO^-)$	Olea.
1514		$\delta(CCH)_{anel}$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
1560	$\nu_{as}(-COO^-)$		NaOl
1579		$\nu(C-C)$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
1595		$\nu_{as}(COO^-)$	Olea.
1631		$\nu(C-C)_{anel}$	[Fe(Phen) ₃] ²⁺
1660	$\nu(C=C)$		PC
1670	$\nu(C=C)$		Cho
1733	$\nu(C=O)$		PC
2850	$\nu_s(CH_2)$	$\nu_s(CH_2)$	NaOl
2870	$\nu_s(CH_3)$	$\nu_{as}(CH_2)$	NaOl
2930	$\nu_{as}(CH_2)$	$\nu_s(CH_3)$	NaOl
2970	$\nu_{as}(CH_3)$	$\nu_{as}(CH_3)$	PC
3010	$\nu(=CH)$	$\nu(=CH)$	NaOl

ν -modo de estiramento, ν_s - estiramento simétrico, ν_{as} - estiramento assimétrico, δ -modo de deformação. Colesterol- Cho; Fosfatidilcolina-PC; Oleato de Sódio-NaOl; Tris-fenantrolina com Complexo de Ferro (II)-[Fe(Phen)₃]²⁺.

Espectros Raman convencional

A Fig. 3.2.5 (a) mostra os espectros de Raman convencional das amostras NLS@[Fe(phen)₃]²⁺ nas concentrações de 0,75 (ii), 1,5 (iii) e 3,0 (iv) mg/mL de complexo [Fe(phen)₃]²⁺. Para comparação em (i) é mostrado o espectro Raman convencional da amostra NLS (branca - sem o complexo [Fe(phen)₃]²⁺). A Fig. 3.2.5 (b) mostra os espectros Raman convencional dos constituintes das nanoemulsões NLS@[Fe(phen)₃]²⁺: complexo [Fe(phen)₃]²⁺ livre (i), fosfatidilcolina (ii) eumulgin (iii), colesterol (iv) e oleato de sódio (v). Diferentemente do FTIR, onde os espectros de absorção foram caracterizados por modos vibracionais do oleato de sódio e colesterol, as principais contribuições para os espectros Raman das amostras de NLS@[Fe(phen)₃]²⁺ são modos vibracionais provenientes da fosfatidilcolina, colesterol e complexo [Fe(phen)₃]²⁺. Na região de 2750 – 3100 cm⁻¹ são mostrados os modos de estiramento C-H dos grupos metil e metileno. Onde os modos de estiramento simétrico e antissimétrico das ligações CH₂, são encontrados em ~2850 e ~2870 cm⁻¹, respectivamente. As bandas em ~2930 e ~2960 cm⁻¹ são atribuídas em parte aos modos de estiramento C-H do grupo metil das cadeias de hidrocarboneto e aos modos de estiramento simétrico C-H da porção colina da fosfatidilcolina. O pico ~3010 cm⁻¹ é atribuído ao modo vibracional ν(=CH) presentes nas cadeias de hidrocarboneto. Os picos de deformações do CH₂, da fosfatidilcolina foram observados nas regiões em torno de 1300 e 1440 cm⁻¹. O colesterol, por sua vez, apresentou modos Raman em torno de 420, 600, 700, 800 e 1670 cm⁻¹, sendo os dois primeiros atribuídos às vibrações de estiramento dos anéis do esteroide (ν(CCC)), o último associada às vibrações de estiramento (C=C) e os demais às vibrações de deformação do CH₂. Os modos típicos do complexo [Fe(phen)₃]²⁺, ausentes no FTIR, foram encontrados em torno de 560 cm⁻¹ (deformação no plano do anel devido a flexão dos átomos de hidrogênio combinada com o movimento do N em direção ao Fe-δ_{anel}),

740 cm^{-1} (estiramento no plano envolvendo movimento do *N* em direção ao Fe acoplados dos átomos de carbono e hidrogênio $\nu(\text{HCN-Fe-NCH})$) e 880 cm^{-1} (deformações fora do plano do anel $\delta(\text{CH})_{\text{anel}}$). As bandas em 1150, 1210, 1450 e 1510 cm^{-1} são todas associadas ao estiramento no plano do anel ($\nu(\text{CCH})_{\text{anel}}$), enquanto a banda em 1576 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-C com o carbono próximo ao nitrogênio vibrando em direção ao *Fe*. Por fim, o pico em 1630 cm^{-1} está associada com o modo $\nu(\text{C-C})_{\text{anel}}$ [77], [78]. Algumas das representações esquemáticas das vibrações do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ são mostradas nas inserções da Fig. 3.2.6. Estes modos são por esta razão, esperados serem mais influenciados pela interação do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ com superfície das nanopartículas. Um resumo das atribuições dos modos vibracionais Raman pode ser encontrado na Tabela 3.2.

Embora pequenas, o carregamento do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ sobre as nanopartículas de NLS causam mudanças espectrais importantes. Comparações entre os espectros Raman das amostras $\text{NLS}@[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ com os das amostras NLS (branca) e complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ livre são mostradas de forma ampliada na Fig. 3.2.6 (a-d). Note que o espectro da amostra NLS (linha magenta) mostra os picos típicos do colesterol (545, 608, 1440 e 1670 cm^{-1}), os quais permanecem com a mesma energia vibracional quando comparado com as amostras $\text{NLS}@[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$. Contudo, os picos característicos do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ (559, 738, 878, 1455, 1514, 1579 e 1631 cm^{-1}) sofrem progressivos deslocamentos para maiores número onda à medida que a concentração de complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ aumenta (para a amostra de 3,0 mg/mL de complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ estes picos deslocam-se para 562, 741, 880, 1457, 1514, 1582 e 1634 cm^{-1} , respectivamente).

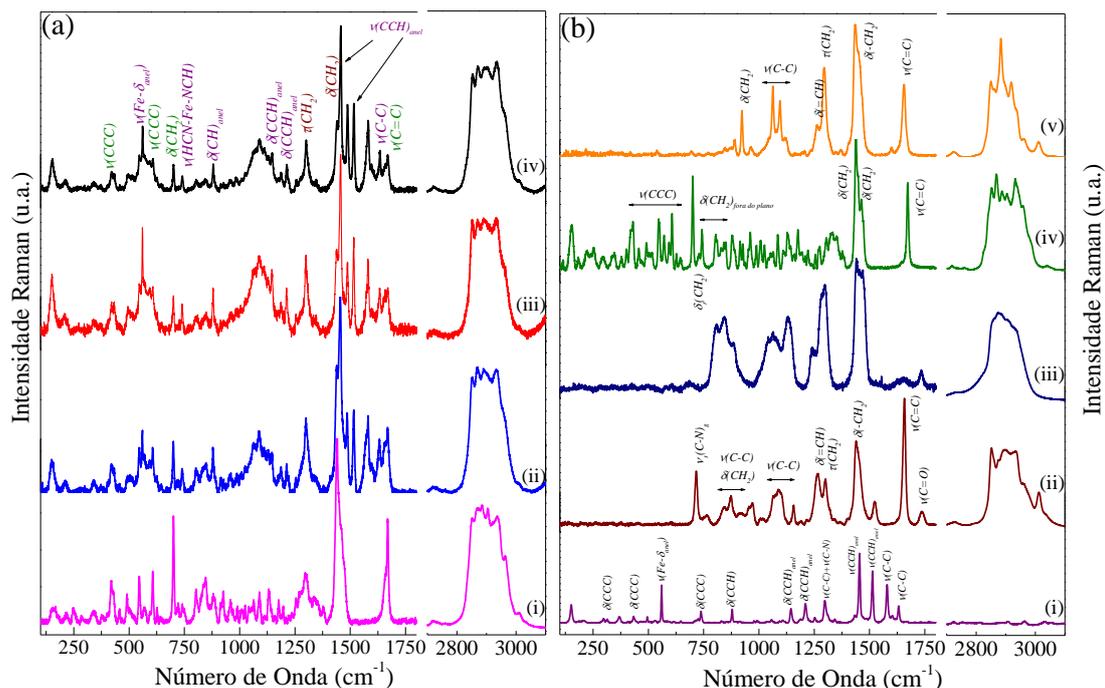


Figura 3.2.5: (a) Espectros Raman convencional das amostras de NLS (i), NLS@[Fe(phen)₃]²⁺ nas concentrações de 0,75 (ii), 1,5 (iii) e 3,0 (iv) mg/mL de complexo de [Fe(phen)₃]²⁺. (b) Amostras constituintes da NLS@[Fe(phen)₃]²⁺ com as atribuições vibracionais observadas em (a) e destacadas com as linhas pontilhadas, associadas as amostras de [Fe(phen)₃]²⁺ (i), fosfatidilcolina (ii), eumulgin (iii), colesterol (iv) e oleato de sódio (v).

Mudanças nas energias vibracionais associadas aos movimentos dos átomos de nitrogênio ao longo da ligação *N-Fe* ou dos modos de estiramento *CC* vizinhos ao nitrogênio indica possíveis interações entre o Fe^{2+} do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ com grupos funcionais ativos das moléculas que compõem as nanopartículas de NLS. O aumento da energia vibracional dos modos típicos do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ evidencia um encurtamento da distância entre os átomos de *C* e *N* do anel após o carregamento do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$. Um encurtamento da distância significa que a ligação ganha densidade eletrônica e se torna mais forte mudando suas energias vibracionais [79].

Além do mais, dois picos extras em ~ 1488 e 1595 cm^{-1} , foram observados nos espectros Raman nas amostras NLS@[Fe(phen)₃]²⁺, quando comparados com os das amostras de complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ livre e NLS. Estes comportamentos sugerem que o

complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ interage com as moléculas de oleato de sódio em detrimento da interação com as moléculas de colesterol e de fosfatidilcolina.

É bem conhecido da literatura que os grupos funcionais da carboxila possui forte afinidade para se ligarem a íons metálicos, o que resulta na formação de complexos de coordenação carboxila-íon metal [80], [81]. Foi proposto que a diferença entre as energias vibracionais das bandas $\nu_s(-COO^-)$ e $(\nu_{as}(-COO^-))$ dos grupos carboxila desprotonado são sensíveis à estrutura do grupo carboxilato, à natureza do solvente, à natureza do ligante e à identidade do íon metálico a eles ligados [82]. Portanto, a separação entre estas bandas (ou seja, $\Delta\nu = \nu_{as}(-COO^-) - \nu_s(-COO^-)$) é indicativa da estrutura de um determinado carboxilato. Deacon e Phillips [83], propuseram que para ligações monodentadas verifica-se $200 \leq \Delta\nu \leq 320 \text{ cm}^{-1}$. Para ligações quelante bidentada tem-se $40 \leq \Delta\nu \leq 110 \text{ cm}^{-1}$ e para ligações tipo ponte bidentada constata-se $140 \leq \Delta\nu \leq 190 \text{ cm}^{-1}$. No presente caso foi constatado que íon de Fe^{2+} presente no complexo de $[Fe(phen)_3]^{2+}$, induz a formação dos modos $\nu_s(-COO^-)$ em torno de 1488 cm^{-1} e $\nu_{as}(-COO^-)$ em torno de 1595 cm^{-1} . Portanto, verificou-se um $\Delta\nu \approx 110 \text{ cm}^{-1}$, sugerindo uma ligação quelante bidentada entre o grupo carboxilato do oleato de sódio e o íon de Fe^{2+} do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$.

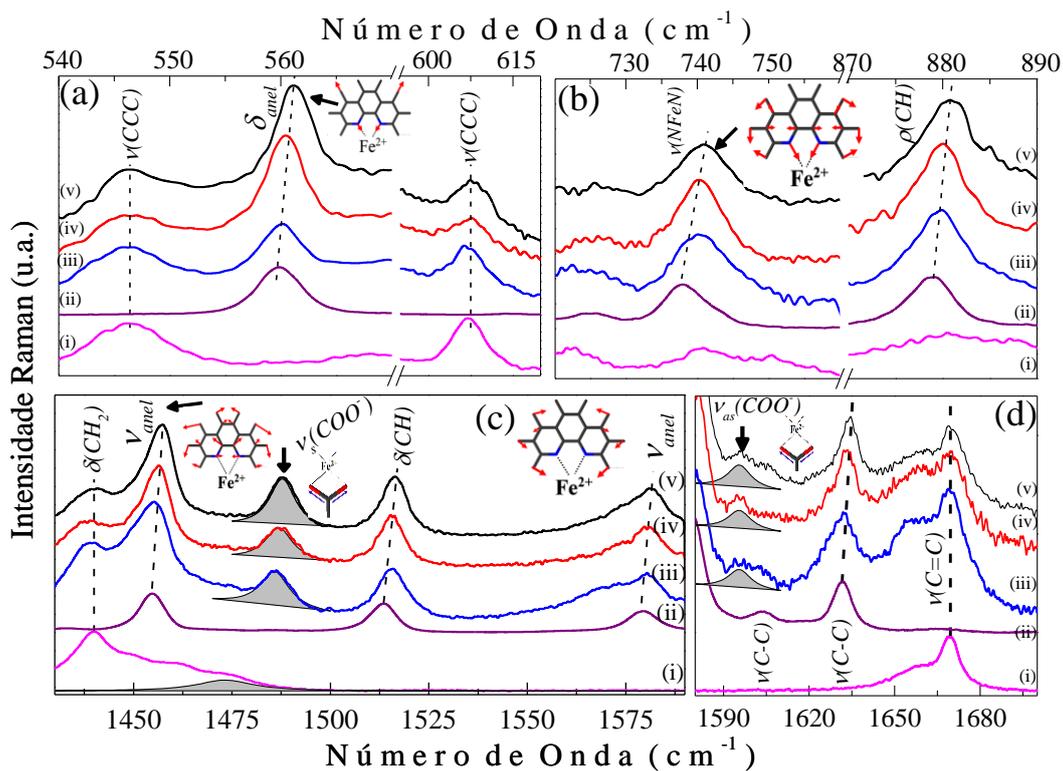


Figura 3.2.6: Ampliações de regiões dos espectros Raman convencional das amostras NLS (i), complexo- $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ (ii), NLS@ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ nas concentrações de 0,75 (iii), 1,5 (iv) e 3,0 (v) mg/mL de complexo de $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$. Para as regiões de 540-615 cm^{-1} (a) 720-890 cm^{-1} (b), 1420-1480 cm^{-1} (c), 1500-1600 cm^{-1} (d) e 1610-1690 cm^{-1} (e) são apresentadas as principais mudanças vibracionais associadas as amostras NLS e o complexo- $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$.

3.2.4 Conclusão

Nesta parte do trabalho é reportado à aplicação das técnicas de espectroscopias FTIR e Raman na investigação de nanocarreadores baseadas em nanopartículas lipídicas sólidas carregados com diferentes concentrações de complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$. Os espectros de FTIR das amostras NLS@[$Fe(phen)_3$] $^{2+}$ não mostraram evidências da presença do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$, evidenciando apenas uma aparente superposição dos espectros dos constituintes: fosfatidilcolina, eumulgin, colesterol e oleato de sódio. As mudanças espectrais observadas para a banda $\nu_s(-COO^-)$ com relação ao ($\nu_{as}(-COO^-)$) com o aumento do teor do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$, sugere formação de um complexo de coordenação *carboxila* $\cdots Fe^{2+}$, através do grupo carboxilato do oleato de sódio. Diferentemente dos espectros de FTIR, os espectros Raman das amostras NLS@[$Fe(phen)_3$] $^{2+}$ foram caracterizados por modos vibracionais da fosfatidilcolina, colesterol e complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$. Os resultados mostraram que o complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ apresenta interações com o oleato de sódio por meio de uma ligação quelante bidentada entre o grupo carboxilato do oleato de sódio e o íon de Fe^{2+} do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$.

3.3 Estudo da bioconjugação do anticorpo anti-SARS-CoV-2 spike na superfície de Nanopartículas de Au.

3.3.1 Introdução

Coronovirus

Os Coronavírus compreendem uma família de aproximadamente 40 vírus que infectam diversas espécies de animais. Os coronavírus possuem um genoma constituído por um RNA de fita simples, polaridade positiva e tamanho da ordem de 30 kb [84]. A maioria dos Coronavírus replica-se inicialmente nos tratos respiratório inferiores, semelhante à gripe. Contudo, diferentemente do vírus da gripe, a infecção pelo coronavírus pode levar a sérias complicações, requerendo muitas vezes que o paciente seja internado em virtude da insuficiência respiratória devido à lesão pulmonar que pode levar a morte [85], [86]. Em dezembro de 2019, casos de pneumonia de etiologia desconhecida foram relatados na cidade de Wuhan, na China [87], causando uma epidemia considerável de Covid-19 na China, alastrando-se globalmente e sendo declarado uma pandemia em março de 2020 [88], [89].

Segundo dados da OMS, desde o início da Covid-19 foram contabilizados até os dias atuais aproximadamente 6.921.614 mortes [90][91]. Mesmo após a produção de vacinas, o Covid-19 continua a causar uma imensa crise de saúde global. Tendo uma taxa de letalidade no mundo de aproximadamente 1%, sendo de que 3 a 20% das pessoas contaminadas necessitando de internação, do qual um subconjunto considerável (~10-30%) requer cuidados intensivos, colocando assim uma grande pressão sobre os sistemas de saúde [92].

Os testes sorológicos para detectar imunoglobulinas do tipo M e G não são adequadas para o diagnóstico precoce de Covid-19, devido as respostas imunológicas perceptíveis levarem alguns dias após a infecção [93]. A presença de anticorpos IgM indicam o início da resposta imune, enquanto o IgG associa-se ao estágio de imunização contra SARS-CoV-2. A detecção de proteínas de vírus (S e N), por outro lado, produzem testes mais rápidos e baratos, especialmente usando nanobiosensores [94]. Estes imunossensores podem conter NPs metálicas cujas propriedades físico-químicas são ajustadas para amplificar sinais ópticos, elétricos e eletroquímicos [95], [96].

Nanopartículas metálicas

Uma das principais propriedades ópticas das nanoestruturas metálicas é a ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR) (do inglês *localized surface plasmon resonance*). Sendo constituída de uma oscilação coletiva de elétrons de condução excitados por um campo eletromagnético. Plasmons na superfície de nanopartículas metálicas dão origem a propriedades ópticas que dificilmente seriam alcançados por outros processos físicos. A incidência de uma onda eletromagnética sobre uma partícula metálica, leva a um deslocamento dos elétrons desta partícula no sentido contrário ao campo elétrico da onda incidente. Este deslocamento das cargas promove a indução de um dipolo elétrico na partícula que por sua vez promove o aparecimento de um campo elétrico restaurador. O campo elétrico restaurador e o dipolo induzido, quanto acoplados geram a ressonância plasmônica [97].

A absorção de luz por NPs metálicas pode ser facilmente calculada pelo modelo de aproximação de dipolo desde que o tamanho das NPs seja menor que o comprimento de onda da luz. Considerando que a banda de ressonância de plasmons de superfície localizada esteja dentro da região visível do espectro eletromagnético ($\sim 450 - 720$ nm), a

condição de ressonância é geralmente alcançada para diâmetros de NPs abaixo de ~50 nm. Neste caso, pode ser considerado que a NP está dentro de um campo elétrico uniforme e a partícula pode ser representada por um dipolo elétrico. Assim, as nanopartículas metálicas apresentam propriedades ópticas diferenciadas quando o seu tamanho é reduzido [98].

São diversos os materiais que apresentam ressonância de plasmon de superfície localizada, porém nanoestruturas fabricadas com metais como Au, Ag e Cu apresentam a frequência LSPR na região do visível e infravermelho próximo, tornando-os mais atraentes para aplicações ópticas. As NPs metálicas a base de Au e Ag mostram absorções em diferentes regiões do espectro eletromagnético visível, tornando-as atraentes para serem utilizadas em sensores baseados em modificações de suas propriedades ópticas de acordo com a presença ou ausência do analito desejado. Os sensores que utilizam o fenômeno LSPR para obter uma informação biológica pela interação com uma superfície plasmônica modificada e a transforma em um sinal analítico.

A ressonância plasmon em AuNPs é variada pela mudança e distribuição de tamanho e forma das partículas [99]. Elas são adequadas para ancorar camadas ativas, pois são biocompatíveis com a ligação de biomoléculas [100], [101]. Imunossensores baseados em AuNPs conjugados com anticorpos são capazes de reconhecer antígenos, células, microrganismos e proteínas através de princípios variados de detecção [102].

Por muitas décadas, a espectroscopia Raman tem sido usada com sucesso no estudo de materiais de origem biológica [103],[104]. Este sucesso está relacionado, em parte, à enorme contribuição da espectroscopia Raman na elucidação de muitos caminhos biológicos em termos de estrutura molecular, avaliando informações de vibrações moleculares que fornecem uma impressão digital altamente específica de estruturas

moleculares e composição bioquímica de células e tecidos. Em geral, as patologias são acompanhadas por alterações em estruturas moleculares específicas e, conseqüentemente, em seus espectros vibracionais. Contudo, os sistemas biológicos são constituídos por muitas macromoléculas, de modo que o efeito Raman convencional pode ser um pouco desafiador pois geralmente apresentam centenas de átomos e, por isso, contém um enorme número de modos Raman vibracionais a serem resolvidas. Outras dificuldades apresentadas pela espectroscopia Raman convencional é a baixa seção de choque Raman (intensidade reduzida) e os efeitos de fluorescências, geralmente presentes nos materiais de origem biológica, que dificultam a obtenção dos espectros Raman. Nesse contexto, é conveniente usar o efeito SERS (do inglês *Surface-Enhanced Raman Scattering*), pois com ele pode-se obter fatores de intensificações que variam de $10^4 - 10^{12}$ vezes em comparação com o Raman convencional. Para que esta intensificação seja alcançada, nanopartículas, predominantemente de Au ou Ag, tem sido utilizadas devido ao efeito LSPR. Assim, o efeito SERS tem sido aplicado com sucesso no estudo de sistemas biológicos, como na rotulagem de células, tecidos e biomarcadores [105],[106] e na produção de biosensores [107].

Imunosensores baseados em AuNPs conjugados com anticorpos são capazes de reconhecer antígenos, proteínas e microrganismos [108]. A bioconjugação afeta tanto a região de absorção de luz quanto o diâmetro hidrodinâmico das AuNPs, permitindo assim ensaios colorimétricos e dispersão dinâmica de luz (DLS) [109]. Driskell *et al.*, [110], por exemplo, relataram o uso de DLS para detectar o vírus H1N1. Neste trabalho os autores usaram DLS para medir a extensão da agregação e o diâmetro hidrodinâmico médio os quais estavam correlacionados com a concentração de vírus.

Neste contexto, recentemente, estivemos envolvido em um projeto de pesquisa que teve como objetivo a produção de um detector do vírus SARS-CoV-2, usando AuNPs

funcionalizados com a anticorpo da glicoproteína spike do SARS-CoV-2 (anti-SARS-CoV-2), baseado na técnica DLS [95]. Neste trabalho, o anticorpo anti-SARS-CoV-2 spike foi funcionalizado na superfície de nanopartículas de Au após pré-recobrimento com 3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidyl propionate – DTSSP) (amostra denominada pAbS1N36@AuNPs). A detecção do vírus SARS-CoV-2 foi realizada por DLS, onde foi verificado que o diâmetro hidrodinâmico médio do sistema pAbS1N36@AuNPs aumenta de ~ 80 nm, quando livre, para mais de 200 nm após sua interação com o vírus SARS-CoV-2. Nosso objetivo neste trabalho é comprovar o sucesso da bioconjugação do anticorpo anti-SARS-CoV-2 com a AuNPs. Para isso foi utilizado as técnicas de FTIR, Raman convencional e SERS.

3.3.2 Metodologia

Amostras

O ácido bórico foi adquirido da VetecTM (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Nanopartículas de ouro (50 nm, ~ $3,5 \times 10^{10}$ partículas/mL), Albumina de Soro Bovina (BSA) e 3,3'-ditiobis (Propionato de Sulfosuccinimidil-DTSSP) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A solução de Tampão Fosfato-Salino (PBS) foi adquirida da Laborclin (Pinhais, PR, Brasil). O tetraborato de sódio foi obtido da Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil). O anticorpo policlonal contra o N-terminal da proteína spike do SARS-CoV-2 de coelhos foram doadas pelo Laboratório de Virologia e Microscopia da Universidade de Brasília, Brasil. Amostras dos vírus influenza e SARS-CoV-2 foram doadas pelo Instituto Butantan (São Paulo, Brasil).

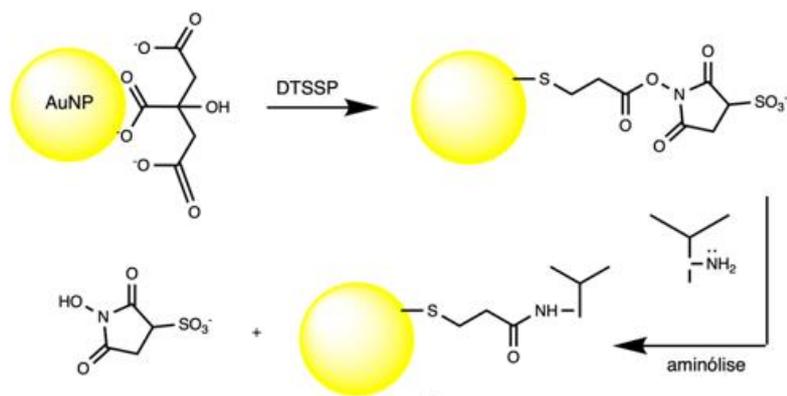


Figura 3.3.1: Funcionalização das AuNPs com DTSSP seguida da formação da ligação cruzada do anticorpo.

Na Fig. 3.3.1 é mostrado um esquema da funcionalização da AuNP com o DTSSP e anticorpo. Onde no esquema da Fig. 3.3.1, a hidrólise do éster succinimidil é mais rápida que a aminólise. Caso ocorra a hidrólise antes da aminólise, as nanopartículas de ouro ficariam negativamente carregadas e interagiriam com o anticorpo por atração eletrostática ao invés de ligação covalente [111]. Para evitar este problema, o DTSSP pode ser ligado ao anticorpo e, em seguida, adicionado à suspensão das nanopartículas de ouro. Driskeel *et al.*, mostraram que é possível ligar o DTSSP ao anticorpo IgG e em seguida, acoplá-lo à AuNPs levando à formação de um conjugado estável independente [112].

Para a produção do sistema final funcionalizado com o anticorpo, uma alíquota de 1,2 mL de suspensão de AuNPs teve seu pH ajustado para 8,9 em tampão borato (50 mM, pH 8,9). Em seguida, 10 µL de 3,3'-ditiobis (propionato de sulfossuccinimidil – DTSSP) (10 mM) foi adicionado à suspensão de AuNPs e incubadas a temperatura ambiente sob proteção da luz por 40 minutos. Essa suspensão foi transferida para um tubo Lobind® Eppendorf de 2mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e centrifugada a 7.000 rpm por 5 minutos a 5 °C. O sobrenadante contendo o excesso de DTSSP foi removido e as AuNPs foram ressuspensas em 1100 µL de tampão borato (2 mM, pH 8,9) contendo 0,25 % de

BSA. Em seguida, o anticorpo policlonal (21,6 μg , 32,4 μg ou 43,2 μg) foi adicionado à suspensão de AuNPs e incubado à temperatura ambiente por 90 min. Após este tempo, a suspensão foi centrifugada a 7000 rpm por 5 min a 5 °C. O sobrenadante contendo excesso de anticorpo foi removido. Para remoção completa do anticorpo, o processo de centrifugação/ressuspensão foi repetido mais de duas vezes. A amostra 43,2 μg foi nomeada pAbS1N36@AuNPs. Uma micrografia de microscopia eletrônica de transmissão, típica do sistema pAbS1N36@AuNPs é mostrado na Fig. 3.3.2.

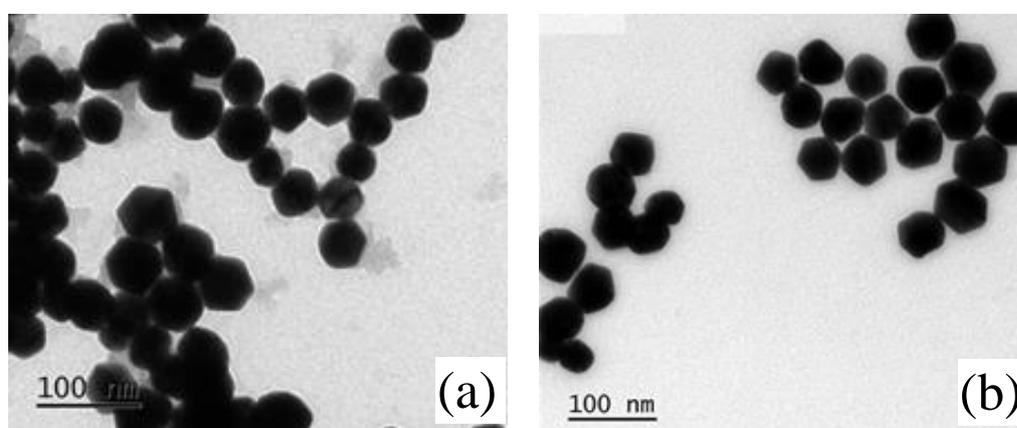


Figura 3.3.2: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de Au (AuNPs) (a) e das AuNPs conjugadas com anti-SARS-CoV-2 spike (pAbS1N36@AuNPs) (b) (figura adaptada da referência [95]).

Espectroscopias no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Raman convencional e SERS

Os experimentos de FTIR foram realizados utilizando um espectrômetro Bruker (modelo Vertex 70). A análise foi realizada utilizando o módulo de Reflectância Total Atenuada (ATR). As medições foram calculadas em 96 varreduras, que foram feitas com uma resolução de 4 cm^{-1} e região espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

A conjugação de anticorpos na superfície das AuNPs foi avaliada por SERS. Os filmes de prata utilizados como substrato para as medidas de SERS foram preparados pelo método eletrolítico, utilizando uma solução de AgNO_3 (0,1 mg/mL) como eletrólito. Para estudos SERS, uma solução de 10 μL de BSA, anticorpo pAbS1N, DTSSP@AuNPs e pAbS1N36@AuNPs amostras foram diluídas em 10 μL de água destilada e gotejadas no filme de prata, depois secas com nitrogênio seco.

As análises SERS foram realizadas utilizando LabRAM HR Evolution (Horiba Scientific, Palaiseau, França) equipado com grade de 1800 linhas/mm e detector *Charge-Coupled Device-CCD*. As medições foram realizadas com uma fonte de excitação de laser de 532 nm (10 mW) usando um sistema de imagem DuoScan Raman (Horiba Scientific) com uma objetiva de 50X. O DuoScan foi utilizado para distribuir o feixe de laser na superfície da amostra obtendo uma informação espectral média de uma série de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$.

A análise de dados foi realizada usando o LabSpec[®] para correção da linha de base e normalização pela intensidade da banda. Para plotagem dos dados foi utilizado o OriginPro[®] 9 e o fitting das razões das bandas foram realizadas no Peakfit[®]. Todas as medidas experimentais foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica-LEO do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

3.3.3 Resultados e discussões

A Fig. 3.3.3 mostra os espectros FTIR do anticorpo anti-SARS-CoV-2 spike antes (pAbS1N) (i) e após a conjugação às AuNPs (pAbS1N36@AuNPs) (ii). Para comparação o espectro de FTIR das AuNPs livre é mostrado em (iii). O espectro mostrado em (iii) fornece informações sobre as AuNPs cobertas com citrato. A adsorção do citrato nas

AuNPs é confirmada pela presença dos modos vibracionais do carboxilato, com bandas de absorção em 1400 e 1630 cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, aos modos de estiramento simétrico e assimétrico das ligações COO^- . O espectro FTIR do anti-SARS-CoV-2 livre (Fig. 3.3.3 (i)) mostra a presença das bandas de amida I, II e III em 1644, 1540 e 1239 cm^{-1} , respectivamente. As bandas observadas em torno de 1400 e 1451 cm^{-1} estão associados ao estiramento simétrico do grupo COO^- e vibração em tesoura CH_2 , respectivamente. A banda em 1080 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das ligações C-O-C e C-O . A região de impressão digital entre 500 e 900 cm^{-1} compreende às vibrações associadas aos aminoácidos, ou seja, fenilalanina, tirosina, triptofano etc. [113]. A Fig. 3.3.3 (ii) mostra o espectro FTIR do anticorpo conjugado com a AuNPs (pAbS1N36@AuNPs), com bandas em 1654, 1543 e 1243 cm^{-1} correspondente às bandas amida I, II e III, respectivamente. Observe que, a posição da banda amida I, II e III associadas ao anticorpo livre deslocam-se para números de ondas mais alto após suas funcionalizações com as AuNPs. Além do mais, também foi observado que a razão entre as intensidades integradas das bandas amida I e II é aproximadamente de 1,95 para anticorpo livre e decresce para 1,0 após sua funcionalização com as AuNPs. Este resultado sugere que funcionalização leva a mudanças conformacionais do anticorpo após funcionalização. A partir dos dados de FTIR infere-se que os efeitos dos grupos NH_2 , doadores de elétrons, bem como dos íons carboxilato, são responsáveis pelo acoplamento do anticorpo ao terminal éster succinimidil, formando uma ligação amida secundária pelo ataque nucleofílico da amina ao carbono carbonílico do éster [114].

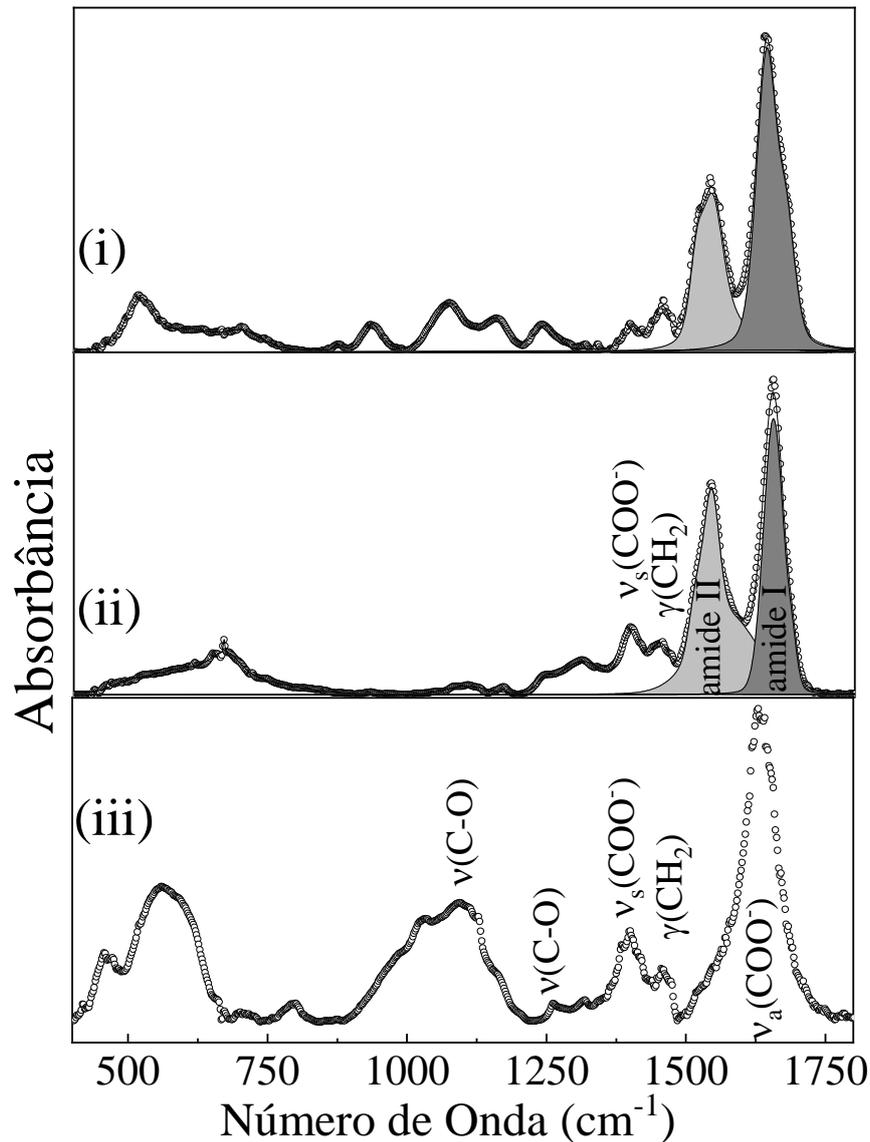


Figura 3.3.3: Espectro FTIR para amostras de pAbS1N (i), pAbS1N36@AuNPs (ii) e AuNPs (iii).

Com objetivo de avaliar a eficiência da funcionalização do anticorpo anti-SARS-CoV-2 com as AuNPs, a espectroscopia Raman convencional e efeito SERS foram utilizados. Estas ferramentas permitiram rastrear a bioconjugação da superfície das nanopartículas de ouro desde o pré-revestimento até a funcionalização do anticorpo.

Primeiramente, os espectros Raman e SERS de DTSSP livre e adsorvido na superfície das AuNPs foram obtidos e comparados. O espectro Raman convencional do

DTSSP livre (Fig. 3.3.4 (ii)) mostra bandas características do anel pirrolidina com picos em 665 cm^{-1} (modo de deformação simétrico do pirrol), 780 cm^{-1} (modo de respiração pirrol) e 1364 cm^{-1} (estiramento da ligação $C-N$ do anel pirrol) e 1397 cm^{-1} atribuído à vibrações de estiramento do anel pirrólico. Além do mais, os picos Raman em 1065 , 1160 e 1210 cm^{-1} podem ser atribuídos aos modos de estiramento de $\nu(NCO)$, $\nu(CO)$ e $\nu_s(CNC)$, respectivamente [115],[116]. Vibrações envolvendo átomos enxofre são observadas em 942 cm^{-1} , devido ao modo de flexão da ligação SH e em 615 , 640 e 670 cm^{-1} associados aos modos de estiramento das ligações CS . Os modos de estiramento da ligações $S-S$ são encontrados em 490 , 508 e 520 cm^{-1} [117], [118]. Finalmente, o pico observado em 1748 e 1790 cm^{-1} indica os modos de estiramento assimétrico e simétrico dos grupos éster carbonil, respectivamente. O pico em 1820 cm^{-1} indica o alongamento da ligação $C=O$ do pirrol [119], [120].

O espectro SERS da amostra DTSSP@AuNPs Fig. 3.3.4 (i) mostra significantes mudanças quando comparado com o espectro Raman convencional do DTSSP livre (Fig. 3.3.4 (ii)). Devido ao efeito SERS, muitas bandas adicionais são agora perceptíveis. Por exemplo, os modos de estiramento simétrico e assimétrico das ligações $S=O$ são encontrados em 1190 e 1335 cm^{-1} , respectivamente. Por fim, as vibrações das ligações CH podem ser encontradas em 860 cm^{-1} ($\gamma(CH)$) e 1100 cm^{-1} ($\delta(CH)$) e, os modos vibracionais $\nu_s(COO^-)$ e $\nu_{as}(COO^-)$ são encontrados em 1420 e 1690 cm^{-1} , respectivamente. No entanto, a característica mais apreciável é o *redshift* do modo $\nu(C-S)$ e a extinção dos modos vibracionais do dissulfeto (região $490-520\text{ cm}^{-1}$). Este comportamento indica que as ligações dissulfeto foram quebradas e que o DTSSP foi absorvido com sucesso na superfície da nanopartícula de ouro. Todos os picos e as respectivas atribuições das amostras DTSSP, DTSSP@AuNPs, BSA, pAbS1N e pAbS1N@AuNPs são expostas na Tabela 3.3.

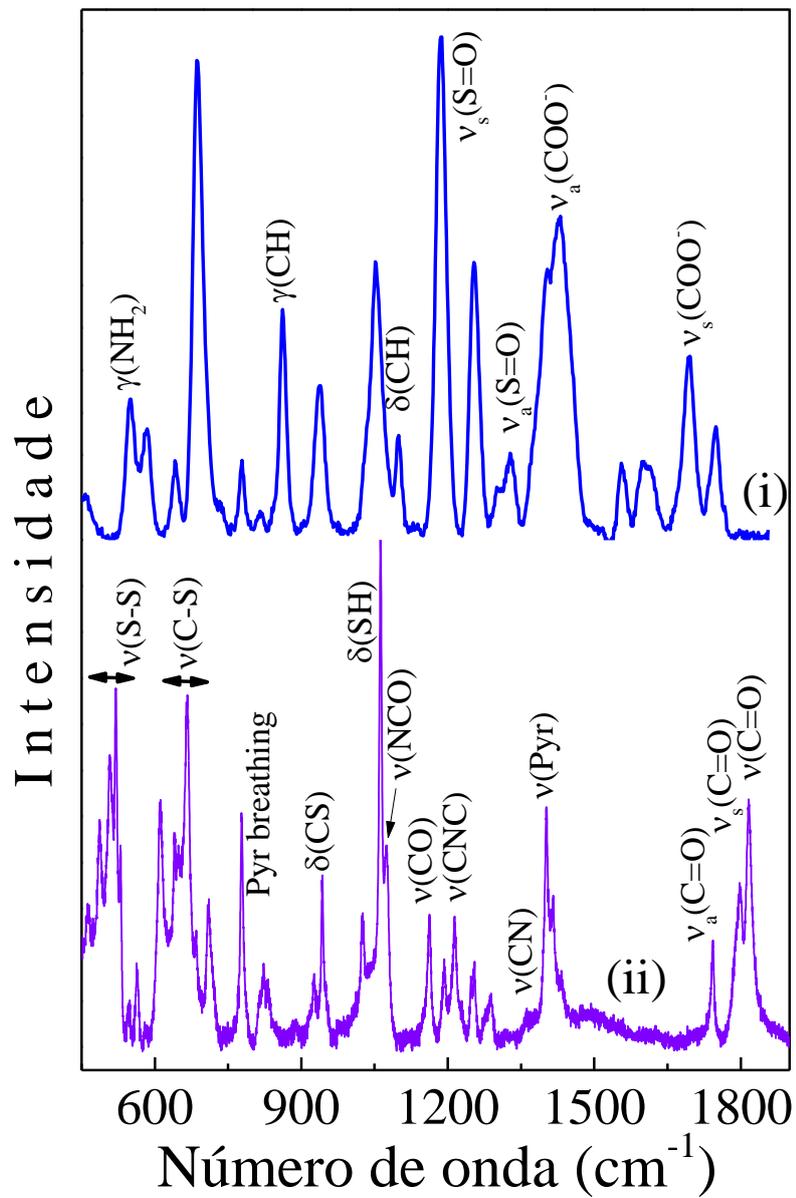


Figura 3.3.4: Espectro SERS (i) e espectro Raman convencional (ii) para DTSSP@AuNPs e DTSSP em pó, respectivamente.

Tabela 3. 3: Bandas SERS observadas nos espectros registrados das amostras DTSSP, DTSSP@AuNPs, BSA, pAbS1N e pAbS1N@AuNPs e as tentativas de atribuições.

Raman (cm ⁻¹)	SERS (cm ⁻¹)				Tentativa de atribuição	
	DTSSP	DTSSP@AuNPs	BSA	pAbS1N		pAbS1N@AuNPs
486					$\nu(S-S)_{ggg}$	
508				512	$\nu(S-S)_{tgg}$	
520		540	550	550	526	$\nu(S-S)_{tgt}$
		550				$\gamma(NH_2)$
610		630	625	625	620	$\nu(C-S)$
640		640				<i>pyr deform</i>
648			652	652		$\nu(C-S)$
				-	652	$\gamma(COO^-)$
666		686	678	682		$\nu(C-S)-H$
			756	757	750	Trp
780		780				<i>Pyr breathing</i>
		796				$\chi(CH), \delta(NH)$
		828	828	828	828	Tyr
		858	851	852	852	Tyr
		887	890	890	890	Tyr
		895	890	890	890	Trp
		917			917	$\nu(C-COO^-)$
942		940				$\delta(SH)$
		950	950	950	950	$\nu(C-N-C)$ skel
		1002	1002	1003	1003	Phe
1025		1030	1030	1030	1033	$\nu(C-C)$
1065		1052				$\nu(NCO)$
		1070	1073	1078	1078	$\chi(NH_2)$
		1127	1125	1126	1126	$\nu(C-N)$
		1180	1178	1178	1178	Tyr, $\nu(C-N)$
		1190				$\nu_s(S=O)$
		1203	1203	1212	1212	Tyr, Phe
		1245	1242	1242	1242	amida III
		1279		1286	1286	$\nu(C-O)+\delta(OH)$
		1325		1325	1325	$\delta(CH_2, CH_3)$
		1335				$\nu_a(S=O)$
		1342	1340	1338	1338	$\chi(CH_2, CH_3), Trp$
1402		1402				$\nu(CN)$ <i>pyr ring</i>
1415						$\nu(pyr\ ring)$
		1450	1450	1456	1456	$\delta(CH_2, CH_3)$
		1460	1460	1460	1460	$\gamma(CH_2, CH_3)$
		1420	1502	1505	1505	$\nu_s(COO^-)$
		1567	1565	1565	1565	Amida II
		1690	1584	1590	1584	$\nu_{as}(COO^-)$
		1615	1610	1610	1610	Amida I
				1640	1640	$\nu(C=O)$
		1694				$\nu_a(COO^-)$
1743		1750				$\nu_s(C=O)$
1795						$\nu_a(C=O)$
1815						$\nu(C=O)$ <i>pyr</i>

A Fig. 3.3.5 (a-i) mostra os espectros de SERS do anticorpo pAbS1N bioconjugado de com a AuNPs (pAbS1N36@AuNPs). Para comparação, os espectros SERS do anticorpo pAbS1N e o BSA são mostrados na Fig. 3.3.5 (a - ii e iii). No espectro SERS da amostra pAbS1N36@AuNPs, como esperado, nenhuma banda de DTSSP foi identificada. O espectro SERS da amostra pAbS1N36@AuNPs é semelhante aos espectros SERS do anticorpo pAbS1N e BSA, com bandas associadas aos aminoácidos que compõe o anticorpo pAbS1N e o BSA, ambos bioconjugados a nanopartículas de ouro.

No espectro da amostra pAbS1N36@AuNPs existem bandas características do modo de estiramento *S-S* (550 cm^{-1}) e *C-S* ($620, 650$ e 680 cm^{-1}) [121]. Na região entre $750\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ existem modos vibracionais associados a ligação peptídicas, entre outros: alongamento da ligação *N-H* do triptofano em 750 cm^{-1} , da tirosina em 830 e 890 cm^{-1} e da fenilalanina em 1002 cm^{-1} [122]. Os modos encontrados em $850, 915, 950, 1032, 1126$ e 1178 cm^{-1} são atribuições das respectivas ligações: *Tyr*, $\nu(C - COO^-)$, $\nu(C-N-C)$, $\nu(C - C)$, $\nu(C-N)$, *C-N* ou *Tyr*. Além do mais, os modos de tesoura do grupo amina NH_2 , deformações dos grupos CH_2/CH_3 e estiramento simétrica e assimétrica dos grupos carboxilato COO^- são encontrados em $1078, 1325, 1358, 456, 1505$ e 1584 cm^{-1} , respectivamente [123]. A banda associada à amida II (*NH* acoplado ao alongamento *CN*) pode ser encontrado em 1565 cm^{-1} . As bandas associadas às amidas I, II e III são encontradas em $1610, 1565$ e 1242 cm^{-1} , coincidindo com os valores encontrados para o anticorpo pAbS1N Fig. 3.3.5 (a - ii). Essas energias vibracionais são típicas da estrutura β -sheet, confirmando que o anticorpo se organiza nesta estrutura [124]. Por outro lado, no espectro SERS do BSA, as mesmas bandas são encontradas em $1615, 1567$ e 1245 cm^{-1} . É bem conhecido que o BSA tem uma estrutura rica em α -helix, que possuem vibrações

mais altas do que o tipo β -sheet [125]. Assim, é possível inferir que a intensidade do sinal Raman dominante no espectro da amostra pAbS1N36@AuNPs deve-se principalmente ao sinal proveniente do anticorpo.

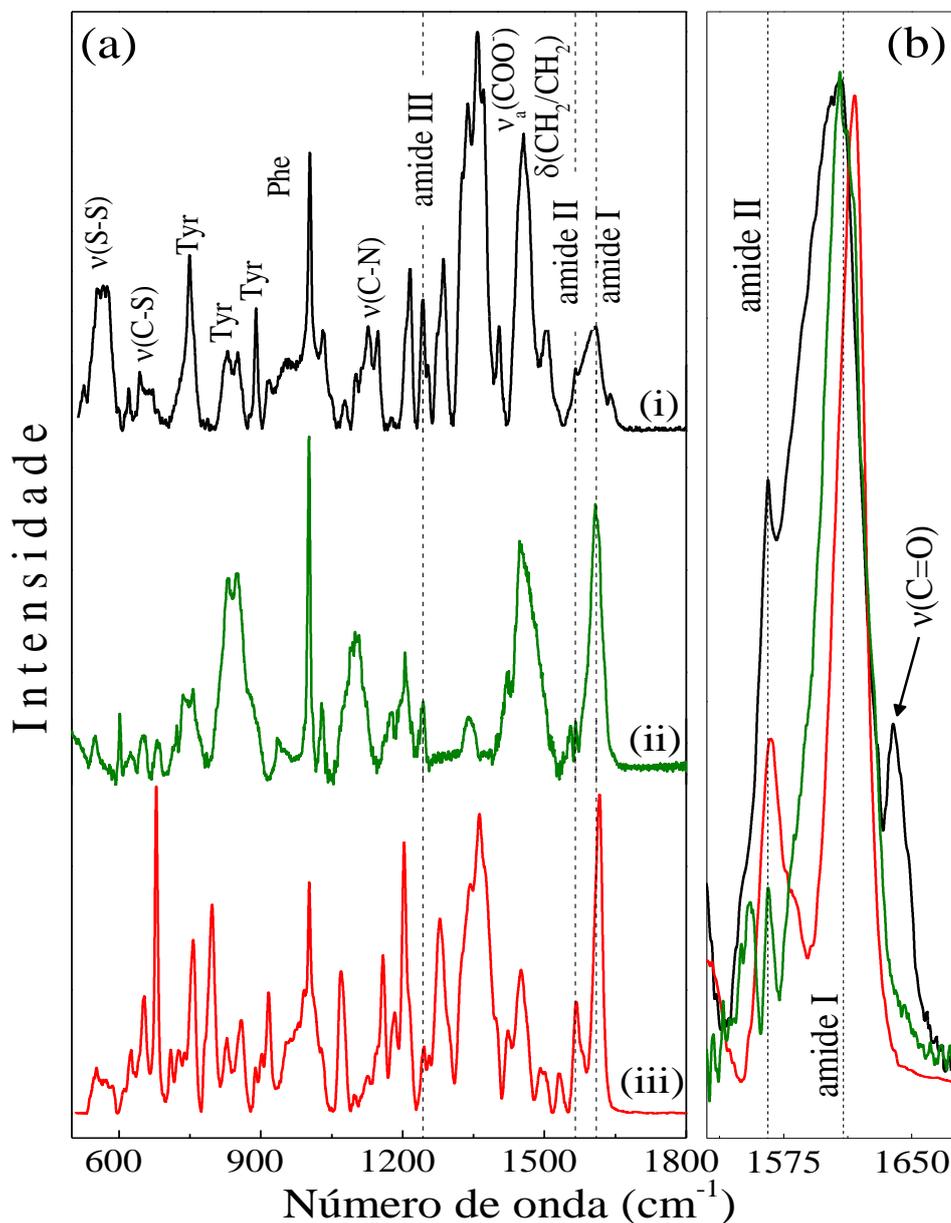


Figura 3.3.5: (a) Espectros SERS de AbS1N36@AuNPs (i), pAbS1N (ii) e BSA (iii). (b) Zoom de espectros SERS na faixa 1530-1680 cm^{-1} para pAbS1N36@AuNPs (linha preta), pAbS1N (linha verde) e BSA (linha vermelha).

Outro fato importante a ser observado no espectro SERS da amostra pAbS1N36@AuNPs é a presença do pico Raman em 1640 cm^{-1} , mas ausente no espectro de anticorpo livre, assim como no espectro BSA. Este pico pode ser atribuído ao alongamento $C=O$ de uma amida secundária. Assim, pode-se concluir que a presença deste pico se deve à vibração de um grupo carbonila formado após a conjugação da nanopartículas de ouro com o anticorpo [126], comprovando assim o sucesso da conjugação.

3.3.4 Conclusão

Nesta parte do trabalho foi investigado a bioconjugação do anticorpo anti- SARS-CoV-2 sobre nanopartículas de ouro. Para isso foram utilizados espectros de absorção de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman convencional e SERS. Análises comparativas e detalhada por dos espectros de FTIR permitiram determinar que as energias de absorção das bandas amida I, II e III associados com anticorpo livre (pAbS1N) deslocam-se para maiores número de onda após sua funcionalização com as AuNPs (pAbS1N36@AuNPs). Também foi observado que a razão entre as intensidades integradas das bandas de amida I e II é de $\sim 1,95$ para anticorpo livre e decresce para $\sim 1,0$ após sua funcionalização com as AuNPs. Sugerindo haver mudanças conformacionais do anticorpo após funcionalização. Os dados de FTIR indicam que o efeito doador de elétrons do grupo NH_2 são responsáveis por acoplar o anticorpo ao terminal éster succinimidil formando uma ligação amida secundária.

Complementar ao FTIR, a técnica SERS foi usado para avaliar a eficiência da ligação do anticorpo com a nanopartícula de Au. Os espectros de Raman convencional e SERS permitiram rastrear a bioconjugação do anticorpo anti- SARS-CoV-2 sobre a

superfície das nanopartículas de Au desde o primeiro pré-revestimento com o DTSSP até o anticorpo. Os dados mostraram que os grupos aminas primárias do anticorpo estão ligadas covalentemente ao grupo éster succinimidil terminal, formando uma ligação amida secundária pelo ataque nucleofílico da amina ao carbono da carbonila do éster presente na superfície da nanopartícula de Au.

Capítulo 4

4 Conclusões gerais

Nesta tese as técnicas de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman convencional e Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS) foram utilizadas para estudar nanocarreadores baseados em nanopartículas lipídicas e metálicas carregados com moléculas bioativas. Os nanocarreadores foram: (i) Nanoemulsões de óleo de peixe, ricos em Ácido Docosaheptaenoico (DHA) e Ácido Eicosapentaenoico (EPA) (denominada NEW3), (ii) Nanopartículas lipídicas solidas carregadas com diferentes concentrações do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ (denominada NLS@[Fe(phen)₃]²⁺, (iii) nanopartículas de Au funcionalizadas com o anticorpo anti-SARS-CoV-2 (denominada pAbS1N36@AuNPs). No estudo da amostra NEW3 foi investigado o efeito do tempo de prepara no seu estado oxidativo. Verificou-se que embora apresente estabilidade estrutural ao longo de tempo de preparo (diâmetro hidrodinâmico aproximadamente constante), os espectros de FTIR permitiram identificar mudanças espectrais dos marcadores químicos do FO, os quais foram associados a processos oxidativos dependentes do tempo de prepara. As mudanças espectrais ocorridas nos modos de estiramento *O-H*, *C=O* e *C=C* permitiram concluir que o processo de oxidação se inicia com a isomerização das ligações duplas *cis* para

dupla *trans*, o que favorece a hidroperoxidação das cadeias de hidrocarbonetos levando a geração de subprodutos derivados da carbonila, tais como: ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos e ésteres

No segundo caso, foi estudado a interação entre o complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ e nanopartículas lipídicas sólidas. Comparando os espectros de FTIR e Raman dos constituintes das amostras NLS@[$Fe(phen)_3$] $^{2+}$ foi possível sugerir que as moléculas do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$ estão interagindo com as nanopartículas lipídicas por meio de uma ligação quelante bidentada entre o grupo carboxilato do oleato de sódio e o íon de Fe^{2+} do complexo $[Fe(phen)_3]^{2+}$. Por último, os resultados obtidos da análise dos espectros SERS demonstraram que as nanopartículas de Au, pré-cobertas com 3,3'-dithiobis (sulfosuccinimidyl propionate – DTSSP) foram funcionalizadas com sucesso ao anticorpo anti-SARS-CoV-2 spike.

A conjugação do anticorpo com a molécula de DTSSP modificada, foi comprovada por meio das alterações espectrais dos modos vibracionais do DTSSP e, pelo surgimento do modo de estiramento associado a ligação $C=O$ no espectro da amostra pAbS1N36@AuNPs. Estas mudanças estão associadas aos grupos de amins primárias do anticorpo os quais estão ligadas covalentemente ao grupo éster succinimidil terminal, formando uma ligação amida secundária pelo ataque nucleofílico da amina ao carbono da carbonila do éster presente na superfície da nanopartícula de Au.

Perspectivas de trabalhos futuros

Desenvolver metodologia baseado em espectroscopia vibracional para quantificar a concentração de moléculas adsorvidas em nanocarreadores lipídicos e metálicos.

Utilizar a espectroscopia FTIR, Raman convencional e SERS no estudo de diferentes complexos metálicos (Cu, Ru, Pd e Zn) em NLS.

Referências

- [1] M. Sahoo, S. Vishwakarma, C. Panigrahi, and J. Kumar, “Nanotechnology: Current applications and future scope in food,” *Food Frontiers*, vol. 2, no. 1. John Wiley and Sons Inc, pp. 3–22, Mar. 01, 2021. doi: 10.1002/fft2.58.
- [2] P. S. Aithal, “A Monthly Double-Blind Peer Reviewed Refereed Open Access International e-Journal-Included in the International Serial Directories Nanotechnology Innovations & Business Opportunities : A Review,” vol. 6, no. 1, [Online]. Available: <https://ssrn.com/abstract=2779151>
- [3] S. S. Mukhopadhyay, “Nanotechnology in agriculture: Prospects and constraints,” *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. 7, no. 2. Dove Medical Press Ltd, pp. 63–71, Aug. 04, 2014. doi: 10.2147/NSA.S39409.
- [4] N. Mitter and K. Hussey, “Moving policy and regulation forward for nanotechnology applications in agriculture,” *Nature Nanotechnology*, vol. 14, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 508–510, Jun. 01, 2019. doi: 10.1038/s41565-019-0464-4.
- [5] O. C. Farokhzad and R. Langer, “Impact of nanotechnology on drug delivery,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, pp. 16–20, Jan. 2009, doi: 10.1021/nn900002m.
- [6] A. Ali *et al.*, “Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications,” *Front Chem*, vol. 9, no. July, pp. 1–25, 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.629054.
- [7] M. Prasad *et al.*, “Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 97, no. August 2017, pp. 1521–1537, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.026.
- [8] Í. Oliveira Szlachetka Orientador and S. William da Silva, “Estudo das interações entre moléculas bioativas e sistemas nanoestruturados por meio da espectroscopia vibracional.”
- [9] C. R. Garcia *et al.*, “Nanoemulsion delivery systems for enhanced efficacy of antimicrobials and essential oils,” *Biomaterials Science*, vol. 10, no. 3. Royal Society of Chemistry, pp. 633–653, Feb. 07, 2022. doi: 10.1039/d1bm01537k.
- [10] Y. Tian, L. Zhang, and L. Wang, “DNA-Functionalized Plasmonic Nanomaterials for Optical Biosensing,” *Biotechnology Journal*, vol. 15, no. 1. Wiley-VCH Verlag, Jan. 01, 2020. doi: 10.1002/biot.201800741.
- [11] N. M. Aljabri, N. Shi, and A. Cavazos, “Nanoemulsion: An emerging technology for oilfield applications between limitations and potentials,” *Journal of Petroleum Science and Engineering*, vol. 208. Elsevier B.V., Jan. 01, 2022. doi: 10.1016/j.petrol.2021.109306.
- [12] S. Moghassemi, A. Dadashzadeh, R. B. Azevedo, and C. A. Amorim, “Nanoemulsion applications in photodynamic therapy,” *Journal of Controlled*

- Release*, vol. 351. Elsevier B.V., pp. 164–173, Nov. 01, 2022. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.09.035.
- [13] W. Mehnert and K. Mäder, “Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 83–101, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.021.
- [14] L. A. Dykman and V. A. Bogatyrev, “Gold nanoparticles: preparation, functionalisation and applications in biochemistry and immunochemistry,” *Russian Chemical Reviews*, vol. 76, no. 2, pp. 181–194, Feb. 2007, doi: 10.1070/rc2007v076n02abeh003673.
- [15] G. Guzzinati, A. Béché, H. Lourenço-Martins, J. Martin, M. Kociak, and J. Verbeeck, “Probing the symmetry of the potential of localized surface plasmon resonances with phase-shaped electron beams,” *Nat Commun*, vol. 8, Apr. 2017, doi: 10.1038/ncomms14999.
- [16] X. Liu *et al.*, “A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering,” *J Am Chem Soc*, vol. 130, no. 9, pp. 2780–2782, Mar. 2008, doi: 10.1021/ja711298b.
- [17] M. E. Stewart *et al.*, “Nanostructured plasmonic sensors,” *Chemical Reviews*, vol. 108, no. 2, pp. 494–521, Feb. 2008. doi: 10.1021/cr068126n.
- [18] S. Gupta, S. Huda, P. K. Kilpatrick, and O. D. Velev, “Characterization and optimization of gold nanoparticle-based silver-enhanced immunoassays,” *Anal Chem*, vol. 79, no. 10, pp. 3810–3820, May 2007, doi: 10.1021/ac062341m.
- [19] Geoffrey. Laskin, Allen. Sarialani, Sima. Gadd, *Advances in applied microbiology*. doi: 10.1016/S0065-2164(07)00004-4.
- [20] S. S. Shankar, A. Ahmad, R. Pasricha, and M. Sastry, “Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes,” *J Mater Chem*, vol. 13, no. 7, pp. 1822–1826, 2003, doi: 10.1039/b303808b.
- [21] Qurat-ul-Ain, K. M. Zia, F. Zia, M. Ali, S. Rehman, and M. Zuber, “Lipid functionalized biopolymers: A review,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 93. Elsevier B.V., pp. 1057–1068, Dec. 01, 2016. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.071.
- [22] “Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry Seventh Edition.”
- [23] M. Ndiaye, A. Arhaliass, J. Legrand, G. Roelens, and A. Kerihuel, “Reuse of waste animal fat in biodiesel: Biorefining heavily-degraded contaminant-rich waste animal fat and formulation as diesel fuel additive,” *Renew Energy*, vol. 145, pp. 1073–1079, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.renene.2019.06.030.
- [24] W. Tsuzuki, R. Nagata, R. Yunoki, M. Nakajima, and T. Nagata, “cis/trans-Isomerisation of triolein, trilinolein and trilinolenin induced by heat treatment,” *Food Chem*, vol. 108, no. 1, pp. 75–80, May 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.10.047.

- [25] C. Chatgialiloglu, C. Ferreri, M. Melchiorre, A. Sansone, and A. Torreggiani, "Lipid geometrical isomerism: From chemistry to biology and diagnostics," *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 1, pp. 255–284, Jan. 08, 2014. doi: 10.1021/cr4002287.
- [26] N. David, *Principles of Biochemistry, Fourth Edition*, vol. 4, 2008, p. 1120.
- [27] H. M. Alvarez and A. Steinbüchel, "Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 60, no. 4, Springer Verlag, pp. 367–376, Dec. 01, 2002. doi: 10.1007/s00253-002-1135-0.
- [28] C. Akita, T. Kawaguchi, and F. Kaneko, "Structural study on polymorphism of cis-unsaturated triacylglycerol: Triolein," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 9, pp. 4346–4353, Mar. 2006, doi: 10.1021/jp054996h.
- [29] R. Rodriguez-Sanchez, A. Tres, R. Sala, F. Guardiola, and A. C. Barroeta, "Evolution of lipid classes and fatty acid digestibility along the gastrointestinal tract of broiler chickens fed different fat sources at different ages," *Poult Sci*, vol. 98, no. 3, pp. 1341–1353, Mar. 2019, doi: 10.3382/ps/pey458.
- [30] C. Körner and F. Fröhlich, "Compartmentation and functions of sphingolipids," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 74, Elsevier Ltd, pp. 104–111, Feb. 01, 2022. doi: 10.1016/j.ceb.2022.01.006.
- [31] S. Malagarie-Cazenave *et al.*, "Sphingolipid signalling: Molecular basis and role in TNF- α -induced cell death," *Expert Rev Mol Med*, vol. 4, no. 28, pp. 1–15, 2002, doi: 10.1017/S146239940200546X.
- [32] O. Shadyro, S. Samovich, and I. Edimecheva, "Free-radical and biochemical reactions involving polar part of glycerophospholipids," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 144, Elsevier Inc., pp. 6–15, Nov. 20, 2019. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.033.
- [33] G. E. MacDonald, R. R. Lada, C. D. Caldwell, C. Udenigwe, and M. T. MacDonald, "Potential Roles of Fatty Acids and Lipids in Postharvest Needle Abscission Physiology," *Am J Plant Sci*, vol. 10, no. 06, pp. 1069–1089, 2019, doi: 10.4236/ajps.2019.106078.
- [34] T. Ghorbanzade, S. M. Jafari, S. Akhavan, and R. Hadavi, "Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt," *Food Chem*, vol. 216, pp. 146–152, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.022.
- [35] D. S. Santos *et al.*, "Oral delivery of fish oil in oil-in-water nanoemulsion: Development, colloidal stability and modulatory effect on in vivo inflammatory induction in mice," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 133, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110980.
- [36] E. N. Frankel, T. Satué-Gracia, A. S. Meyer, and J. B. German, "Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions," *J Agric Food Chem*, vol. 50, no. 7, pp. 2094–2099, Mar. 2002, doi: 10.1021/jf0111458.

- [37] A. Ismail, G. Bannenberg, H. B. Rice, E. Schutt, and D. Mackay, "Oxidation in EPA- and DHA-rich oils: An overview," *Lipid Technol*, vol. 28, no. 3–4, pp. 55–59, Apr. 2016, doi: 10.1002/lite.201600013.
- [38] N. H. C. Marzuki, R. A. Wahab, and M. A. Hamid, "An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceutical applications," *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 33, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 779–797, 2019. doi: 10.1080/13102818.2019.1620124.
- [39] P. Kour *et al.*, "Effect of nanoemulsion-loaded hybrid biopolymeric hydrogel beads on the release kinetics, antioxidant potential and antibacterial activity of encapsulated curcumin," *Food Chem*, vol. 376, May 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131925.
- [40] Y. Singh *et al.*, "Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 252. Elsevier B.V., pp. 28–49, Apr. 28, 2017. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.
- [41] L. Sagalowicz and M. E. Leser, "Delivery systems for liquid food products," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 15, no. 1–2, pp. 61–72, 2010, doi: 10.1016/j.cocis.2009.12.003.
- [42] D. Lombardo, P. Calandra, L. Pasqua, and S. Magazù, "Self-assembly of organic nanomaterials and biomaterials: The bottom-up approach for functional nanostructures formation and advanced applications," *Materials*, vol. 13, no. 5, Mar. 2020, doi: 10.3390/ma13051048.
- [43] M. Kumar, R. S. Bishnoi, A. K. Shukla, and C. P. Jain, "Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review," *Preventive Nutrition and Food Science*, vol. 24, no. 3. Korean Society of Food Science and Nutrition, pp. 225–234, 2019. doi: 10.3746/pnf.2019.24.3.225.
- [44] J. T. ROSEN, Milton J.; KUNJAPPU, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 4^a. 2012. [Online]. Available: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=pdTsgREZp5QC&oi=fnd&pg=PR15&dq=ROSEN,+Milton+J.%3B+KUNJAPPU,+Joy+T.+Surfactants+and+interfacial+phenomena.+John+Wiley+%26+Sons,+2012&ots=-89AWjwXkN&sig=ya5C8UJn8Ceh5GHE8cqbzTm2NTw#v=onepage&q=ROSEN%2C+Milton>
- [45] S. P. Callender, J. A. Mathews, K. Kobernyk, and S. D. Wettig, "Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery," *Int J Pharm*, vol. 526, no. 1–2, pp. 425–442, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.005.
- [46] C. (Garcia, C. R.); M. M. (Malik, M. H.); B. S. (Biswas, S. T. V. (Tam, V. H.); R. K. (Rumbaugh, K. P.); L. W. (Li, W. L. X. (Liu, X. Garcia, "Nanoemulsion delivery systems for enhanced efficacy of antimicrobials and essential oils," *Biomater Sci*, vol. 10, pp. 633–653, Dec. 2022.

- [47] M. Jaiswal, R. Dudhe, and P. K. Sharma, "Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system," *3 Biotech*, vol. 5, no. 2. Springer Verlag, pp. 123–127, Apr. 01, 2015. doi: 10.1007/s13205-014-0214-0.
- [48] S. G. Rainer H. MuÈller, Karsten MaÈder, "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 50, no. 2314, pp. 161–177, 2000, doi: 10.1016/S0939-6411(00)00087-4.
- [49] H. Bunjes, F. Steiniger, and W. Richter, "Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications," *Langmuir*, vol. 23, no. 7, pp. 4005–4011, 2007, doi: 10.1021/la062904p.
- [50] V. Mishra *et al.*, "Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4. MDPI AG, Dec. 01, 2018. doi: 10.3390/pharmaceutics10040191.
- [51] M. Koroleva, I. Portnaya, E. Mischenko, I. Abutbul-Ionita, L. Kolik-Shmuel, and D. Danino, "Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability," *J Colloid Interface Sci*, vol. 610, pp. 61–69, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.jcis.2021.12.010.
- [52] L. Salvia-Trujillo, M. Artiga-Artigas, A. Molet-Rodríguez, A. Turmo-Ibarz, and O. Martín-Belloso, "Emulsion-Based Nanostructures for the Delivery of Active Ingredients in Foods," *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 2. Frontiers Media S.A., Nov. 26, 2018. doi: 10.3389/fsufs.2018.00079.
- [53] B. Narayan, K. Miyashita, and M. Hosakawa, "Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) - A review," *Food Reviews International*, vol. 22, no. 3, pp. 291–307, Sep. 2006, doi: 10.1080/87559120600694622.
- [54] C. J. Barrow, C. Nolan, and Y. Jin, "Stabilization of highly unsaturated fatty acids and delivery into foods," *Lipid Technol*, vol. 19, no. 5, pp. 108–111, May 2007, doi: 10.1002/lite.200600037.
- [55] K. Miyashita, "Prevention of fish oil oxidation," *J Oleo Sci*, vol. 68, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.5650/jos.ess18144.
- [56] C. Solans and I. Solé, "Nano-emulsions: Formation by low-energy methods," *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 17, no. 5. pp. 246–254, Oct. 2012. doi: 10.1016/j.cocis.2012.07.003.
- [57] & V. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., *Introduction to Spectroscopy- A guide for students of organic chemistry*, 5^a. 2014. [Online]. Available: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=N-zKAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=introduction+to+spectroscopy+THIRD+EDITION&ots=XfnfbZiN2L&sig=tcGaxt72175LoEJFwhprqliGb20#v=onepage&q=introduction+to+spectroscopy+THIRD+EDITION&f=false>
- [58] M. D. Guillen and N. Cabo, "Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions," *J Sci Food*

- Agric*, vol. 80, no. 14, pp. 2028–2036, 2000, doi: 10.1002/1097-0010(200011)80:14<2028::AID-JSFA713>3.3.CO;2-W.
- [59] M. D. Guillen and N. Cabo, “Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions,” *J Sci Food Agric*, vol. 80, no. 14, pp. 2028–2036, 2000, doi: 10.1002/1097-0010(200011)80:14<2028::AID-JSFA713>3.3.CO;2-W.
- [60] M. D. Guille, “Infrared Spectroscopy in the Study of Edible Oils and Fats,” vol. 1, 1997.
- [61] N. P. Vidal, F. European, and F. European, “Influence of smoking with smoke flavorings on the oxidative stability of farmed sea bass filets monitored by ¹H NMR and FTIR,” vol. 1600023, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1002/ejlt.201600023.
- [62] M. A. Poiana, E. Alexa, M. F. Munteanu, R. Gligor, D. Moigradean, and C. Mateescu, “Use of ATR-FTIR spectroscopy to detect the changes in extra virgin olive oil by adulteration with soybean oil and high temperature heat treatment,” *Open Chem*, vol. 13, no. 1, pp. 689–698, Jan. 2015, doi: 10.1515/chem-2015-0110.
- [63] P. B. M. C. Derogis, A. B. Chaves-Fillho, and S. Miyamoto, “Characterization of hydroxy and hydroperoxy polyunsaturated fatty acids by mass spectrometry,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 1127, pp. 21–35, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-11488-6_2.
- [64] M. D. Guillen and N. Cabo, “Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions,” *J Sci Food Agric*, vol. 80, no. 14, pp. 2028–2036, Nov. 2000, doi: 10.1002/1097-0010(200011)80:14<2028::aid-jsfa713>3.0.co;2-4.
- [65] F. R. van de Voort, A. A. Ismail, J. Sedman, and G. Emo, “Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 71, no. 3, pp. 243–253, 1994, doi: 10.1007/BF02638049.
- [66] A. Georgiev, I. Karamancheva, and L. Topalova, “Determination of oxidation products in transformer oils using FT-IR spectroscopy,” *J Mol Struct*, vol. 872, no. 1, pp. 18–23, 2008, doi: 10.1016/j.molstruc.2007.02.014.
- [67] H. Yin and N. A. Porter, “New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids,” *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 7, no. 1–2, pp. 170–184, Jan. 2005. doi: 10.1089/ars.2005.7.170.
- [68] K. D. Mjos and C. Orvig, “Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry,” *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 8. American Chemical Society, pp. 4540–4563, Apr. 23, 2014. doi: 10.1021/cr400460s.
- [69] D. Gaynor and D. M. Griffith, “The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: Beyond platinum,” *Dalton Transactions*, vol. 41, no. 43, pp. 13239–13257, 2012, doi: 10.1039/c2dt31601c.
- [70] Tasuko Ito and Nobuyuki Tanaka, “Electronic Structure of Tris(1,10-phenanthroline)iron(II) Complex,” *Bull Chem Soc Jpn*, vol. 42, pp. 702–709, Jul. 1969, doi: <https://doi.org/10.1246/bcsj.42.702>.

- [71] A. P. S. Crema *et al.*, “New family of Type V eutectic solvents based on 1,10-phenanthroline and their application in metal extraction,” *Hydrometallurgy*, vol. 215, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.hydromet.2022.105971.
- [72] L. Viganor, C. Skerry, M. McCann, and M. Devereux, “Tuberculosis: An Inorganic Medicinal Chemistry Perspective,” *Curr Med Chem*, vol. 22, no. 18, pp. 2199–2224, 2015, doi: 10.2174/0929867322666150408112357.
- [73] S. Kishioka, “Higher-order derivative electronic absorption spectral measurements of tris(1,10-phenanthroline) iron(II) complex in an optically-transparent thin-layer spectroelectrochemical cell,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 928, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.jelechem.2022.117081.
- [74] C. Vilchèze, T. Hartman, B. Weinrick, and W. R. Jacobs, “Mycobacterium tuberculosis is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction,” *Nat Commun*, vol. 4, no. May, 2013, doi: 10.1038/ncomms2898.
- [75] M. C. Solcia *et al.*, “Growth-inhibitory effects of tris-(1,10-phenanthroline) iron (II) against Mycobacterium tuberculosis in vitro and in vivo,” *Tuberculosis*, vol. 128, May 2021, doi: 10.1016/j.tube.2021.102087.
- [76] E. S. de Freitas *et al.*, “Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in Vitro cytotoxicity of ruthenium(II) compounds,” *Molecules*, vol. 19, no. 5, pp. 5999–6008, 2014, doi: 10.3390/molecules19055999.
- [77] D. Y. Wu, B. Ren, X. Xu, G. K. Liu, Z. L. Yang, and Z. Q. Tian, “Periodic trends in the bonding and vibrational coupling: Pyridine interacting with transition metals and noble metals studied by surface-enhanced Raman spectroscopy and density-functional theory,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 119, no. 3, pp. 1701–1709, 2003, doi: 10.1063/1.1580102.
- [78] M. Muniz-Miranda, B. Pergolese, and A. Bigotto, “SERS and DFT investigation on the adsorption of 1,10-phenanthroline on transition metal surfaces,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, no. 5, pp. 1145–1151, 2010, doi: 10.1039/b913014d.
- [79] A. Vivoni, R. L. Birke, R. Foucault, and J. R. Lombardi, “Ab initio frequency calculations of pyridine adsorbed on an adatom model of a SERS active site of a silver surface,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 23, pp. 5547–5557, 2003, doi: 10.1021/jp027642o.
- [80] W. K. H. Ho, Z. Y. Bao, X. Gan, K. Y. Wong, J. Dai, and D. Lei, “Probing Conformation Change and Binding Mode of Metal Ion-Carboxyl Coordination Complex through Resonant Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Density Functional Theory,” *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 10, no. 16, pp. 4692–4698, 2019, doi: 10.1021/acs.jpcllett.9b01435.
- [81] C. C. R. Sutton, G. Da Silva, and G. V. Franks, “Modeling the IR spectra of aqueous metal carboxylate complexes: Correlation between bonding geometry and stretching mode wavenumber shifts,” *Chemistry - A European Journal*, vol. 21, no. 18, pp. 6801–6805, 2015, doi: 10.1002/chem.201406516.

- [82] E. G. Palacios, G. Juárez-López, and A. J. Monhemius, “Infrared spectroscopy of metal carboxylates: II. Analysis of Fe(III), Ni and Zn carboxylate solutions,” *Hydrometallurgy*, vol. 72, no. 1–2, pp. 139–148, Feb. 2004, doi: 10.1016/S0304-386X(03)00137-3.
- [83] G. B. and R. J. P. Deacon, “RELATIONSHIPS BETWEEN THE CARBON-OXYGEN STRETCHING FREQUENCIES OF CARBOXYLATO COMPLEXES AND THE TYPE OF CARBOXYLATE COORDINATION,” *Coord Chem Rev*, vol. 33, pp. 227–250, 1980, doi: 10.1016/S0010-8545(00)80455-5.
- [84] P. Moss, “The T cell immune response against SARS-CoV-2,” *Nature Immunology*, vol. 23, no. 2. Nature Research, pp. 186–193, Feb. 01, 2022. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w.
- [85] F. P. Veras *et al.*, “SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 217, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.1084/jem.20201129.
- [86] J. Buchrieser *et al.*, “Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells,” *EMBO J*, vol. 39, no. 23, Dec. 2020, doi: 10.15252/embj.2020106267.
- [87] W. Zeng *et al.*, “Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 527, no. 3, pp. 618–623, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.04.136.
- [88] F. Krammer, “SARS-CoV-2 vaccines in development,” *Nature*, vol. 586, no. 7830. Nature Research, pp. 516–527, Oct. 22, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2798-3.
- [89] D. Singh and S. v. Yi, “On the origin and evolution of SARS-CoV-2,” *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 53, no. 4. Springer Nature, pp. 537–547, Apr. 01, 2021. doi: 10.1038/s12276-021-00604-z.
- [90] “World Health Organization, Perfil da tuberculose: Global,” Jul. 11, 2022. <https://bityli.com/tBEtSC> (accessed Jul. 10, 2022).
- [91] N. U. Brasil, “Chefe da Organização Mundial da Saúde declara o fim da COVID-19 como uma emergência de saúde global,” *Chefe da Organização Mundial da Saúde declara o fim da COVID-19 como uma emergência de saúde global*, 2023. <https://brasil.un.org/pt-br/230307-chefe-da-organização-mundial-da-saúde-declara-o-fim-da-covid-19-como-uma-emergência-de-saúde> (accessed May 10, 2023).
- [92] M. M. Lamers and B. L. Haagmans, “SARS-CoV-2 pathogenesis,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 20, no. 5. Nature Research, pp. 270–284, May 01, 2022. doi: 10.1038/s41579-022-00713-0.
- [93] C. Gaebler *et al.*, “Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2,” *Nature*, vol. 591, no. 7851, pp. 639–644, Mar. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03207-w.

- [94] B. Sun *et al.*, “Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients,” *Emerg Microbes Infect*, vol. 9, no. 1, pp. 940–948, Jan. 2020, doi: 10.1080/22221751.2020.1762515.
- [95] P. B. da Silva *et al.*, “Detection of SARS-CoV-2 virus via dynamic light scattering using antibody-gold nanoparticle bioconjugates against viral spike protein,” *Talanta*, vol. 243, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123355.
- [96] L. C. Brazaca *et al.*, “Electrochemical immunosensors using electrodeposited gold nanostructures for detecting the S proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 414, no. 18, pp. 5507–5517, Jul. 2022, doi: 10.1007/s00216-022-03956-1.
- [97] W. S. Chang, B. Willingham, L. S. Slaughter, S. Dominguez-Medina, P. Swanglap, and S. Link, “Radiative and nonradiative properties of single plasmonic nanoparticles and their assemblies,” *Acc Chem Res*, vol. 45, no. 11, pp. 1936–1945, Nov. 2012, doi: 10.1021/ar200337u.
- [98] M. A. Garcia, “Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications,” *J Phys D Appl Phys*, vol. 44, no. 28, 2011, doi: 10.1088/0022-3727/44/28/283001.
- [99] N. F. Chiu, C. C. Chen, C. du Yang, Y. S. Kao, and W. R. Wu, “Enhanced Plasmonic Biosensors of Hybrid Gold Nanoparticle-Graphene Oxide-Based Label-Free Immunoassay,” *Nanoscale Res Lett*, vol. 13, 2018, doi: 10.1186/s11671-018-2565-7.
- [100] H. Aldewachi, T. Chalati, M. N. Woodroffe, N. Bricklebank, B. Sharrack, and P. Gardiner, “Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 1. Royal Society of Chemistry, pp. 18–33, Jan. 07, 2018. doi: 10.1039/c7nr06367a.
- [101] C. C. Chang, C. P. Chen, T. H. Wu, C. H. Yang, C. W. Lin, and C. Y. Chen, “Gold nanoparticle-based colorimetric strategies for chemical and biological sensing applications,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 6. MDPI AG, Jun. 01, 2019. doi: 10.3390/nano9060861.
- [102] P. Jiang, Y. Wang, L. Zhao, C. Ji, D. Chen, and L. Nie, “Applications of gold nanoparticles in non-optical biosensors,” *Nanomaterials*, vol. 8, no. 12. MDPI AG, Dec. 01, 2018. doi: 10.3390/nano8120977.
- [103] G. Arie, E. Da Silva, G. Dumas, H. Rozanska, and C. Sebenne, “Etude des molécules biologiques par spectrométrie Raman,” *Biochimie*, vol. 53, no. 9, pp. 1041–1043, 1971, doi: 10.1016/s0300-9084(71)80072-x.
- [104] F. D’Amico *et al.*, “Investigation of genomic DNA methylation by ultraviolet resonant Raman spectroscopy,” *J Biophotonics*, vol. 13, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.1002/jbio.202000150.
- [105] A. Kapara, V. Brunton, D. Graham, and K. Faulds, “Investigation of cellular uptake mechanism of functionalised gold nanoparticles into breast cancer using

- SERS,” *Chem Sci*, vol. 11, no. 22, pp. 5819–5829, Jun. 2020, doi: 10.1039/d0sc01255f.
- [106] H. Liu *et al.*, “Development of a SERS-based lateral flow immunoassay for rapid and ultra-sensitive detection of anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG in clinical samples,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 329, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.129196.
- [107] M. Muhammad and Q. Huang, “A review of aptamer-based SERS biosensors: Design strategies and applications,” *Talanta*, vol. 227. Elsevier B.V., May 15, 2021. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122188.
- [108] P. Jiang, Y. Wang, L. Zhao, C. Ji, D. Chen, and L. Nie, “Applications of gold nanoparticles in non-optical biosensors,” *Nanomaterials*, vol. 8, no. 12. MDPI AG, Dec. 01, 2018. doi: 10.3390/nano8120977.
- [109] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, “Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences,” *Biophys Rev*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, 2016, doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- [110] J. D. Driskell, C. A. Jones, S. M. Tompkins, and R. A. Tripp, “One-step assay for detecting influenza virus using dynamic light scattering and gold nanoparticles,” *Analyst*, vol. 136, no. 15, pp. 3083–3090, Aug. 2011, doi: 10.1039/c1an15303j.
- [111] C. Y. Lim *et al.*, “Succinimidyl ester surface chemistry: Implications of the competition between aminolysis and hydrolysis on covalent protein immobilization,” *Langmuir*, vol. 30, no. 43, pp. 12868–12878, 2014, doi: 10.1021/la503439g.
- [112] J. D. Driskell, C. A. Jones, S. M. Tompkins, and R. A. Tripp, “One-step assay for detecting influenza virus using dynamic light scattering and gold nanoparticles,” *Analyst*, vol. 136, no. 15, pp. 3083–3090, 2011, doi: 10.1039/c1an15303j.
- [113] D. Naumann, “Infrared Spectroscopy in Microbiology.”
- [114] W. M. McGee and S. A. McLuckey, “Efficient and directed peptide bond formation in the gas phase via ion/ion reactions,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 4, pp. 1288–1292, Jan. 2014, doi: 10.1073/pnas.1317914111.
- [115] X. Jian, Y. Hu, W. Zhou, and L. Xiao, “Self-healing polyurethane based on disulfide bond and hydrogen bond,” *Polym Adv Technol*, vol. 29, no. 1, pp. 463–469, Jan. 2018, doi: 10.1002/pat.4135.
- [116] C. Zou *et al.*, “Two-dimensional heterospectral correlation analysis of the redox-induced conformational transition in cytochrome c using surface-enhanced Raman and infrared absorption spectroscopies on a two-layer gold surface,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 117, no. 33, pp. 9606–9614, 2013, doi: 10.1021/jp404573q.
- [117] P. Bazylewski, R. Divigalpitiya, and G. Fanchini, “In situ Raman spectroscopy distinguishes between reversible and irreversible thiol modifications in l-cysteine,” *RSC Adv*, vol. 7, no. 5, pp. 2964–2970, 2017, doi: 10.1039/c6ra25879d.

- [118] J. Johnston, E. N. Taylor, R. J. Gilbert, and T. J. Webster, "Improved molecular fingerprint analysis employing multi-branched gold nanoparticles in conjunction with surface-enhanced raman scattering," *Int J Nanomedicine*, vol. 11, pp. 45–53, Dec. 2015, doi: 10.2147/IJN.S93222.
- [119] G. Rusciano, A. C. de Luca, G. Pesce, and A. Sasso, "Raman tweezers as a diagnostic tool of hemoglobin-related blood disorders," *Sensors*, vol. 8, no. 12, pp. 7818–7832, Dec. 2008. doi: 10.3390/s8127818.
- [120] H. S. Stevenson, S. S. Shetty, N. J. Thomas, V. N. Dhamu, A. Bhide, and S. Prasad, "Ultrasensitive and Rapid-Response Sensor for the Electrochemical Detection of Antibiotic Residues within Meat Samples," *ACS Omega*, vol. 4, no. 4, pp. 6324–6330, Apr. 2019, doi: 10.1021/acsomega.8b03534.
- [121] C. Y. Panicker, H. T. Varghese, L. Ushakumari, Y. S. Mary, J. Sarkarc, and J. Chowdhury, "Concentration and ph dependent SERS spectra of sulfanilic acid sodium salt on colloidal silver particles," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 41, no. 9, pp. 944–951, Sep. 2010, doi: 10.1002/jrs.2524.
- [122] V. 1 ır Kopeck Jr, udiger Ettrich, K. rina Hofbauerov, and V. 1 ır Baumruk, "Structure of human a 1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site q.qq." [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/ybbrc
- [123] G. P. Szekeres and J. Kneipp, "SERS probing of proteins in gold nanoparticle agglomerates," *Front Chem*, vol. 7, no. JAN, Jan. 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00030.
- [124] K. A. Willets, "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for probing internal cellular structure and dynamics," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 394, no. 1, pp. 85–94, May 2009. doi: 10.1007/s00216-009-2682-3.
- [125] M. Blow *et al.*, "Applications of Nuclear Magnetic Res-onance Spectroscopy In Organic Chemistry," Pergamon Press, Hulsgen and D. Ott, 1967. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [126] M. C. da Paz *et al.*, "Anti-CEA loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal cancer," *Int J Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5271–5282, 2012, doi: 10.2147/IJN.S32139.



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

Original article

Oral delivery of fish oil in oil-in-water nanoemulsion: development, colloidal stability and modulatory effect on *in vivo* inflammatory induction in mice



Débora S. Santos^a, José Athayde V. Morais^a, Ísis A.C. Vanderlei^b, Alexandre S. Santos^c, Ricardo B. Azevedo^a, Luís A. Muehlmann^a, Osmino R.P. Júnior^d, Márcia R. Mortari^b, Jaqueline R. da Silva^a, Sebastião W. da Silva^c, João P.F. Longo^{a,*}

^a Nanobiotechnology Laboratory, Genetics & Morphology Department, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil

^b Neuropharmacology Laboratory, Physiological Sciences Department, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil

^c Optical Spectroscopy Laboratory, Institute of Physics, University of Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil

^d Toxicology Laboratory, Physiological Sciences Department, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Fish oil nanoemulsion
Oral absorption
Inflammatory treatment

ABSTRACT

To improve the oral absorption of fish oil and test its anti-inflammatory effect, a fish oil nanoemulsion was developed using *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic fatty acid as a biomarker for oral administration. The colloidal stability tests of the fish oil nanoemulsion showed an average size of $155.44 \text{ nm} \pm 6.46$ (4°C); $163.04 \text{ nm} \pm 9.97$ (25°C) and polydispersity index 0.22 ± 0.02 (4°C), 0.21 ± 0.02 (25°C), indicating systems with low polydispersity and stable droplets. The fish oil nanoemulsion did not alter the cell viability of the RAW 264.7 macrophages and, at a concentration of 0.024 mg/ml , was kinetically incorporated into the cells after 18 h of contact. The nanoemulsion was maintained in the gastrointestinal region for a significantly shorter period of time ($p \leq 0.05$) compared to the intake of fish oil in free form. Inflammatory tests demonstrated that nanoemulsion and fish oil showed less ($p \leq 0.05$) neutrophil infiltration after 24h of sepsis induction and there was a significant reduction ($p \leq 0.05$) in the volume of paw edema in female adult Balb/c mice who received the nanoemulsion diet compared to the other experimental groups (control, formalin, fish oil and sunflower oil). These results indicate that the fish oil nanoemulsion was significantly effective in the dietary conditions tested here, presenting satisfactory responses in the modulation of inflammatory disorders, demonstrating interesting and beneficial nutraceutical effects.

1. Introduction

In the inflammatory process, ω -3 and ω -6 fatty acids act in the modulation of inflammatory reactions, producing biologically active mediators called eicosanoids with different stereochemistry [1–6]. The most important types of ω -3 are fatty acids, such as *cis*-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoic (DHA) and *cis*-5,8,11,14,17 eicosapentaenoic

(EPA), which usually produce mediators of low inflammatory potential. On the other hand, ω -6 fatty acids, such as arachidonic acid (AA), are used as a substrate to produce high-potential inflammatory eicosanoids, such as series-2 prostaglandins (PGE₂) and series-4 leukotrienes (LTB₄) [7,8].

When an injury occurs in the cell membrane, inflammation begins after the production and release of these fatty acids that are produced

Abbreviations: 5-LOX, 5-lipoxygenase; AA, (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid (arachidonic acid); BBS, babassu; COX, cyclooxygenase; DHA, *cis*-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoic acid; DLS, Dynamic Light Scattering; EPA, *cis*-5,8,11,14,17 eicosapentaenoic acid; FM, formalin; FO, fish oil; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; LOX, lipoxygenase; LPS, gram negative bacteria lipopolysaccharide; LTB₄, series-4 leukotrienes; MPO, myeloperoxidase enzyme; NaCl, sodium chloride; NE-blank, white nanoemulsion; NEW3, fish oil nanoemulsions; PGE₂, series 2 prostaglandins; PGE₃, series 3 prostaglandins; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; RTCA, Real-time cell analysis; SEM, Transmission Scanning Electron Microscopy; SO, Sunflower oil; TAG, triacylglycerols; TXA₂, thromboxanes; XDIR, 1,1'-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine dye.

* Corresponding author.

E-mail address: jplongo82@gmail.com (J.P.F. Longo).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2020.110980>

Received 27 July 2020; Received in revised form 2 November 2020; Accepted 3 November 2020

Available online 26 November 2020

0753-3322/© 2020 Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Chemistry

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/forensic-chemistry

Raman spectroscopy of fingerprints and chemometric analysis for forensic sex determination in humans

Marco A. Souza^a, Alexandre Silva Santos^b, Sebastião William da Silva^b, Jez Willian Batista Braga^{c,*}, Marcelo Henrique Sousa^d

^a Instituto Nacional de Identificação, Polícia Federal, 70770-917, Brasília, DF, Brazil

^b Laboratório de Espectroscopia Óptica, Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^c Instituto de Química, Universidade de Brasília, Cx Postal 4478, CEP 70910-900 Brasília, DF, Brazil

^d Green Nanotechnology Group, Faculdade de Ciências, Universidade de Brasília, 72220-140 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Gender determination
Latent fingerprints
Fingermarks
SVM/DA
PLSDA
Raman

ABSTRACT

From the late 90 s until recently, some forensic research has been dedicated to the development of analytical techniques to explore the chemical components present in fingerprints, in order to find other information besides authorship. Raman spectroscopy is a technique of nondestructive analysis of a wide variety of forensic evidence, including fingerprints, at the crime scene. In this context, the aim of this work is to explore Raman spectroscopy and the supervised methods, Partial Least Squares and Support Vector Machine for Discriminant Analysis (PLSDA and SVM/DA, respectively), as means to determine sex based on fingerprints obtained from male and female donors and submitted to different conditions (dark and light). Considering a period up to seven days from the collection of the fingerprint, the results showed correct discrimination rates ranging from approximately 80–93%.

1. Introduction

Fingerprints were used for the first time to solve a crime in 1892, by Juan Vucetich [1]. Since then, this kind of evidence has been considered a powerful tool for identifying victims and criminals. The techniques for obtaining fingerprints from a crime scene have evolved over time, allowing extraction on various types of surfaces, using different optical, chemical or physical methods [2]. Currently, the fingerprints recovered from a crime scene are compared with records held on a fingerprint database, in an Automated Fingerprint Identification System (AFIS). However, for the comparison of fingerprints, enough technical quality is needed. This means a sufficient amount of minutiae to perform comparison with fingerprint templates. If not, it is still possible to use DNA identification techniques to find a person's identity [3]. (Table 1).

Latent fingerprints are composed of the natural secretions from glands in the skin, principally eccrine and sebaceous glands. Eccrine sweat consists predominantly of water (90%), and the remainder is a mixture of organic (e.g. amino acids, proteins and lactate) and inorganic material (e.g. Na⁺, K⁺, Cl⁻ and metal ions). Sebaceous secretions are predominantly composed of fatty acids, glycerides, cholesterol, squalene

and a variety of lipid esters. Environmental contaminants, e.g. bacterial spores, dust, cosmetics, hair products and drugs, may also be found in skin secretions [4–8].

From the late 90 s until recently, some forensic research has been dedicated to the development of analytical techniques to explore the chemical components present in fingerprints, with the aim of finding other information besides authorship. Considering the premise that fingerprints can be interpreted as a box carrying some “chemical print”, wherein pieces of information like date, sex and use of illegal substances and others can be found, they represent an important sample that can be used to collaborate in a police investigation. Recent studies have suggested that the chemical substances contained in fingerprint composition, like metabolites, can vary as a function of physical properties such as sex, age, ethnicity or health status [5]. Besides, the oil compounds of fingerprints change over time [9].

In this context, the ability to determine sex from traces like body fluids, nail or fingerprints at the scene of a crime would further advance the infield capabilities of crime scene investigation. Huynh *et al.* developed a biocatalytic assay for determining sex based on the extraction of amino acids present in the fingerprint using UV-Vis

* Corresponding author.

E-mail address: jez@unb.br (J.W.B. Braga).

<https://doi.org/10.1016/j.forc.2021.100395>

Received 15 October 2021; Received in revised form 20 December 2021; Accepted 21 December 2021

Available online 27 December 2021

2468-1709/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.



Detection of SARS-CoV-2 virus via dynamic light scattering using antibody-gold nanoparticle bioconjugates against viral spike protein

Patricia Bento da Silva^a, Jaqueline Rodrigues da Silva^a, Mosar Corrêa Rodrigues^a,
 Julia Augusto Vieira^a, Ikaro Alves de Andrade^b, Tatsuya Nagata^b, Alexandre Silva Santos^c,
 Sebastião William da Silva^c, Marcia Cristina Oliveira da Rocha^d, Sonia Nair Bão^d,
 Pedro M. Moraes-Vieira^e, José Proença-Modena^c, Monara K.C. Angelim^c,
 Gabriela Fabiano de Souza^c, Stefanie Primon Muraro^c, André Luis Branco de Barros^f,
 Glândara Aparecida de Souza Martins^g, Fátima Ribeiro-Dias^h, Giovanna Machadoⁱ,
 Melissa Regina Fessel^j, Ana Marisa Chudzinski-Tavassi^j, Célia Machado Ronconi^k,
 Debora Gonçalves^l, Rui Curi^{l,m}, Osvaldo N. Oliveira, (Jr.)^{l,n}, Ricardo Bentes Azevedo^{a,**}

^a Laboratory of Nanobiotechnology, Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

^b Virology and Microscopy Laboratory, Cell Biology Department, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

^c Optical Spectroscopy Laboratory, Institute of Physics, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

^d Electron Microscopy Laboratory, Cell Biology Department, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

^e Department of Genetics, Evolution, Microbiology, and Immunology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil

^f Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil

^g Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Federal University of Tocantins, 77001-090, Brazil

^h Laboratório de Imunidade Natural (LIN), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 74690-900, Brazil

ⁱ Centro de Tecnologia Estruturas do Nordeste, Av. Prof. Luiz Freire 01, Recife, Pernambuco, 50740-540, Brazil

^j Biotecnologia Center, Butantan Institute, São Paulo, São Paulo, 05503-900, Brazil

^k Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, Outeiro de São João Batista, s/n, 24020-141, Niterói, RJ, Brazil

^l São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, São Paulo, 13560-970, Brazil

^m Interdisciplinary Program of Health Sciences, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, 01311-925, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV-2
 Immunosensors
 Bioconjugates
 Spectroscopic techniques
 Influenza virus

ABSTRACT

Mass testing for the diagnosis of COVID-19 has been hampered in many countries owing to the high cost of genetic material detection. This study reports on a low-cost immunoassay for detecting SARS-CoV-2 within 30 min using dynamic light scattering (DLS). The immunosensor comprises 50-nm gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with antibodies against SARS-CoV-2 spike glycoprotein, whose bioconjugation was confirmed using transmission electron microscopy (TEM), UV-Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and surface-enhanced Raman scattering spectroscopy (SERS). The specific binding of the bioconjugates to the spike protein led to an increase in bioconjugate size, with a limit of detection (LOD) 5.29×10^5 TCID₅₀/ml (Tissue Culture Infectious Dose). The immunosensor was also proven to be selective upon interaction with influenza viruses once no increase in size was observed after DLS measurement. The strategy proposed here aimed to use antibodies conjugated to AuNPs as a generic platform that can be extended to other detection principles, enabling technologies for low-cost mass testing for COVID-19.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: chu@fsc.usp.br (O.N. Oliveira), azevedo@unh.br (R.B. Azevedo).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123355>

Received 10 December 2021; Received in revised form 25 February 2022; Accepted 1 March 2022

Available online 4 March 2022

0039-9140/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.



Article

Development of New Natural Lipid-Based Nanoparticles Loaded with Aluminum-Phthalocyanine for Photodynamic Therapy against Melanoma

Victor Carlos Mello ^{1,2,3}, Victor Hugo Sousa Araújo ⁴, Karen Letycia Rodrigues de Paiva ^{2,3}, Marina Mesquita Simões ^{2,3}, Dafne Caroline Marques ^{2,3}, Nelice Roberta da Silva Costa ⁵, Isadora Florêncio de Souza ², Patricia Bento da Silva ⁵, Igor Santos ⁶, Raquel Almeida ⁶, Kelly Grace Magalhães ⁶, Sebastião William da Silva ⁷, Alexandre Silva Santos ⁷, Fabiane Veiga-Souza ^{8,9}, Paulo Eduardo Narcizo Souza ¹⁰, Marina Arantes Raddichi ^{2,5}, João Paulo Figueiró Longo ⁵, Jennifer Thyanne Cavalcante de Araújo ⁴, Luis Alexandre Muehlmann ⁹, Marlus Chorilli ⁴ and Sônia Nair Bão ^{2,*}



Citation: Mello, V.C.; Araújo, V.H.S.; de Paiva, K.L.R.; Simões, M.M.; Marques, D.C.; da Silva Costa, N.R.; de Souza, I.F.; da Silva, P.B.; Santos, I.; Almeida, R.; et al. Development of New Natural Lipid-Based Nanoparticles Loaded with Aluminum-Phthalocyanine for Photodynamic Therapy against Melanoma. *Nanomaterials* 2022, 12, 3547. <https://doi.org/10.3390/nano12203547>

Academic Editor: Wei Chen

Received: 15 September 2022

Accepted: 5 October 2022

Published: 11 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Postgraduate Program in Animal Biology, Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil
 - ² Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil
 - ³ COOIL Institute, Brasília 72622-401, DF, Brazil
 - ⁴ School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara 14800-903, SP, Brazil
 - ⁵ Laboratory of Nanobiotechnology, Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil
 - ⁶ Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil
 - ⁷ Optical Spectroscopy Laboratory, Institute of Physics, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil
 - ⁸ Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil
 - ⁹ Faculty of Ceilandia, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil
 - ¹⁰ Laboratory of Electron Paramagnetic Resonance, Institute of Physics, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil
- * Correspondence: snbao@unb.br

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) mediated by photosensitizers loaded in nanostructures as solid lipid nanoparticles has been pinpointed as an effective and safe treatment against different skin cancers. Amazon butters have an interesting lipid composition when it comes to forming solid lipid nanoparticles (SLN). In the present report, a new third-generation photosensitizing system consisting of aluminum-phthalocyanine associated with Amazon butter-based solid lipid nanoparticles (SLN-AIPc) is described. The SLN was developed using murumuru butter, and a monodisperse population of nanodroplets with a hydrodynamic diameter of approximately 40 nm was obtained. The study of the permeation of these AIPc did not permeate the analyzed skin, but when incorporated into the system, SLN-AIPc allowed permeation of almost 100% with 8 h of contact. It must be emphasized that SLN-AIPc was efficient for carrying aluminum-phthalocyanine photosensitizers and exhibited no toxicity in the dark. Photoactivated SLN-AIPc exhibited a 50% cytotoxicity concentration (IC₅₀) of 19.62 nM when applied to B16-F10 monolayers, and the type of death caused by the treatment was apoptosis. The exposed phospholipid phosphatidylserine was identified, and the treatment triggered a high expression of Caspase 3. A stable Amazon butter-based SLN-AIPc formulation was developed, which exhibits strong in vitro photodynamic activity on melanoma cells.

Keywords: third-generation photosensitizers; drug delivery systems; cancer; photodynamic therapy; Amazon butters



Diffuse Reflectance FTIR of Latent Fingerprints and Discriminant Analysis for Sex Identification in Humans

Marco Antonio de Souza,^{a,b,c} Alexandre S. Santos,^d Sebastião William da Silva,^d
Jez Willian B. Braga^{b,*} and Marcelo Henrique Sousa^e

^aPolícia Federal, 70770-917 Brasília-DF, Brazil

^bInstituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, 70910-900 Brasília-DF, Brazil

^cGrupo de Nanotecnologia Verde, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília,
72220-140 Brasília-DF, Brazil

^dLaboratório de Espectroscopia Óptica, Instituto de Física, Universidade de Brasília,
70910-900 Brasília-DF, Brazil

^eInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (INCT Bio),
13083-970 Campinas-SP, Brazil

Latent fingerprint is an important crime scene evidence, but it is not always recoverable or technically suitable for analysis with fingerprint patterns. Forensic science has shown that other information can be explored from traces using chemical compounds. Infrared spectroscopy is a nondestructive technique that is widely applied to a variety of forensic evidence. In this work, infrared spectroscopy and partial least square discriminant analysis were used to determine the human sex based on latent fingermark analysis. Fingerprint samples were taken from 42 male and female donors, then kept in either dark or light storage conditions, and the Fourier transform infrared (FTIR) spectra were measured considering a period of up to 30 days from collection. The regions from 3000 to 2800 cm^{-1} and 1790 to 1150 cm^{-1} presented the greatest differences in the peak intensities among the two sex groups. The results showed a correct discrimination rate higher than 80%.

Keywords: sex determination, latent fingerprints, fingermarks, chemometric analysis, FTIR

Introduction

Fingerprint analysis has always been of great importance in establishing the authorship of a crime. It is one of the most common traces found at a crime scene and, in this case, it is known as a latent fingerprint.^{1,2} Traditional techniques for print development, such as the use of cyanoacrylate, ninhydrin and other chemical developers, always work towards producing a better contrast between the fingerprint and the background where it was deposited.³ Thus, the number of details and their characteristics that appear after their development individualize the fingerprint and enable the comparison with fingerprint patterns to be carried out, but the number of minutiae is often not enough to carry out a comparison.³

Since the 1990s, there have been a number of studies to extract other information from fingerprints, such as differentiating adults from children,⁴ finding traces of illicit substances and explosives,^{5,6} dating^{7,8} and, more recently, the discrimination of male and female subjects.^{9,10}

The understanding of the chemical substances that form fingerprints is essential for these studies, since it is from the understanding of the degradation kinetics, concentration and verification of the existence of a given substance that these new results can be achieved. The chemical composition of fingerprints originates mainly from the eccrine and sebaceous glands. Eccrine sweat is mainly composed of water (98%), and the rest of its content is either organic material (e.g., proteins, amino acids, and lactate) or inorganic (e.g., Na^+ , K^+ , Cl^- and other metal ions). Similarly, squalene, cholesterol, glycerides, fatty acids, and a range of lipid esters principally made up the sebaceous secretions. Contaminants detected in these

*e-mail: jez@unb.br

Editor handled this article: Ivo M. Raimundo Jr. (Associate)