

NATÁLIA CRISTINA DALIBERA

**Síntese de nanopartículas de ouro por via microfluídica para
aplicação em sistema de entrega de vacina de subunidade**

**São Paulo
2024**

NATÁLIA CRISTINA DALIBERA

**Síntese de nanopartículas de ouro por via microfluídica para
aplicação em sistema de entrega de vacina de subunidade**

Versão corrigida

Tese apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração:
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Adriano
Rodrigues Azzoni

Co-orientadora: Dra. Aline
Furtado Oliveira

**São Paulo
2024**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Dalibera, Natália

Síntese de nanopartículas de ouro por via microfluídica para aplicação em sistema de entrega de vacina de subunidade / N. Dalibera -- versão corr. -- São Paulo, 2024.

139 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.nanopartículas de ouro 2.microfluídica 3.vacina de subunidade 4.entrega de antígeno 5.SARS-CoV-2 I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, Dr. Adriano Rodrigues Azzoni e Dra. Aline Furtado Oliveira, pelo apoio, disponibilidade, paciência e por toda a ajuda no decorrer desse trabalho. Foi um prazer desenvolver esse estudo ao lado de grandes cientistas e seres humanos como vocês. Agradeço também ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), especialmente à Dra. Natalia Cerize, ao Dr. Kleber Lanigra, à Dra. Patrícia Leo e Bruno Verona pela disponibilização da infraestrutura dos laboratórios da Unidade de Bionanomanufatura. Agradeço à Universidade de São Paulo e aos meus professores, por contribuírem com o meu crescimento pessoal e acadêmico. Ao Professor Dr. Marcelo Seckler, por se disponibilizar a compartilhar seu tempo e conhecimento. Ao meu colega de trabalho e amigo Dr. Silas Derenzo, por ter me colocado em contato com o Professor Dr. Marcelo e por estar sempre disponível para conversar e ensinar. Aos meus colegas do IPT Bianca Agio, Dra. Danae Lopes, Henrique Reis, Gabriel Antonieto, Ariel Lima, Aline Rocha, Kelly Manhani, Gilmar Almeida, Fabiano dos Santos e Mayara Santos, pela disponibilidade para me ajudar e treinar nas técnicas analíticas, construção dos dispositivos e demais ensaios e análises. À pesquisadora Dra. Marianna Favaro, ao Professor Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira e à pesquisadora Dra. Mônica Rodrigues, pelos testes de aplicação e pela co-autoria de um dos artigos publicados. À Gabriela Whitaker Visani, minha companheira e melhor amiga, por acreditar em mim e estar ao meu lado nos altos e baixos.

“Não deveria haver obstáculos ao acesso ao conhecimento. O conhecimento científico pertence à humanidade.”

Alexandra Elbakyan

RESUMO

Nanopartículas de ouro (AuNPs) têm sido estudadas para aplicações na área de saúde devido à sua biocompatibilidade, natureza inerte, propriedades ópticas e eletrônicas únicas e facilidade de modificação de sua superfície. AuNPs de formas e tamanhos muito precisos têm sido usadas para diferentes aplicações biomédicas, dado que as propriedades físico-químicas dessas partículas diferem significativamente entre si de acordo com a sua morfologia. A síntese de AuNPs com diferentes tamanhos e morfologias requer um ajuste complexo de processo. Diante disso, este trabalho teve como objetivo a obtenção de AuNPs com diferentes tamanhos e morfologias para funcionalização com proteínas de interesse médico, visando a formulação de uma vacina de subunidade. Neste trabalho, foi demonstrado que a síntese controlada e reprodutível de AuNPs de diferentes morfologias e tamanhos, com alta conversão do sal de ouro, foi possível por via microfluídica através do ajuste preciso dos parâmetros de processo. Mantendo-se no dispositivo microfluídico a razão molar NaCl:Ouro de 3:1, com tempo de residência de 90 s, foi possível controlar o tamanho e geometria das AuNPs sintetizadas variando-se apenas a temperatura da reação e a natureza do agente redutor. As nanopartículas obtidas mostram-se estáveis (módulo do potencial zeta ≥ 20 mV) por ao menos 42 dias quando armazenadas a 8 °C. Quando conjugadas com proteínas, as AuNPs desenvolvidas apresentam diferentes padrões de adsorção que variam conforme características das proteínas adsorvidas e das próprias AuNPs. Complexos de AuNPs com diferentes tamanhos e morfologias foram estudados *in vitro* e *in vivo* para formulação de vacina contra o vírus SARS-CoV-2 e foi demonstrado que as características físicas das AuNPs contribuem significativamente nos resultados de quantidade e qualidade dos anticorpos anti-RBD induzidos. O alto potencial neutralizante de anticorpos específicos anti-RBD (neutralização total em diluições de até 1/1.280) induzidos por complexos AuNPs+RBD otimizados, bem como sua baixa citotoxicidade, demonstram que as AuNPs de tamanho e geometria específicos são, de fato, uma plataforma promissora para a entrega de antígenos, podendo expandir a aplicabilidade das vacinas de subunidades e a utilização de AuNPs na medicina.

Palavras-chave: *nanopartículas de ouro, microfluídica, vacina de subunidade, entrega de antígeno, SARS-CoV-2.*

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNPs) have been studied for health-related applications due to their biocompatibility, inert nature, unique optical and electronic properties, and ease surface modification. AuNPs of precise shapes and sizes have been used for different biomedical applications, given that the physicochemical properties of these particles significantly differ from one another according to their morphology. The synthesis of AuNPs with different sizes and morphologies requires a complex process adjustment. In this context, the goal of this work was to obtain AuNPs with a variety of sizes and morphologies for functionalization with proteins of medical interest and use them to formulate a sub-unit vaccine. In this work, it has been demonstrated that the controlled and reproducible synthesis of AuNPs with different morphologies and sizes, with high conversion of the gold salt, it was possible using microfluidics by precisely adjusting the process parameters. By maintaining the molar ratio NaCt:Gold at 3:1 in the microfluidic device, with a residence time of 90 s, it was possible to control the size and geometry of the synthesized AuNPs, varying only the reaction temperature and the nature of the reducing agent. The obtained nanoparticles exhibited good stability (zeta potential modulus ≥ 20 mV), remaining stable for at least 42 days when stored at 8 °C. When conjugated with proteins, the developed AuNPs show different adsorption patterns that vary according to the characteristics of the adsorbed proteins and the AuNPs themselves. Complexes of AuNPs with different sizes and morphologies were studied *in vitro* and *in vivo* for the formulation of a vaccine against the SARS-CoV-2 virus and demonstrated that the physical characteristics of the AuNPs significantly contribute to the quantity and quality of induced anti-RBD antibodies. The high neutralizing potential of specific anti-RBD antibodies (total neutralization at dilutions of up to 1/1,280) induced by optimized AuNPs+RBD complexes, as well as their low cytotoxicity, demonstrate that microfluidic-process-controlled AuNPs of finely-tuned size and geometry are indeed a promising platform for antigen delivery. This could expand the applicability of subunit vaccines and the use of AuNPs in medicine.

Keywords: *gold nanoparticles, microfluidics, sub-unit vaccine, antigen delivery, SARS-CoV-2.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplo de um dispositivo microfluídico composto por duas entradas de reagentes, uma seção de aquecimento, uma seção de mistura e reação e uma saída de produto. Figura adaptada de [30].	27
Figura 2 – Vários tipos de AuNPs: a) esféricas; b) bastões; c) estrelas; d) bi-pirâmides; e) gaiolas [3].	30
Figura 3 - Principais abordagens para bioconjugação de AuNPs. a) adsorção eletrostática de uma proteína; b) ligação covalente ao ligante da AuNP; c) conjugação de um cofator de proteína à AuNP; d) a conjugação direta de uma aminoácido à superfície da AuNP [3].	31
Figura 4 – Projeto das camadas do microdispositivo “Reator A” desenhadas utilizando o <i>software</i> AutoCAD	41
Figura 5 – Projeto das camadas do microdispositivo “Reator B” desenhadas utilizando o <i>software</i> AutoCAD.	42
Figura 6 – Esquema em 3D do misturador interno do microdispositivo “Reator A” A) vista superior; B) vista lateral.	43
Figura 7 – Esquema 3D do microdispositivo “Reator B” A) vista do topo da seção de aquecimento; B) vista do topo do misturador (seção de reação); C) vista do topo de ambas as seções de aquecimento (camadas superiores) e mistura (camadas inferiores) sobrepostas; D) visão lateral do misturador (seção de reação); E) visão lateral aproximada da geometria cross-section dos canais no misturador (seção de reação).	43
Figura 8 – Cortadora a laser em trabalho de corte das folhas de LTCC.	45
Figura 9 – Camadas do microdispositivo “Reator A” após o corte a <i>laser</i> das folhas de LTCC.	46
Figura 10 – Camadas do microdispositivo “Reator A” empilhadas em suporte metálico.	46
Figura 11 – Folhas de LTCC empilhadas em suporte metálico prensadas em prensa hidráulica aquecida.	47
Figura 12 - Esquema da posição do molde na prensa em duas etapas de tempo.	47

Figura 13 - Dispositivo sobre suporte de cerâmica porosa após a prensa sobre o qual foi aquecido na mufla.	48
Figura 14 – Conexão das mangueiras de PTFE ao dispositivo microfluídico.....	49
Figura 15 – Dispositivo microfluídico conectado à bomba de seringa.....	49
Figura 16 - Dispositivo microfluídico conectado à bomba de seringa e mergulhado em banho de óleo para controle de temperatura.....	50
Figura 17 – Preparo de soluções para testes preliminares segundo Yagyu <i>et al.</i> [77].	53
Figura 18 - Espectros de absorvância de luz do sal de ouro em diferentes concentrações e seus equivalentes em “% de conversão de sal”: 1,25 mM (0% de conversão – linha laranja); 0,25 mM (80% de conversão – linha cinza); 0,06 mM (95% de conversão – linha amarela); 0,03 mM (98% de conversão – linha azul); 0,01 mM (99% de conversão – linha verde).....	57
Figura 19 – Curva de calibração da quantificação de rGFP por UV-vis.	58
Figura 20 – Curva de calibração da quantificação de RBD por UV-vis.	59
Figura 21 – Produto da síntese de AuNPs à temperatura ambiente, com vazão de 0,05 ml/min, utilizando “Solução A” e “Solução B” no microdispositivo “Reator A” (amostra A01).....	64
Figura 22 – Aspecto visual das amostras resultantes dos experimentos no dispositivo “Reator A”. Da esquerda (maior vazão) para a direita (menor vazão), amostra TA01, TA02, TA03, TA04, TA05 e TA06.....	69
Figura 23 – Aspecto visual das amostras resultantes dos experimentos no dispositivo “Reator B”. Da esquerda (maior vazão) para a direita (menor vazão), amostra TB00, TB01, TB02, TB03, TB04, TB05 e TB06.	69
Figura 24 – Espectro de absorvância de luz das amostras dos experimentos feitos no “Reator A”.....	70
Figura 25 – Espectro de absorvância de luz das amostras dos experimentos feitos no “Reator B”.....	71
Figura 26 – Comprimento de onda do pico de absorvância de luz das amostras dos	

experimentos feitos no “Reator B”	72
Figura 27 – Aspecto visual das triplicatas feitas na condição do experimento TB02. A) triplicata 1; B) triplicata 2.	73
Figura 28 – Espectro de absorvância de luz das amostras RB02_R1 a RB02_R6...	74
Figura 29 – Aspecto visual das amostras RB03 (50°C), RB04 (75°C) e RB05 (100°C).	77
Figura 30 – Espectro de absorvância de luz das amostras RB02 (25°C), RB03 (50°C), RB04 (75°C) e RB05 (100°C).	78
Figura 31 – Espectro de absorvância de luz da amostra RB02 ao longo do tempo. A) armazenada à temperatura ambiente; B) armazenada em geladeira.	79
Figura 32 – Espectro de absorvância de luz da amostra RB03 ao longo do tempo. A) armazenada à temperatura ambiente; B) armazenada em geladeira.	80
Figura 33 – Amostras no dia zero. A) RB02; B) RB03.	81
Figura 34 – Amostras após 42 dias de armazenamento. A) RB02 armazenada à temperatura ambiente; B) RB02 armazenada sob refrigeração; C) RB03 armazenada à temperatura ambiente; D) RB03 armazenada sob refrigeração.	81
Figura 35 – Aspecto visual das reações de Turkevich feitas no “Reator B”. A) tempo de residência de 900 s (amostra BTurk02); B) tempo de residência de 300 s (amostra BTurk01).	82
Figura 36 – Espectro de absorvância de luz da amostra BTurk01 (reação de Turkevich com tempo de residência de 300 s).	83
Figura 37 – Espectro de absorvância de luz da amostra BTurk02 (reação de Turkevich com tempo de residência de 900 s).	83
Figura 38 - Condições de experimento e resultados das sínteses pelo método de Turkevich adaptado com concentrações iniciais de NaCt de 7,5 mM e cloreto de ouro de 2,5 mM. A) Amostra BRob01 (tempo de residência de 300 s); B) Amostra BRob02 (tempo de residência de 90 s).	85
Figura 39 – Espectro de absorvância de luz das amostras BRob01 (tempo de residência de 300 s) e BRob02 (tempo de residência de 90 s) de 360 nm a 800 nm	

.....	86
Figura 40 – Espectro de absorvância de luz das amostras BRob01 (tempo de residência de 300 s) e BRob02 (tempo de residência de 90 s) de 190 nm a 320 nm.	87
.....	87
Figura 41 – Aspecto visual das amostras resultantes dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura. A) 25°C; B) 35°C; C) 45°C; D) 55°C; E) 65°C; F) 75°C; G) 85°C; H) 95°C; I) 100°C.	88
Figura 42–Tamanho de partícula e polidispersão das amostras resultantes dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura de síntese.	89
Figura 43 – Espectro de absorvância de luz das amostras resultantes dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura de síntese.	90
Figura 44 - Espectro de absorvância de luz de 190 nm a 320 nm das amostras resultantes dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura de síntese.	91
.....	91
Figura 45 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs obtidas pela síntese a 25°C. A) ampliação com escala de 100 nm; B) ampliação com escala de 50 nm.	92
Figura 46 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs obtidas pela síntese a 60°C. A) ampliação com escala de 200 nm; B) ampliação com escala de 100 nm.	93
Figura 47 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs obtidas pela síntese a 95°C.	93
Figura 48 – Aspecto visual de amostra resultante da síntese de AuNPs com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” conduzida a 25 °C. A) Sem nenhum tratamento adicional; B) Após 1h em banho a 100 °C.	95

- Figura 49 - Amostra resultante da síntese de AuNPs com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” conduzida a 25 °C, antes e depois da adição de β -mercaptoetanol. A) aspecto visual; B) gráfico de absorvância UV-visível; C) resultado das análises de potencial zeta e tamanho de partícula.....96
- Figura 50 – Espectro de absorvância UV-visível das sínteses de AuNPs conduzidas à temperatura ambiente no dispositivo “Reator B” com tempo de residência de 90s a sal de ouro 2,5 mM, com diferentes concentrações de ácido tânico como agente redutor e estabilizador.98
- Figura 51 – Espectro de absorvância de luz entre 190 nm a 320 nm das amostras resultantes das sínteses com sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” à temperatura ambiente utilizando diferentes concentrações iniciais de ácido tânico como agente redutor e estabilizador. 100
- Figura 52 – Espectro de absorvância de luz dos produtos das sínteses de AuNPs com ácido tânico 0,10 mM como agente redutor e diferentes concentrações de NaCt como agente estabilizador, utilizando sal de ouro 2,5 mM, temperatura ambiente, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B”. 102
- Figura 53 – Imagens de TEM dos produtos das sínteses realizadas utilizando ácido tânico 0,10 mM com diferentes concentrações de NaCt, variando em: A e B) 1,3 mM; C e D) 2,5 mM; E e F) 5,0 mM; G e H) 7,5 mM. 103
- Figura 54 – Espectro de absorvância de luz entre 190 nm a 320 nm das amostras resultantes das sínteses com ácido tânico 0,10 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” à temperatura ambiente utilizando diferentes concentrações iniciais de NaCt como agente estabilizador..... 105
- Figura 55 – Curvas de adsorção de rGFP na superfície de AuNPs com características de tamanho e morfologia distintas. NaCt25) bastões com tamanho médio de 19,1 nm; NaCt95) formas variadas com tamanho médio de 108,4 nm; TA+NaCt) esferas com tamanho médio de 79,5 nm..... 106
- Figura 56 – Imagens de MET das amostras M25, M45, M60 e M95 utilizadas nos ensaios funcionalização das AuNPs com RBD. 108
- Figura 57 – Curvas de adsorção de RBD na superfície de AuNPs dos grupos M25,

M45, M60 e M95. 109

Figura 58 – Imunização piloto para avaliar o potencial da formulação contendo M95+RBD. Camundongos C57/Bl-6 com idade de 6 a 8 semanas (n=5/grupo) receberam, por via subcutânea, 10 µg de RBD conjugado ou não a AuNPs. Os títulos de anticorpos IgG específicos para o RBD foram avaliados por ensaio de ELISA com soros obtidos 13 dias após cada administração da dose. A) desenho do esquema de vacinação realizado; B) títulos de IgG anti-RBD totais gerados 14 dias após cada dose da vacina, obtidos por ELISA; C) títulos das subclasses IgG₁ e IgG_{2c} nos soros obtidos após a administração da terceira dose, medidos por ELISA; D) afinidade dos anticorpos anti-RBD pelo antígeno-alvo por incubação com diferentes quantidades de tiocianato de amônio. Nos ensaios de ELISA, os valores representam a média ± erro padrão dos valores de absorbância obtidos em um ensaio com soros individuais de camundongos, em duplicata, para cada formulação. Os valores observados no grupo controle de solução salina (média + 2x desvio padrão) foram subtraídos dos demais grupos experimentais. As diferenças estatísticas são indicadas no gráfico. *p < 0,01; por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni; E) avaliação do potencial neutralizante de anticorpos específicos anti-RBD. A neutralização viral foi realizada em duplicata para cada diluição. O ensaio considerou apenas 100% de neutralização viral, sendo destacada na figura a última diluição em que nenhuma morte celular foi observada..... 111

Figura 59 – Imunização para avaliar o potencial vacinal de diferentes formulações de AuNP+RBD. Camundongos C57/Bl-6 com idade de 6 a 8 semanas (n=5/grupo) foram imunizados por via subcutânea com 10 µg de RBD isolada ou conjugada a AuNPs dos diferentes grupos. Os títulos de anticorpos IgG específicos para o RBD foram avaliados por ensaio de ELISA com soros obtidos 13 dias após cada administração da dose. A) regime de vacinação utilizado na imunização; B) ensaio de ELISA para determinar os títulos de IgG anti-RBD totais gerados 14 dias após cada dose da vacina; C) títulos das subclasses IgG₁ e IgG_{2c} nos soros obtidos após a administração da terceira dose, medidos por ELISA. Para todos os ensaios de ELISA, os valores representam a média ± erro padrão dos valores de absorbância obtidos em um ensaio com soros individuais de camundongos, em duplicata, para cada formulação. Os valores observados no grupo controle de solução salina (média + 2x desvio padrão) foram subtraídos dos demais grupos experimentais. As diferenças estatísticas são

indicadas no gráfico. **p < 0,01; *** p < 0,001 por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni; D) avaliação do potencial neutralizante de anticorpos específicos anti-RBD. A neutralização viral foi realizada em duplicata para cada diluição. O ensaio considerou apenas 100% de neutralização viral, sendo destacada na figura a última diluição em que nenhuma morte celular foi observada. 113

Figura 60 – Análise espectrofotométrica das nanopartículas funcionalizadas com RBD após 0, 5 e 15 dias de armazenamento a 4°C. A) M45+RBD; B) M60+RBD. 116

Figura 61 – Ensaio de citotoxicidade NRU das formulações com RBD, M45, M60, M45+RBD e M60+RBD em três diferentes concentrações adicionadas às células NCTC 929 (mais diluída, intermediária e mais concentrada). Para o "ensaio 1x", um volume de 10 µL de AuNPs + 10 µL de RBD (6 µg) foi aplicado em uma placa de 96 poços (10⁵ células), o que representa uma alta exposição das células às nanopartículas conjugadas quando comparado às condições in vivo observadas após a administração da vacina..... 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos de produção de AuNPs por plataformas microfluídicas.	35
Tabela 2 – Especificações dos microdispositivos construídos	43
Tabela 3 - Amostras da solução precursora preparadas em concentrações de 1,25mM a 0,01mM para avaliar a sensibilidade do método usado para verificar a conversão do sal de ouro.....	57
Tabela 4 – Condições de experimento e resultados das sínteses no dispositivo “Reator A”	67
Tabela 5 – Condições de experimento e resultados das sínteses no dispositivo “Reator B”	67
Tabela 6 – Resultados das triplicatas 1 e 2 das sínteses com tempo de residência de 32,3 s à temperatura ambiente no dispositivo “Reator B” a partir das soluções “Solução A” e “Solução B”.	73
Tabela 7 – Área sob a curva do espectro de absorvância de luz integrada de 360 nm a 800 nm das triplicatas 1 e 2 das sínteses com tempo de residência de 32,376 s à temperatura ambiente no dispositivo “Reator B” a partir das soluções “Solução A” e “Solução B”	75
Tabela 8 - Condições de experimento e resultados das sínteses no dispositivo “Reator B” com variação da temperatura de reação	76
Tabela 9 - Condições de experimento e resultados das sínteses pelo método de Turkevich adaptado com concentrações iniciais de NaCt de 7,5 mM e cloreto de ouro de 2,5 mM	84
Tabela 10 – Resultados das sínteses dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura.	88
Tabela 11 - Resultados das sínteses de AuNPs com ácido tânico como agente redutor e estabilizador em diferentes concentrações, utilizando sal de ouro 2,5 mM, temperatura ambiente, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B”.	97
Tabela 12 - Resultados das sínteses de AuNPs com ácido tânico 0,10 mM como agente redutor e diferentes concentrações de NaCt como agente estabilizador,	

utilizando sal de ouro 2,5 mM, temperatura ambiente, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B”.....	101
Tabela 13 – Tamanho de partícula e dispersão de tamanhos das amostras M25, M45, M60 e M95 antes e depois da interação com a proteína RBD (DLS é apresentado em número).....	108
Tabela 14 – Resultado de tamanho médio de partícula na ausência e na presença de NaCl 1M por número e por intensidade utilizando DLS para os complexos M45+RBD e M60+RBD.....	117

SUMÁRIO

1. Revisão Bibliográfica.....	22
1.1 Vetores de Entrega de Biomoléculas	22
1.2 Vacinas de Subunidade e Vírus Artificiais.....	23
1.3 Microfluídica e a formação de nanopartículas.....	25
1.4 Nanopartículas de ouro	28
1.4.1 Características e aplicações biomédicas.....	28
1.4.2 Síntese de AuNPs	32
2. Objetivo.....	40
3. Materiais e métodos.....	41
3.1 Construção dos dispositivos microfluídicos.....	41
3.1.1 Projeto técnico das geometrias dos canais	41
3.1.2 Construção do dispositivo microfluídico.....	44
3.1.3 Montagem do aparato experimental em microfluídica	48
3.2 Reagentes.....	50
3.3 Metodologia analítica	51
3.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz ou <i>Dinamic Light Scattering</i> (DLS)	51
3.3.2 Espectrofotometria UV-visível.....	51
3.3.3 Determinação do Potencial Zeta.....	51
3.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	52
3.4 Testes exploratórios.....	52
3.4.1 Avaliação de diferentes geometrias do misturador	53
3.4.2 Avaliação de reprodutibilidade.....	53
3.4.3 Avaliação da influência da temperatura de reação.....	53
3.4.4 Avaliação de estabilidade	54
3.5 Reprodução da reação clássica de Turkevich.....	54

3.6	Método de Turkevich adaptado.....	55
3.6.1	Variação da concentração inicial dos reagentes	55
3.6.2	Variação da temperatura de reação	55
3.7	Sínteses com ácido tânico	56
3.7.1	Sínteses com ácido tânico e citrato de sódio.....	56
3.8	Análise da conversão de cloreto de ouro	56
3.9	Funcionalização da superfície das AuNPs com proteínas	58
3.9.1	Funcionalização com r-GFP	58
3.9.2	Funcionalização com RBD	59
3.10	Estudos de citotoxicidade <i>in vitro</i>	60
3.11	Estudos de aplicação <i>in vivo</i>	61
3.11.1	Análise de dos níveis de anticorpos IgG, subclasse e afinidade	62
3.11.2	Avaliação do potencial imunizante dos anticorpos anti-RBD.....	62
3.11.3	Análise estatística.....	63
4.	Resultados e Discussão.....	64
4.1	Ensaio exploratórios de síntese de AuNPs	64
4.1.1	Avaliação de diferentes geometrias do misturador	65
4.1.2	Avaliação de reprodutibilidade.....	72
4.1.3	Avaliação da influência da temperatura de reação	75
4.1.4	Avaliação de estabilidade	79
4.2	Reprodução da reação clássica de Turkevich.....	81
4.3	Método de Turkevich adaptado.....	84
4.3.1	Variação da concentração inicial dos reagentes	84
4.3.2	Variação da temperatura de reação	87
4.4	Síntese de AuNPs com ácido tânico	96
4.4.1	Sínteses com ácido tânico e citrato de sódio.....	100

4.5	Funcionalização da superfície das AuNPs com proteínas	105
4.5.1	Funcionalização com r-GFP	105
4.5.2	Funcionalização com RBD	107
4.6.	Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	109
4.7.	Estudos de estabilidade dos complexos AuNPs+RBD.....	115
4.8.	Estudos de citotoxicidade <i>in vitro</i>	118
5.	Conclusões	120
6.	Referências Bibliográficas.....	123

INTRODUÇÃO

As nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam propriedades físico-químicas diferenciadas em relação ao mesmo material em maior escala. A possibilidade de controle de tamanho e forma das partículas faz com que as AuNPs tenham potencial de aplicação em diversas áreas do conhecimento, tais como catálise, tecnologia da informação, energia, biomedicina, plasmônica, fotônica, entre outras. Devido à sua biocompatibilidade, natureza inerte, propriedades ópticas e eletrônicas únicas e facilidade de funcionalização de sua superfície com biomoléculas, AuNPs de diferentes formas e tamanhos têm sido amplamente estudadas para aplicações biomédicas em diagnósticos e entrega de fármacos e outras biomoléculas de interesse médico, dado que as propriedades físico-químicas dessas partículas diferem significativamente entre si de acordo com a sua morfologia. Estudos com AuNPs de formas complexas, como nanogaiolas e nanoestrelas, por exemplo, se mostraram interessantes para aplicação em entrega de fármacos e tratamento de câncer, respectivamente.

A síntese de AuNPs com diferentes tamanhos e morfologias requer um ajuste complexo de processo. Na síntese em *bulk* com o uso de reatores em tradicionais, fatores termodinâmicos e cinéticos da reação são de difícil controle, resultando em limitação do rendimento e baixa reprodutibilidade. Sistemas microfluídicos de fluxo contínuo, por outro lado, apresentam controle preciso, rápida transferência de calor e massa, grandes superfícies de reação em relação ao volume de fluidos e facilidade de escalonamento, podendo, portanto, trazer uma solução para a produção controlada e reprodutível de AuNPs, tendo em vista uma ampla gama de aplicações, inclusive na área farmacêutica.

Este trabalho buscou desenvolver um processo microfluídico de síntese de AuNPs com diferentes tamanhos e morfologias, de forma controlada e reprodutível, para utilização em formulação de vacina de subunidade. As AuNPs produzidas foram funcionalizadas com proteínas recombinantes e a influência das diferentes características das partículas produzidas foi avaliada na aplicação em vacina de subunidade. As AuNPs foram sintetizadas por processo microfluídico e caracterizadas quanto aos principais fatores que podem influenciar na formação dos complexos AuNPs+proteína e na aplicação farmacêutica: tamanho, morfologia, carga superficial

e estabilidade. Os complexos AuNP+proteína também foram caracterizados e, então, avaliados quanto à citotoxicidade utilizando-se células de mamífero e quanto à funcionalidade biológica, através de estudos *in vivo* realizados em colaboração com o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Parte dos resultados apresentados nessa tese foram publicados nos periódicos *Microfluidics and Nanofluidics* [1] e *Applied Nanomaterials* [2].

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Vetores de Entrega de Biomoléculas

Nos últimos anos, diversos estudos vêm demonstrando a eficácia de materiais nanométricos para direcionamento de fármacos [3] e biomoléculas [4], diagnóstico [5] e terapias [6]. Uma das abordagens de maior sucesso se trata da aplicação de nanopartículas dispersas carregadas com um ingrediente ativo [7]. Idealmente, esses complexos carreadores devem ser pequenos o suficiente para passar pelo sistema capilar do paciente e consistir em materiais não tóxicos e biodegradáveis, que combinem propriedades adequadas de liberação e direcionamento [7].

A escolha de um vetor seguro, estável e eficiente para proteger, apresentar e transportar a biomolécula de interesse no organismo ainda representa um grande desafio [8]. De forma geral, esses vetores são classificados como vetores virais e não-virais e a escolha daquele a ser utilizado baseia-se, principalmente, na aplicação de interesse, na natureza da biomolécula transportada e na reação esperada do organismo frente à apresentação dessa biomolécula. Vetores virais continuam a ser os mais eficientes para entrega intracelular, pois suas características naturais permitem o reconhecimento celular mediado por receptores específicos, internalização, escape de vesículas endossomais, transporte ao longo de microtúbulos e translocação nuclear. Nas terapias antitumorais, por exemplo, são utilizados geralmente vírus geneticamente modificados com capacidade de transferir material genético para células cancerígenas a fim de restaurar a expressão de genes supressores de tumores, reduzir a expressão de oncogenes ativos e/ou expressar genes suicidas. Além disso, um efeito adicional destes vírus é a capacidade de gerar uma resposta imunológica no organismo que leva a morte das células tumorais, infectadas ou não [9]. O primeiro vírus oncolítico a receber a aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*) foi um tratamento para melanoma conhecido como *Talimogene laherparepvec* (Imlygic®). Apesar do enorme potencial, vetores virais são complexos e custosos de se produzir, além de estarem associados a respostas imunológicas e inflamatórias algumas vezes graves [10–12]. Considerados mais seguros, os vetores não-virais são menos eficientes no transporte intracelular quando comparados aos vetores virais, devido à elevada degradação das biomoléculas por enzimas extra e intracelulares, dificuldade de direcionamento para o tecido ou células

alvo, baixa internalização e locomoção da molécula de interesse no congestionado ambiente intracelular, além da dificuldade de superar a barreira representada pela membrana nuclear [13].

1.2 Vacinas de Subunidade e Vírus Artificiais

Uma vacina pode ser definida como uma preparação biológica que contribui para a imunidade ativa contra uma doença específica. A vacinação envolve a exposição de um antígeno, derivado de um agente causador de doença, ao sistema imunológico, com o objetivo de desenvolver imunidade ativa contra o antígeno exposto. As propriedades ideais de uma vacina incluem imunidade duradoura, ausência de autoimunidade ou hipersensibilidade, estabilidade e segurança [14].

A estratégia de utilização de vacinas de subunidade, nas quais os únicos componentes biológicos administrados são aqueles necessários para produzir uma resposta imune apropriada (por exemplo, proteína/peptídeo do capsídeo viral), é uma estratégia para melhorar significativamente a segurança das formulações [15], permitindo o desenvolvimento de vacinas cujas abordagens tradicionais falharam (por exemplo, vacinas contra o HIV) [16]. As vacinas de subunidades podem direcionar respostas imunológicas para epítomos específicos e permitir a incorporação de componentes sintéticos, incluindo um ou mais antígenos e adjuvantes [17]. Outros componentes podem também ser adicionados para melhorar as características da vacina (por exemplo, estabilidade, potência, eficácia de proteção e o número de doses necessárias), incluindo sistemas de entrega (por exemplo, emulsões, lipossomas e polímeros) e unidades carreadoras capazes de direcionar o antígeno para células específicas do sistema imunológico (tais como células dendríticas). [18]

Estruturas compostas por biomoléculas (por exemplo, uma subunidade proteica com função antigênica) expostas na superfície de uma partícula que atua como um sistema de entrega podem ser utilizadas para simular a apresentação de uma unidade viral verdadeira, sendo chamadas de “vírus artificiais” (ou *Virus-Like Particles* - VLP). Uma vez que vetores virais são considerados pouco seguros e vetores não-virais pouco eficientes, foi criado o conceito de VLP, que seria um sistema capaz de unir a segurança de vetores não-virais à eficiência de vetores virais, o que pode ser obtido adicionando-se (i) ligantes de diferentes naturezas que estimulam o direcionamento celular e facilitam a entrada na célula, (ii) peptídeos fusogênicos que

evitam a degradação endossomal, (iii) sinais de localização nuclear que tornam a entrada no núcleo mais eficiente, sempre associados em diferentes combinações com a biomolécula de interesse em busca de mimetizar os vírus verdadeiros [19,20].

Uma vez que o VLP pode ser formado pela complexação entre uma nanopartícula de diversas naturezas e biomoléculas antigênicas, é importante que estas moléculas sejam incorporadas sem inibir ou dificultar a função do vetor em si [21]. As proteínas podem ser consideradas as moléculas mais convenientes para mimetizar os vírus, uma vez que são de fato responsáveis pelas funções biológicas, conferem especificidade às interações moleculares e são, ainda, biocompatíveis [6].

A aplicação de nanopartículas proteicas para a entrega de antígenos e fármacos apresenta a possibilidade de utilizar um sistema ideal, que alia biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade [12]. Apesar do grande potencial, o emprego terapêutico de nanopartículas proteicas ainda apresenta desafios importantes a serem superados. Dois importantes desafios, ainda pouco explorados, são a capacidade de direcionamento para células alvo e a estabilidade das nanopartículas unicamente proteicas em fluidos biológicos [21,22].

Para solucionar as limitações de estabilidade e direcionamento de proteínas às células alvo em formulações de vacina, estudos têm focado no desenvolvimento de carreadores [23–26]. As propriedades físico-químicas dos carreadores que compõem os sistemas de entrega podem ser otimizadas para alcançar melhorias na apresentação do antígeno, no escape endossomal, na biodistribuição de partículas e no tráfego celular. Lipossomas, VPLs, micro e nanopartículas poliméricas e inorgânicas vêm sendo estudados. Alguns destes veículos particulados também apresentam propriedades adjuvantes [14].

Para facilitar a entrega direcionada e a apresentação de biomoléculas a células específicas, nanopartículas metálicas conjugadas estão sendo amplamente estudadas em diversas aplicações biomédicas. Especificamente, as nanopartículas de ouro se mostram uma escolha preferencial devido à sua facilidade de síntese e funcionalização e baixa toxicidade [27]. A conjugação de biomoléculas a superfícies de nanopartículas metálicas facilita a entrega direcionada dessas moléculas a vários tipos de células, possibilitando o uso dessa estratégia em entrega de genes [4], entrega de fármacos [28], desenvolvimento de vacinas [29] e outras aplicações

terapêuticas e de diagnóstico [27]. Os vetores artificiais formados por nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com biomoléculas apresentam inúmeras vantagens em relação às mesmas moléculas não conjugadas, como aumento da estabilidade, diminuição do *clearance* renal (aumento de meia-vida) e melhor exposição ao sistema imunológico [27].

O desenvolvimento de uma ampla variedade de nanopartículas com modificações específicas tem um impacto considerável na eficácia das vacinas. Compreender a dinâmica destes carreadores, com base nas suas propriedades físico-químicas, possibilita alcançar um melhor controle quanto a toxicidade, estabilidade do antígeno e imunogenicidade. [14] Apesar de avanços terem sido feitos, uma melhor compreensão dos efeitos que as diferentes moléculas e domínios utilizados exercem sobre o mecanismo de formação e estabilidade das nanopartículas precisa ser adquirida. De forma geral, essa compreensão tem sido comprometida pela falta de estudos sistemáticos e comparativos [21,30].

1.3 Microfluídica e a formação de nanopartículas

A microfluídica é um campo multidisciplinar em que pequenas quantidades de fluidos são processadas. Ela utiliza características hidrodinâmicas para controlar a organização de diferentes moléculas dentro de microcanais [31]. Os sistemas microfluídicos operam em regime de escoamento laminar e possuem uma razão área/volume muitas vezes maior que outros sistemas, o que lhes conferem propriedades únicas de transporte de massa. Os sistemas microfluídicos apresentam uma série de características diferenciadas em relação a seus análogos de sistemas convencionais, as quais destacam-se: reações mais rápidas, tamanho mínimo de dispositivos, menor consumo de amostra e reagente, controle preciso de fenômenos de transferência de massa e energia, baixo consumo e dissipação de energia e maior reprodutibilidade [32].

Estudos comparando a produção de nanopartículas em reatores tradicionais e em dispositivos microfluídicos mostram que a via microfluídica resulta em menor variação entre lotes [33,34]. A diferença na reprodutibilidade entre os métodos pode ser atribuída ao controle preciso da mistura e à rápida transferência de massa no processo de nucleação e crescimento das partículas em um micromisturador [34].

Para a obtenção de uma cinética homogênea, os processos de nucleação e crescimento das partículas deve ser preferencialmente iniciado em uma solução homogênea, o que significa que o tempo de mistura dos reagentes deve ser menor que o tempo de início da nucleação [33]. Na prática, porém, as sínteses em reatores tradicionais geralmente não conseguem criar uma condição homogênea na ordem de milissegundos [35]. Dessa forma, o nível de supersaturação local dos reagentes pode ser amplamente alterado, resultando, conseqüentemente, em uma maior variação entre lotes [36]. A via microfluídica, no entanto, tende a aumentar drasticamente a relação área-volume, o que resulta em uma transferência de massa e calor mais eficiente dentro do sistema [37,38]. Dispositivos microfluídicos podem atingir tempos de mistura na ordem de milissegundos, possibilitando que o tempo de mistura seja menor que o tempo de início da nucleação, permitindo que a reação seja iniciada em ambiente homogêneo [33]. Além disso, devido à operação automatizada em fluxo contínuo, os protocolos microfluídicos tendem a estar menos sujeitos a erros aleatórios durante a síntese, contribuindo para resultados mais reproduzíveis [34].

Os dispositivos microfluídicos apresentam grande versatilidade. Podem ser acoplados a sensores [39], controladores [40], outros misturadores em série para execução de diferentes etapas unitárias em um mesmo dispositivo [41], detectores para acompanhamento *on line* do processo [42] ou serem utilizados em etapas *upstream* [43] ou *downstream* [44], dando suporte para processos tradicionais em batelada. Por meio de dispositivos microfluídicos, é possível que se supere obstáculos existentes nos processos convencionais, muitas vezes dispensando etapas adicionais para redução e homogeneização de partículas [45]. Principalmente devido ao seu tamanho reduzido, os dispositivos podem, inclusive, ser utilizados de acordo com as recentes perspectivas de medicina personalizada (que atende características individuais dos pacientes), como terapia gênica e imunoterapias [31]. A Figura 1 ilustra o exemplo de um dispositivo microfluídico genérico contendo duas entradas de reagentes, uma seção de aquecimento e uma seção de mistura (micromisturador) e reação .

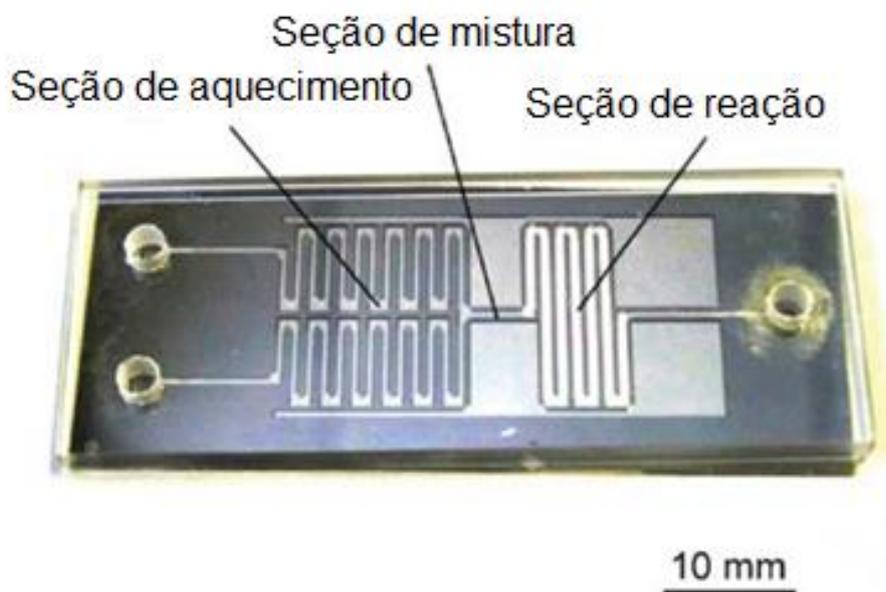


Figura 1 – Exemplo de um dispositivo microfluídico composto por duas entradas de reagentes, uma seção de aquecimento, uma seção de mistura e reação e uma saída de produto. Figura adaptada de [32].

Os micromisturadores são um dos componentes mais importantes de um dispositivo microfluídico, pois têm um impacto considerável na sua eficiência e sensibilidade. Ao contrário dos dispositivos fluídicos em macro-escala, onde a mistura de fluidos muitas vezes depende de efeitos de convecção, a mistura em microescala é frequentemente alcançada nos microcanais com turbulências externas e/ou microestruturas dimensionadas especificamente para obtenção de maior relação de área de superfície para volume, aumentando assim a eficiência de transferência de calor e massa. Em sistemas microfluídicos, as taxas de fluxo dos fluidos são geralmente muito baixas e o regime de escoamento nos microcanais é basicamente laminar com o número de Reynolds <1 , indicando que o fluido flui em camadas paralelas sem ruptura entre as camadas, onde a mistura dos fluidos depende principalmente da difusão, apresentando eficiência de mistura muito baixa. Portanto, é crucial desenvolver micromisturadores eficientes, projetando a estrutura 3D dos microcanais para melhorar a difusão molecular e a advecção caótica para uma mistura eficiente [46].

Em relação a processos de formação de complexos carreadores não-virais, as técnicas recentes que usam dispositivos microfluídicos dividem-se basicamente em

duas: (i) focalização hidrodinâmica: baseia-se na mistura de correntes aquosas em fluxo contínuo, em que a corrente central com a biomolécula de interesse é hidrodinamicamente focalizada por duas correntes laterais, contendo o carreador catiônico, [45,47–49]; (ii) microfluídica de gotas: baseia-se na formação de incubadores na ordem de tamanho de picolitros, no qual as biomoléculas e o carreador catiônico são confinados em gotas formadas por emulsão água em óleo obtidas nos microcanais, com uma etapa adicional de pós-processamento para a separação do solvente orgânico [50,51]. Um exemplo da utilização da primeira técnica foi a obtenção de complexos entre o polímero polietilenoimina (PEI) e pDNA de tamanho reduzido e uniforme, com emprego da técnica de focalização hidrodinâmica, em estudo realizado por Kim e colaboradores [42]. Os complexos obtidos por processo microfluídico apresentaram maior viabilidade celular e uma melhora significativa da expressão gênica que os obtidos em reator tradicional.

Dispositivos microfluídicos para a formação de nanopartículas [52–55] e seus complexos com DNA e proteínas [56–58] se mostram promissores na superação de obstáculos encontrados em processos convencionais, tais como baixa reprodutibilidade, alto consumo de reagentes e dificuldade no controle de transferência de massa e calor. Além disso, o desenvolvimento de novas partículas carreadoras de tamanho e morfologia precisos continua sendo uma importante estratégia para viabilizar e padronizar processos de obtenção de produtos veiculadores de material biológico para aplicações médicas.

1.4 Nanopartículas de ouro

1.4.1 Características e aplicações biomédicas

Nanopartículas de ouro (AuNPs) são definidas como soluções coloidais estáveis de aglomerados de átomos de ouro, com dimensões entre 1 e 100 nm [59]. Na escala nanométrica, o ouro apresenta características físico-químicas diferenciadas, como a mudança de cor de amarelo para vermelho. A cor vermelha das AuNPs esféricas pode ser explicada pela teoria conhecida como *Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado* (RPSL). Segundo essa teoria, quando aglomerados de átomos de ouro encontram o campo eletromagnético da luz incidente, os seis elétrons de superfície livre presentes na banda de condução das NPs oscilam

coletivamente, resultando na absorção da luz na região azul-verde do espectro (~450 nm) e refletindo luz vermelha (~700 nm) [5].

Devido a características favoráveis, como natureza inerte, facilidade de modificação de superfície e baixa citotoxicidade [5,59], vários tipos de AuNPs têm sido usados em aplicações biomédicas: esferas, bastões, estrelas, bi-pirâmides, gaiolas, entre outros. As nanoesferas de ouro possuem diversas características favoráveis: são de fácil síntese, formam coloides estáveis, suas superfícies são fáceis de funcionalizar sem a necessidade de reagentes adicionais e apresentam protocolos de síntese bem estabelecidos [5]. Os nanobastões, por sua vez, possuem algumas desvantagens em relação às esferas: são difíceis de sintetizar em massa, costumam gerar suspensões coloidais pouco estáveis e frequentemente requerem funcionalização da superfície antes da conjugação com biomoléculas [5], porém apresentam características diferenciadas. Os nanobastões de ouro possuem dois modos de ressonância de plasmon de superfície: uma banda de plasmon de superfície longitudinal (dependente do comprimento do bastão) em comprimento de onda de 700 a 1300 nm, e uma banda de plasmon de superfície transversal (dependente da largura do bastão) de 520 nm. Foram demonstradas aplicações de nanobastões de ouro na composição de membranas de separação química [60], sensores biológicos [61] e aplicações relacionadas às suas propriedades térmicas específicas [62]. Outras morfologias mais complexas, como as nanopartículas ocas, têm atraído interesse especialmente em entrega de fármacos e aplicações em teranóstico, onde as moléculas podem ser carregadas e entregues ao alvo eficientemente devido à estrutura oca das NPs [5]. Exemplos de diferentes formatos de nanopartículas de ouro podem ser vistos na Figura 2 [5].

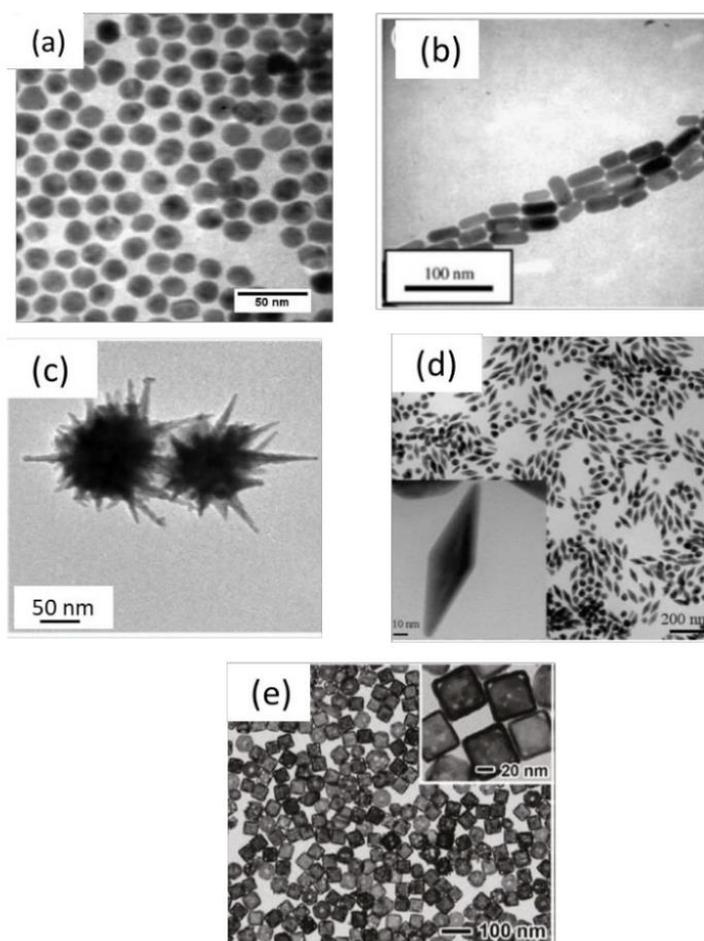


Figura 2 – Vários tipos de AuNPs: a) esféricas; b) bastões; c) estrelas; d) bi-pirâmides; e) gaiolas [5].

AuNPs de morfologias bastante específicas vêm sendo aplicadas também em outras áreas da medicina que não envolvem a entrega de biomoléculas [28]. Nanoestrelas de ouro, por sua vez, têm sido estudadas para uso em tratamento de câncer. Os elétrons nas superfícies das estruturas das pontas são capazes de capturar a luz e liberar calor em temperaturas maiores em comparação às nanoesferas de ouro, além de absorverem luz de baixa energia, que é mais segura para células saudáveis atingidas pela radiação [5].

A conjugação de nanopartículas de metais nobres com biomoléculas tem sido usada para criação de novos complexos com características únicas para direcionamento e apresentação dessas moléculas específicas. A bioconjugação de AuNPs normalmente ocorre por meio de quatro abordagens principais: adsorção eletrostática, conjugação do ligante na superfície da NP, conjugação a uma pequena

molécula de cofator ao qual uma proteína se liga, e a conjugação direta à superfície da AuNP [5,63]. Tais abordagens estão ilustradas na Figura 3.

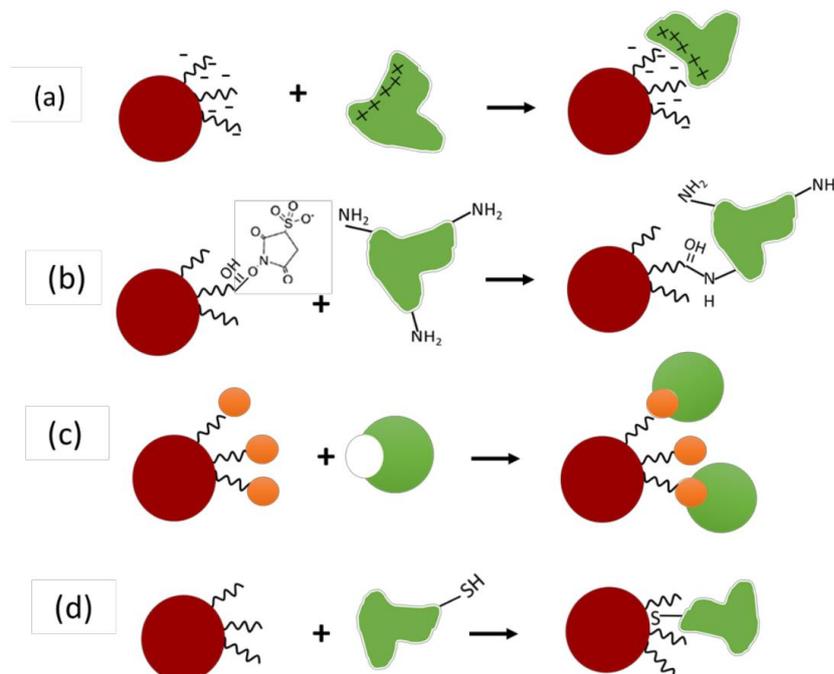


Figura 3 - Principais abordagens para bioconjugação de AuNPs. a) adsorção eletrostática de uma proteína; b) ligação covalente ao ligante da AuNP; c) conjugação de um cofator de proteína à AuNP; d) a conjugação direta de um aminoácido à superfície da AuNP [5].

A adsorção de biomoléculas diretamente à superfície de materiais não-particulados frequentemente resulta na sua desnaturação e perda de atividade biológica. As AuNPs, porém, vêm se mostrando boas opções de plataformas de imobilização [5]. Quando biomoléculas são adsorvidas na superfície das AuNPs, elas geralmente mantêm a atividade biológica e estabilidade devido à alta biocompatibilidade e à alta energia livre de superfície das AuNPs [64]. Comparado a superfícies lisas de ouro, as AuNPs possuem área superficial muito maior, facilitando a ligação de uma grande quantidade de proteína [5].

Embora estáveis, as AuNPs podem ser funcionalizadas com proteínas, seja através de interações eletrostáticas ou através de ligações covalentes, como a ligação via grupo tiol de resíduos de cisteína expostos na superfície das proteínas [65]. O tamanho e a forma das AuNPs, no entanto, têm um impacto importante na biodistribuição in vivo, citotoxicidade, depuração renal, captação celular,

apresentação de antígeno e imunogenicidade [66,67]. No contexto da formulação de vacinas, todas essas variáveis estão interligadas. Além disso, embora vários estudos tenham abordado alguns desses fatores, nenhum estudo sistemático foi encontrado na literatura sobre o melhor tamanho e morfologia das AuNPs para cada tipo de uso [66].

1.4.2 Síntese de AuNPs

Diversos métodos para síntese de NPs são relatados na literatura. Em termos gerais, esses métodos podem ser classificados em métodos baseados em fase gasosa e em fase líquida. Em métodos baseados em fase gasosa, o material em *bulk* é evaporado utilizando fontes de alta energia, como aquecimento resistivo e lasers, para obtenção de uma fase gasosa supersaturada, que, sob condições controladas, produz núcleos que crescem e se tornam nanopartículas [68]. Já nos métodos de fase líquida, também conhecidos como métodos úmidos, os precursores reagem para formar uma solução supersaturada, que dá origem a partículas que variam de 1 a 100 nm em tamanho, com estabilidade variando de algumas horas a anos.

Os métodos mais empregados são os de síntese úmida, devido a dois principais motivos: são energeticamente mais eficientes e geralmente utilizam equipamentos comuns disponíveis em um laboratório [68]. Uma estratégia de síntese úmida é a mistura de dois reagentes, geralmente ambos em forma de micelas reversas, formando NPs por precipitação. O tamanho das partículas é controlado pelas taxas de nucleação e crescimento, e a estabilidade é fornecida pela adsorção do surfactante [68]. Em outra estratégia, a precipitação é realizada em massa na presença de estabilizantes que se adsorvem nas NPs e evitam sua aglomeração [68].

Existem diversas rotas de síntese de AuNPs relatadas na literatura, que resultam em partículas com diferentes características. O método mais conhecido, proposto por Turkevich em 1951 [69], consiste na redução de um sal de ouro por citrato a 100°C. Nesse método, a redução de uma solução de ácido cloroáurico é iniciada por citrato de sódio pela fervura do líquido sob agitação constante. Quando a solução de sal entra em ebulição, uma solução de citrato pré-aquecida é adicionada. Depois de um período definido (normalmente em torno de 15 minutos), o líquido contendo as AuNPs formadas pela redução do sal de ouro (Au^{+3}) a ouro metálico (Au^0) é resfriado em temperatura ambiente [70].

Atualmente, uma variação do método de Turkevich, conhecida como método do citrato, é um dos métodos mais comuns de síntese de AuNPs esféricas monodispersas [71]. Em contraste com o procedimento original, esse método pode também ser iniciado por uma simples exposição à luz UV de uma mistura de citrato e sal de ouro à temperatura ambiente. A precipitação direta através do método do citrato é amplamente utilizada por produzir partículas descobertas, porém estáveis, devido ao fato dos ânions de citrato serem tanto bons agentes redutores quanto estabilizantes eficientes [68,71]. O uso de ácido ascórbico e ascorbato de sódio é uma variação desse método, sendo uma forma similarmente simples de produzir AuNPs em temperatura ambiente [71].

Embora um grande progresso tenha sido feito na síntese de AuNPs com um alto grau de monodispersidade, a síntese dessas partículas com diferentes tamanhos e morfologias ainda requer um processo de ajuste complicado para um controle preciso dos fatores termodinâmicos e cinéticos da reação. Durante a síntese de nanopartículas em *bulk*, os processos de nucleação, crescimento e aglomeração ocorrem inevitavelmente ao mesmo tempo. A falta de controle dos parâmetros de reação durante o processo de crescimento do cristal resulta em uma alta variação lote a lote tanto na morfologia quanto na distribuição de tamanhos das NPs. Além disso, o aumento na escala de uma síntese em *bulk* agrava os problemas transferência de massa e energia, o que leva a uma população polidispersa de NPs com características físicas e químicas diversas [57].

A miniaturização dos sistemas em *bulk* pode contornar os problemas de baixa reprodutibilidade graças ao seu melhor controle nas condições de reação [57]. Em particular, os sistemas microfluídicos de fluxo contínuo, em contraste com os sistemas em batelada convencionais, estão sendo amplamente estudados devido ao seu controle preciso das condições de processo, rápida transferência de calor e massa, alta eficácia de mistura (o que garante que a reação seja iniciada em ambiente homogêneo, uma vez que a nucleação na síntese de AuNPs se inicia nos primeiros 100 ms [72–74]) e por serem compatíveis com análise *on-line* [57]. Dentro de um sistema microfluídico, os estágios de nucleação e crescimento da formação de NPs podem ser isolados em função da posição onde a mistura da solução ocorre, podendo resultar em maior controle no tamanho de partícula, distribuição de tamanhos, morfologia e, portanto, maior reprodutibilidade [75].

Com a integração das caracterizações *on-line* e *on demand*, espera-se que a microfluídica seja uma plataforma promissora para otimizar a produção de nanopartículas para diferentes aplicações [57]. A Tabela 1 mostra alguns estudos que vêm sendo feitos nos últimos anos sobre a produção de AuNPs em plataformas microfluídicas, bem como seus resultados obtidos.

Tabela 1 – Estudos de produção de AuNPs por plataformas microfluídicas.

Referência	Condições			Reator			Análises	Resultados		
	Reagentes	Vazão	Temperatura	Material	Geometria	Volume		Tamanho da NP	Polidispersão	Formato da NP
[76]	3.8 mM NaBH ₄ ; HAuCl ₄ 1mM e TTABr 20mM; Fluido segmentado: ar, tolueno e óleo de silicone	Tempo de residência 10s. Redutor 27 µL/min; precursor de ouro 273 µL/min; fluido segmentado 300 µL/min	100°C	Reator de silicone/Pyrex MFR, tubos e conexões de PEEK e teflon	3 entradas (corrente 1: agente redutor; corrente 2: precursor de ouro; corrente 3: fluido segmentado, 2 regiões (mistura - fria; reação - quente)	Região de reação: volume 100 µL, channel cross-section 400 µm x 400 µm	TEM	3.8 ± 0.3 nm	"Baixa"	Não especificado
[55]	Solução de HAuCl ₄ 30% g/g (2.5 mmol/L), redutor Na ₃ Ct (0.5mmol/L e 1.0 mmol/L), óleo mineral	40 µL/min e 100 µL/min	90°C	PMMA e PLA	3 entradas (corrente 1: óleo mineral; correntes 2 e 3: reagentes)	Canais de 700 µm x 700 µm (largura x altura)	Espectro UV-visível e FESEM	Entre 20 e 35 nm	"Baixa"	Várias morfologias
[53]	HAuCl ₄ (III), solução de amônia 25% (para limpeza dos fios de Ni), etanol 99.5%, fios de Ni	3 µL/min de HAuCl ₄	25°C	Fios de Ni. Chip de PMMA (1.2 e 1.5mm espessura), superfície de PS (0.8mm espessura)	3 canais	4mm largura, 25mm comprimento, 1.2mm espessura	SEM com EDX e Espectro UV-visível	Eixos x-, y-, e z-: 1.118 ± 0.20 µm, 1.075 ± 0.15 µm, e 1.618 ± 0.15 µm	Não especificado	Nanodendritos com diferentes graus de ramificação
[77]	HAuCl ₄ (30%), Na ₃ Ct	Não controlada (capilaridade)	25°C, 50°C e 90°C	Fios de algodão branco 0.3mm e ABS	Reservatório de solução, fio de algodão, fita adesiva e pilar de fixação	Não especificado	SEM	Entre 20 e 40 nm	Não especificado	Esféricas
[56]	AuCl ₃ (solução 30%), CTABr, solução de cloreto (30%), NaBH ₄ , L-ácido ascórbico, H ₃ AuBr ₄ O, ácido 5-bromosalicílico, SH-PEG (Mn 800)	Entradas: 1- 5.85mL/h; 2- 5.85mL/h; 3- 0.67mL/h; 4- 0.62mL/h; 5- 0.62mL/h; 6- 3.4mL/h	Não especificado	Não especificado	4 estágios: 1- ativação do precursor de ouro; 2- formação de sementes de Au; 3- formação de nanovaras; 4- funcionalização das nanovaras	Não especificado	LMA, EDS, TEM	Entre 10 e 50 nm com diferentes AR	Não especificado	Nanobastões

Tabela 1 – Estudos de produção de AuNPs por plataformas microfluídicas (continuação).

Referência	Condições			Reator			Análises	Resultados		
	Reagentes	Vazão	Temperatura	Material	Geometria	Volume		Tamanho da NP	Polidispersão	Formato da NP
[52]	CTAB, CTAC, H _{Au} Cl ₄ , AgNO ₃ , ácido ascórbico, K ₂ PdCl ₄ , NaBH ₄	Total: 360 µl/min a 520 µl/min	Não especificado	Silicone, SU-8, PDMS. Tubos de PTFE	Microcanais em forma de S	Canais de 100 µm x 200 µm (profundidade x comprimento)	SEM, Espectro UV-visível	Diversos tamanhos e razões	Não especificado	Nanobipirâmides
[41]	H _{Au} Cl ₄ , NaBH ₄ , NaOH, PVP (40kDa), THPC, H ₂ SO ₄	2.6 L/h	Ambiente	Silicone, vidro, revestimento interno de Ombrello (material comercial hidrofóbico)	Duas entradas. Região de leitura de raio-x	Microcanal de 300 x 300 µm ²	Espectro UV-visível, TEM	2.5 nm	"Baixa"	Esféricas
[78]	H _{Au} Cl ₄ , gás CO (99.5%)	Líquido: 0.5 ml/min; Gás 0.025 a 0.25 ml/min	Ambiente	PTFE (9.5 cm x 7.5 cm)	Total de 100 bobinas de 1cm de diâmetro. Ângulo de 90° entre as seções da bobina, cada seção contendo 5 bobinas	Não especificado	Espectro UV-visível, DCS, TEM, DLS, ATR-FTIR, Raman	3.1 a 26.6 nm	<5%	Não-esféricas
[58]	H _{Au} Cl ₄ , brometo de tetraoctilamonio, tolueno, 1-dodecanotiol, NaBH ₄	400, 600 e 800 mL/min	Ambiente	Vidro	Misturador interdigitado radial de 3 camadas. Os fluxos de entrada são direcionados para dois canais circulares que dividem o fluxo em 8 lâminas com câmara de mistura central	Microcanais estruturados com profundidade 60µm e largura de 150 µm	1H NMR, espectro UV-visível, TEM	2.3 a 7 nm	Menor que as NPs feitas em reator tradicional	Não especificado

Tabela 1 – Estudos de produção de AuNPs por plataformas microfluídicas (continuação).

Referência	Condições			Reator			Análises	Resultados		
	Reagentes	Vazão	Temperatura	Material	Geometria	Volume		Tamanho da NP	Polidispersão	Formato da NP
[79]	H ₂ AuCl ₄ , Na ₃ Ct, ácido tânico (agente protetor)	0.05 ml/min e 0.1 ml/min	Ambiente	Vidro	Duas entradas em forma de Y	Comprimento 260µm, profundidade 72µm	TEM	11.5 nm	0,09	Aproximadamente esféricas
[80]	HCl, H ₂ AuCl ₄ , ácido ascórbico, AgNO ₃ , Na ₃ Ct	150 µL/h	Ambiente	PDMS, SU-8, silicone	Mais de uma geometria testada	80 × 75 µm (largura × altura)	TEM	170 ± 7.8 µm	0,002	Anisotrópicas ramificadas
[39]	H ₂ AuCl ₄ , Na ₃ Ct	Os fluidos circulam 10 vezes no reator num tempo total de 3s	115°C	Vidro, PDMS	Módulo de controle microfluídico que consiste em microcanais, duas microbombas, uma microválvula, e um micromisturador; módulo de temperatura	Largura do canal anular 974µm, profundidade 100µm, DI 4626µm, DE 5600µm	Espectro UV–visível, TEM	35 nm	Não especificado	Hexagonais

Em estudo realizado por Wagner *et al.*, AuNPs com diâmetro variando de 5 a 50 nm foram obtidas por redução direta de H₂AuCl₄ com ácido ascórbico em um microrreator de fluxo contínuo monofásico. A distribuição de tamanho das AuNPs foi duas vezes mais estreita quando comparado à síntese em massa [81]. Abadi e colaboradores [82] sintetizaram nanopartículas de ouro *in situ* e integraram-nas em microdispositivos de PDMS para servir como um biossensor baseado em LSPR para a detecção de proteínas e polipeptídeos. As nanopartículas sintetizadas demonstraram uma melhoria de 8,3 vezes na polidispersão da distribuição de tamanhos. Duraiswamy e colaboradores [83] apresentam um processo de síntese robusto, escalonável, automatizado e reproduzível para fabricar nanoconchas e nanoilhas de ouro em superfícies de sílica coloidal. Esta síntese contínua de NPs é capaz de integrar microfluídica multifásica e síntese coloidal.

Sabe-se que o tamanho, a morfologia e o perfil de dispersão de tamanhos de AuNPs produzidas por microfluídica são influenciados principalmente pela concentração e vazão dos reagentes [52], temperatura de reação [84], tamanho e geometria dos microcanais [33], presença de surfactantes [85] e metodologia de síntese [86]. Porém, os mecanismos que regem a síntese de nanopartículas metálicas evoluíram empiricamente e não existe um mecanismo aceito para explicar como funciona o controle da morfologia dessas partículas, particularmente num material como o ouro, onde as energias livres de superfície e a química das faces principais dos cristais são semelhantes entre si [87].

No presente trabalho, devido aos resultados promissores encontrados na literatura [39,41,52,78,80], um sistema microfluídico utilizando um micromisturador foi escolhido para o estudo da síntese de AuNPs e os microdispositivos utilizados foram fabricados em *Low Temperature Co-fired Ceramics* (LTCC). A fabricação de microdispositivos em LTCC consiste no processamento paralelo de múltiplas camadas (processo de laminação) e sinterização do material em uma pilha multicamadas. A abordagem multicamada não só permite a incorporação de estruturas em três dimensões, mas também resulta em um dispositivo compacto e livre de vazamentos [88]. Os métodos de fabricação relativamente simples e baratos e a prototipagem rápida reduzem significativamente o custo e o tempo de produção dos sistemas microfluídicos em LTCC. Além disso, as propriedades inerentes dessa

cerâmica oferecem vantagens sobre polímeros e vidro, como inércia química, biocompatibilidade, estabilidade em altas temperaturas e pressão, excelentes, resistência mecânica e resistência à corrosão [88–90].

Além da produção controlada de AuNPs com diferentes características, o presente trabalho foca na utilização dos diferentes grupos de nanopartículas conjugadas a proteínas de interesse para a formulação de uma vacina de subunidade com desempenho otimizado. AuNPs de diferentes tamanhos, variando entre 5 nm [91] a 1 μm [92], e de diferentes morfologias, tais como esferas [93], bastões [56], partículas dendríticas [94], cubos [34], hexágonos [39] e partículas quirais [95], foram estudadas quanto ao seu potencial em aplicações farmacêuticas na literatura. Há poucas informações, porém, relacionadas a quais são os tamanhos e morfologias de AuNPs funcionalizadas com proteínas que apresentam o melhor desempenho biológico para cada uma das aplicações testadas e à interação das nanopartículas com as diferentes proteínas de interesse biomédico.

2. OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho são: (I) a síntese controlada e reprodutível de nanopartículas de ouro (AuNPs) que apresentem tamanhos e morfologias diversas; (II) o entendimento do perfil de interação das AuNPs sintetizadas com proteínas de interesse médico; (III) a utilização dos complexos compostos por AuNPs de diferentes tamanhos e morfologias conjugadas com proteínas de interesse na formulação de uma vacina de subunidade. Cada um desses objetivos pode, ainda, ser dividido em objetivos específicos, apresentados a seguir:

- (I): design e construção dos dispositivos microfluídicos, síntese de diferentes AuNPs e ajustes das condições de processo, caracterização das AuNPs produzidas, testes de estabilidade das AuNPs e reprodutibilidade das sínteses;
- (II): funcionalização das AuNPs com proteínas selecionadas, caracterização e teste de estabilidade dos complexos, estudos de interação entre as AuNPs e as proteínas selecionadas;
- (III): avaliação de citotoxicidade das AuNPs e complexos AuNPs+proteínas, e ensaios de aplicação *in vivo* dos complexos funcionalizados.

As atividades realizadas neste trabalho visam a fornecer informações relacionadas a quais são os tamanhos e morfologias de AuNPs funcionalizadas com proteínas que apresentam o melhor desempenho biológico para a aplicação em vacina de subunidade e como obter essas AuNPs de forma sistemática.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção dos dispositivos microfluídicos

3.1.1 Projeto técnico das geometrias dos canais

Os microdispositivos utilizados nesse trabalho foram construídos em material cerâmico *Low Temperature Co-Fired Ceramics* (LTCC) DuPont Green Tape 951PX com espessura crua de $254 \pm 13 \mu\text{m}$, tendo um coeficiente de encolhimento X,Y de $12,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ e coeficiente de encolhimento Z de $15 \pm 0,5 \mu\text{m}$, densidade $3,1 \text{ g/cm}^3$ e condutividade térmica $3,3 \text{ W/m.K}$. Os dispositivos foram compostos por camadas de LTCC empilhadas, que foram projetadas utilizando o *software* AutoCAD. Os esquemas das camadas dos microdispositivos, chamados de “Reator A” e “Reator B”, podem ser vistos na Figura 4 e na Figura 5, respectivamente.

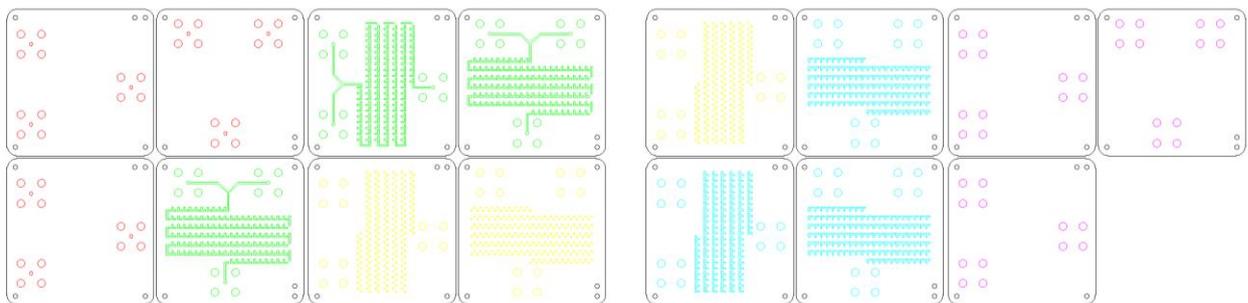


Figura 4 – Projeto das camadas do microdispositivo “Reator A” desenhadas utilizando o *software* AutoCAD

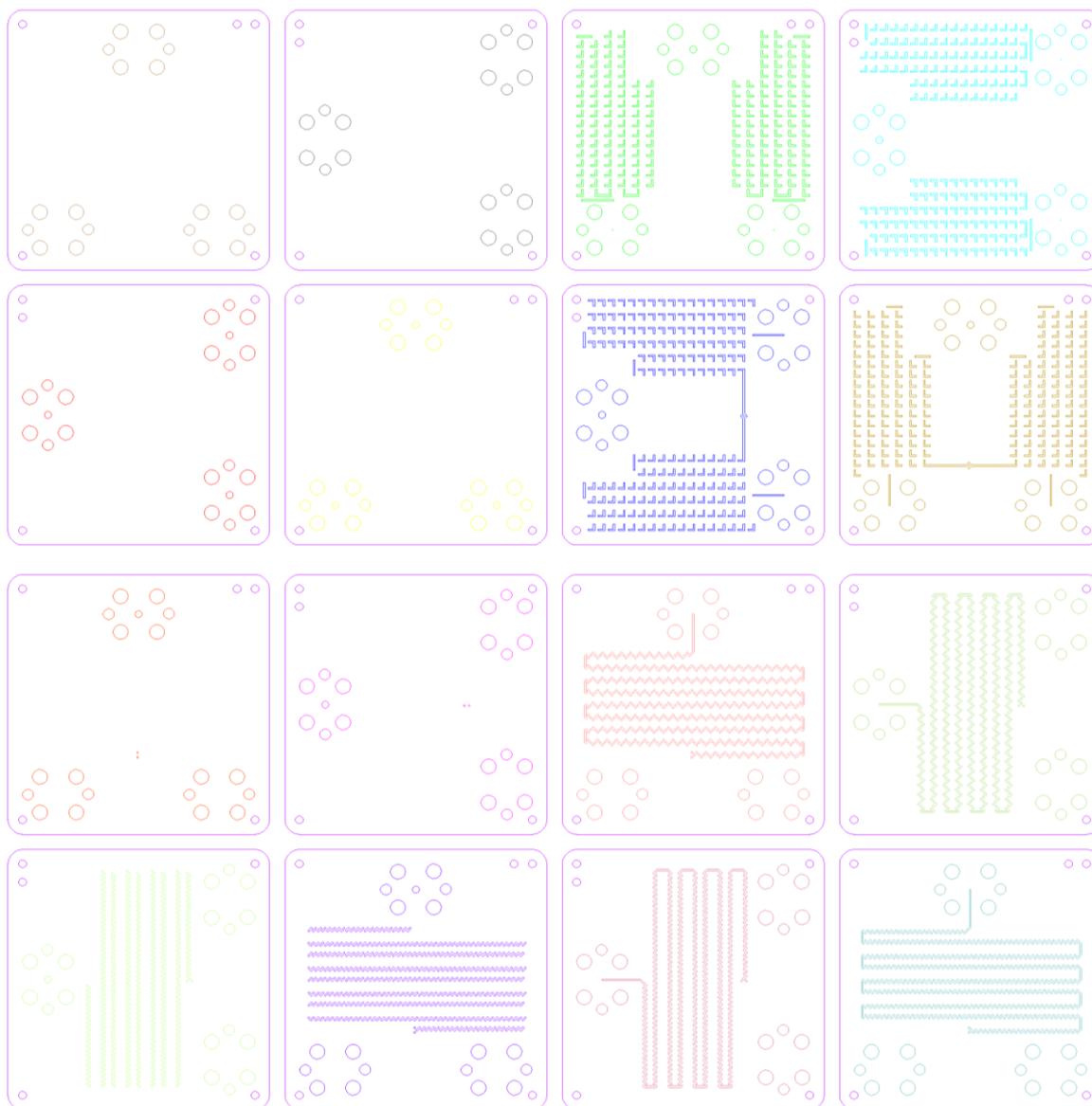


Figura 5 – Projeto das camadas do microdispositivo “Reator B” desenhadas utilizando o software AutoCAD.

As especificações de geometria dos dispositivos utilizados estão descritas na Tabela 2. Nas imagens das Figura 6 e Figura 7, vê-se os canais internos do Reator A e Reator B, respectivamente.

Tabela 2 – Especificações dos microdispositivos construídos

Reator	Geometria	Dimensões do Canal			Área mm ²	Diâmetro (Dh) μm
		Altura (μm)	Largura (μm)	Volume (μl)		
A	Serpentina	630	630	389	0,397	630
B	Cross-channel	400	400	270	0,160	400

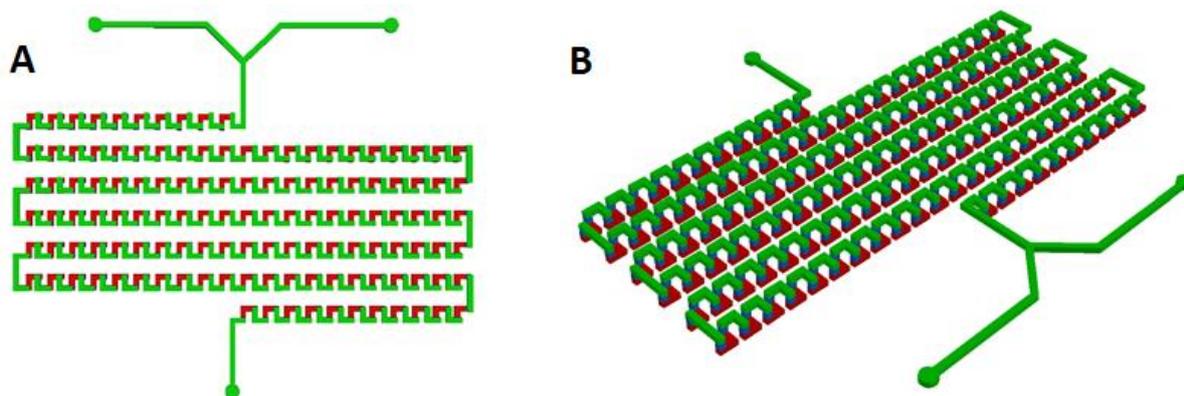
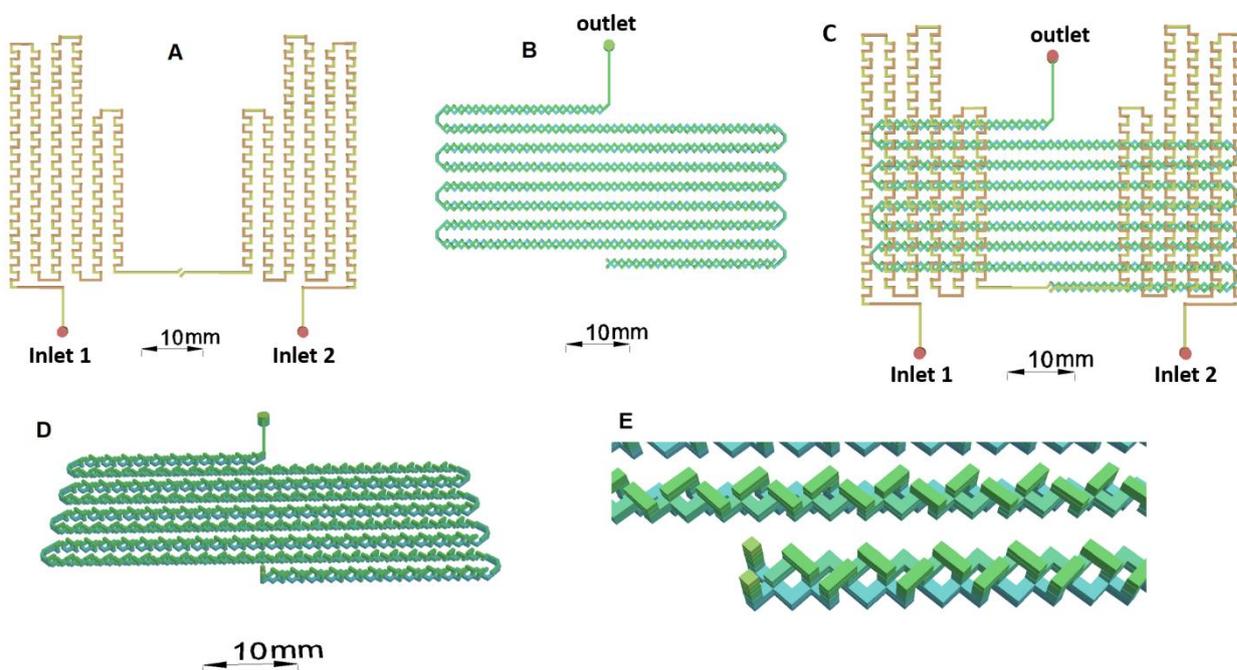


Figura 6 – Esquema em 3D do misturador interno do microdispositivo “Reator A” A) vista superior; B) vista lateral.

Figura 7 – Esquema 3D do microdispositivo “Reator B” A) vista do topo da seção de aquecimento; B) vista do topo do misturador (seção de reação); C) vista do topo de ambas as seções de aquecimento (camadas superiores) e mistura (camadas inferiores) sobrepostas; D) visão lateral do misturador (seção de reação); E) visão lateral aproximada da geometria *cross-section* dos canais no misturador (seção de reação). Imagem publicada em [1].

O dispositivo “Reator B” é dividido em duas seções: seção de aquecimento (camadas superiores) e seção de reação (camadas inferiores). Os fluidos de entrada (reagentes) não se misturam na seção de aquecimento, o seu propósito é permitir que as correntes troquem calor com as paredes dos canais e atinjam a temperatura adequada (controlada pelo banho no qual o dispositivo está submerso) antes da entrada no misturador, onde a reação de fato ocorre. A seção de reação deste dispositivo apresenta geometria *cross-channel*, de volume total de 270 μL e 400 μm de largura da seção quadrada dos canais.

As dimensões dos canais dos dispositivos (volume útil do dispositivo (V), área (A) e diâmetro hidrodinâmico (Dh)) e a vazão (Q) dada pela bomba possibilitam o cálculo dos principais parâmetros de processo: velocidade linear do fluido (v) e tempo de residência das partículas (t). Esses parâmetros foram calculados pelas Equações 1 e 2, respectivamente.

$$v = \frac{Q}{A} \quad \text{Equação 1}$$

$$t = \frac{V}{Q} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo μ a viscosidade e ρ a densidade do meio aquoso.

3.1.2 Construção do dispositivo microfluídico

O material LTCC é uma mistura de cerâmica, vidro, metais de baixa resistência e compostos orgânicos. A presença de compostos orgânicos faz com que a folha de LTCC seja flexível, possibilitando o corte das camadas (etapa de laminação). Ao submeter o material à mufla, a 450 °C, os compostos orgânicos volatilizam e o material endurece. A 850°C ocorre a transição vítrea do óxido de alumina e as camadas se fundem (etapa de sinterização).

As folhas do material cerâmico foram cortadas em cortadora a *laser* de alta

precisão da marca LPKF Laser & Electronics modelo Proto Laser U3 de acordo com o projeto. A Figura 8 mostra a cortadora em trabalho de corte das folhas de LTCC. Cada folha dá origem a 4 camadas do dispositivo. As camadas do material após o corte estão mostradas na Figura 9.

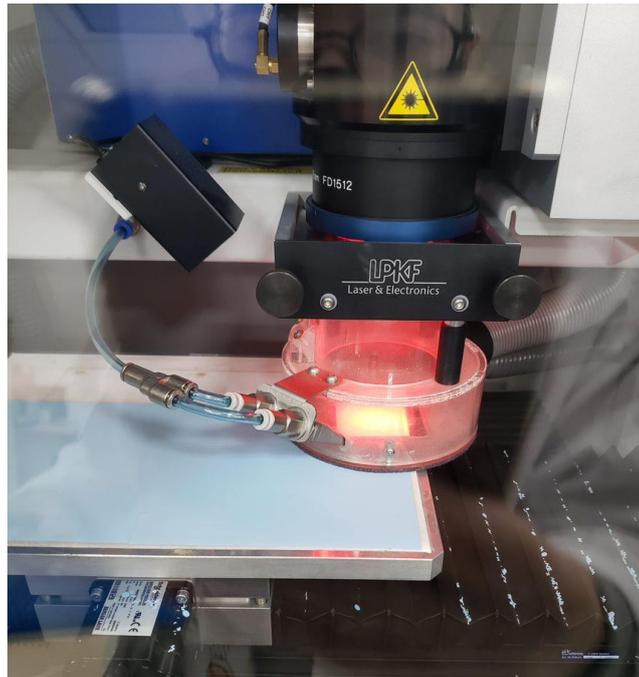


Figura 8 – Cortadora a laser em trabalho de corte das folhas de LTCC.



Figura 9 – Camadas do microdispositivo “Reator A” após o corte a *laser* das folhas de LTCC.

Após o corte, as camadas foram empilhadas em ordem e alinhadas em um suporte metálico, conforme Figura 10. O suporte com o material foi, então, aquecido em estufa da marca Spnccer Scientific modelo SP2420-12 a 60°C por 20 minutos.

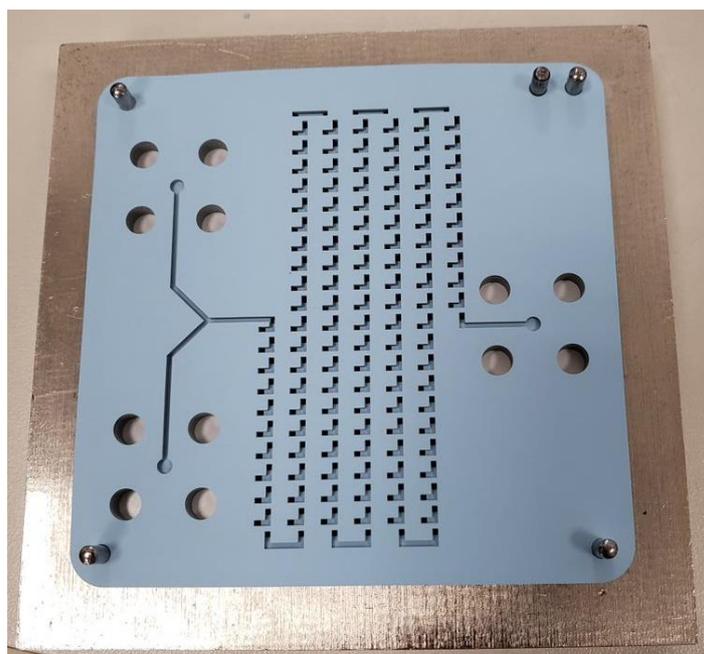


Figura 10 – Camadas do microdispositivo “Reator A” empilhadas em suporte metálico.

Ao sair da estufa, o suporte com as folhas foi prensado em prensa hidráulica, conforme Figura 11, a 70 °C e 4 toneladas por 10 minutos. A seguir, alterou-se a posição do molde na prensa em 90° e foi feita novamente a pressão por 10 minutos para garantir a uniformidade, conforme esquema da Figura 12.



Figura 11 – Folhas de LTCC empilhadas em suporte metálico prensadas em prensa hidráulica aquecida.

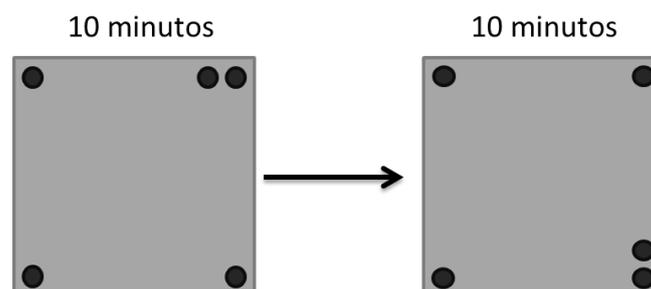


Figura 12 - Esquema da posição do molde na prensa em duas etapas de tempo.

Após a etapa de laminação, o dispositivo foi submetido ao processo de sinterização. Nesta etapa, o dispositivo foi retirado do suporte metálico e colocado sobre uma plataforma de cerâmica porosa, conforme mostrado na Figura 13, com a

qual foi levado à mufla da marca EDG Equipamentos modelo FCVE-II. Na mufla, o dispositivo foi submetido a uma rampa de temperatura de 6 °C/min até 450 °C, permanecendo nessa temperatura por 60 minutos. A seguir, a temperatura foi elevada a 850 °C, novamente à taxa de 6 °C/min, permanecendo nessa temperatura por 60 minutos. Após a sinterização completa da vitro-cerâmica, o dispositivo em LTCC foi deixado durante a noite dentro da mufla desligada para resfriar lentamente, estando, então, pronto para uso.

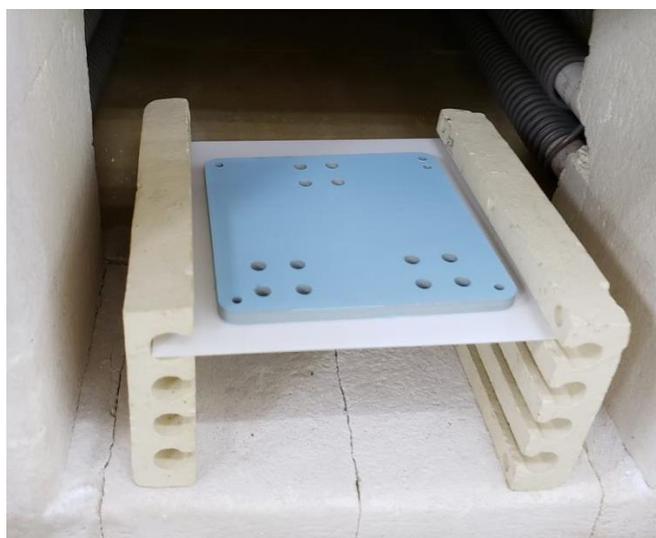


Figura 13 - Dispositivo sobre suporte de cerâmica porosa após a prensa sobre o qual foi aquecido na mufla.

3.1.3 Montagem do aparato experimental em microfluídica

A conexão das mangueiras foi feita utilizando 3 pares de peças de poliamida 6 (Nylon®) e 3 pares de *o-rings* de borracha, presos ao dispositivo com parafusos. Um conector macho de aço inoxidável 316 de dupla anilha da marca Swagelok foi rosqueado em cada par de peças presas ao reator, prendendo as mangueiras de PTFE de 1/8" de diâmetro externo e 1/16" de diâmetro interno da marca Darwin Microfluidics. O esquema do dispositivo conectado às mangueiras está mostrado na Figura 14.

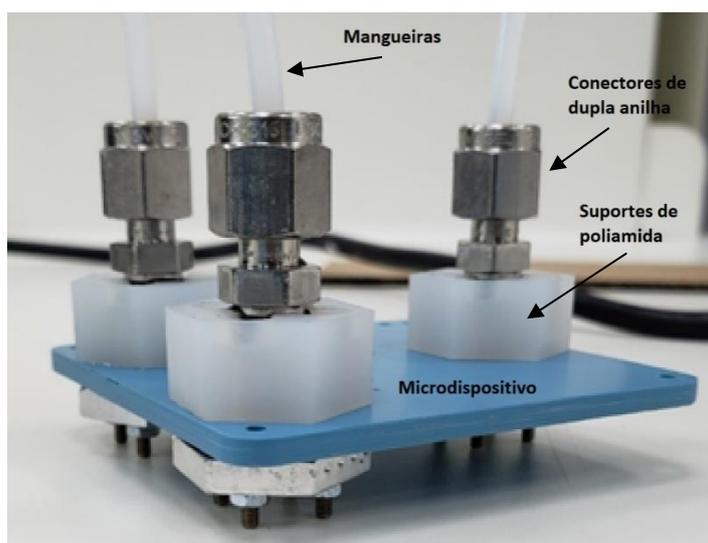


Figura 14 – Conexão das mangueiras de PTFE ao dispositivo microfluídico. Imagem publicada em [1].

As extremidades livres das mangueiras de entrada foram conectadas utilizando um adaptador plástico a uma seringa *luerlock* de 5 mL. As seringas foram presas à bomba de seringa da marca Harvard Apparatus modelo PHD 2000. Uma imagem do sistema pronto para uso está mostrada na Figura 15.

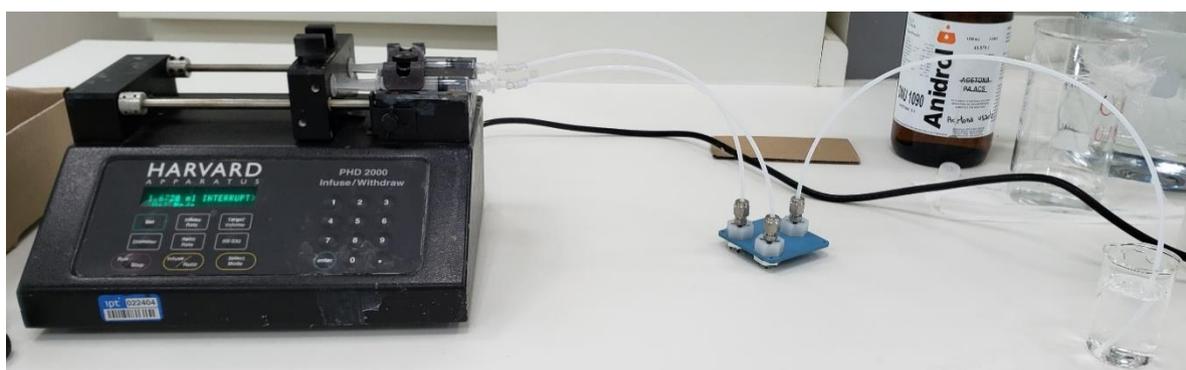


Figura 15 – Dispositivo microfluídico conectado à bomba de seringa.

Nos experimentos com controle de temperatura, o dispositivo microfluídico foi mergulhado em um banho de óleo da marca PolyScience modelo SD07H170-A12E com controlador de temperatura, conforme Figura 16. Entre cada experimento, o dispositivo foi limpo com água ultrapura e seco com ar comprimido. Periodicamente,

foi feita uma limpeza mais detalhada, desmontando o sistema e colocando a cerâmica de molho em água régia em banho de ultrassom por 15 minutos, depois enxaguando com água em abundância e secando com ar comprimido.

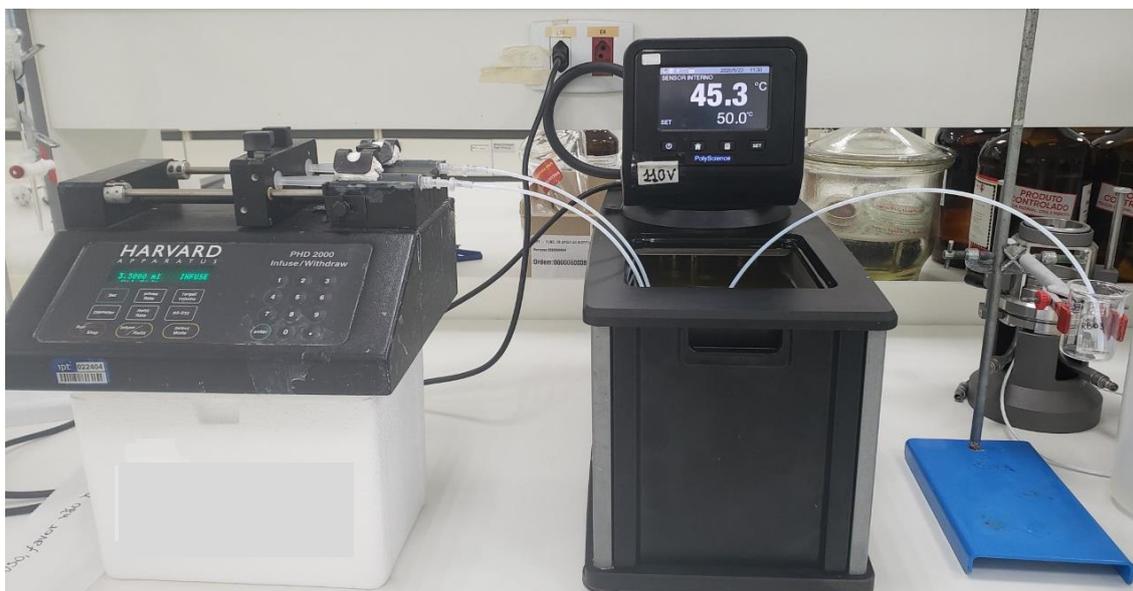


Figura 16 - Dispositivo microfluídico conectado à bomba de seringa e mergulhado em banho de óleo para controle de temperatura. Imagem publicada em [1].

3.2 Reagentes

Nos experimentos de síntese de AuNPs foram utilizados os seguintes reagentes: ácido tânico da marca Sigma-Aldrich grau analítico, citrato de sódio dihidratado (NaCt) da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99\%$ e cloreto de ouro III trihidratado da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,9\%$. No preparo da água-régia para limpeza dos microdispositivos, foram utilizados ácido clorídrico e ácido nítrico de grau analítico da marca Synth. Para o ensaio de verificação de aglomeração das partículas, foi utilizado β -mercaptoetanol $\geq 99,0\%$ da marca Sigma-Aldrich.

Nos ensaios de funcionalização, as proteínas r-GFP e RBD utilizadas foram doadas pelo Grupo de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Engenharia Química da Universidade de São Paulo e pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, respectivamente. As nanopartículas foram funcionalizadas em tampão PBS pH $7,2 \pm 0,1$ da marca Laborclin. Nos ensaios com

alteração de salinidade, foi utilizado cloreto de sódio (NaCl) grau analítico da marca Synth. Nos ensaios de citotoxicidade, foi utilizado o meio de cultivo DMEM da marca Thermo Fischer Scientific, o corante vermelho neutro em solução de DPBS 0,33% da marca Sigma-Aldrich, álcool etílico absoluto da marca Êxodo Científica, solução de ácido acético 5% da marca RenyLab e tampão PBS pH $7,2 \pm 0,1$ da marca Laborclin. As células clones de fibroblasto de camundongo linhagem NCTC 929 foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

3.3 Metodologia analítica

3.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz ou *Dinamic Light Scattering* (DLS)

As análises de tamanho de partícula foram feitas pela técnica de *Dinamic Light Scattering* (DLS) a 25°C, em cubeta de vidro, no equipamento Particulate Systems NanoPlus. Após 24h de repouso em geladeira, as amostras foram diluídas a 10% em água ultrapura e cada leitura foi feita em triplicata. Todos os resultados apresentados são referentes à intensidade.

3.3.2 Espectrofotometria UV-visível

O perfil de absorvância de luz em comprimentos de onda de 360 nm a 800 nm das amostras foi obtido utilizando um espectrofotômetro da marca BEL modelo UV-M51. Foi utilizada lâmpada de tungstênio, cubetas de quartzo e intervalo de leitura de 0,5 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata após diluição a 10% em água ultrapura.

3.3.3 Determinação do Potencial Zeta

A carga de superfície das partículas foi obtida através de análise de potencial zeta no equipamento Particulate Systems NanoPlus a 25°C. As amostras foram diluídas a 10% em água ultrapura e as leituras foram feitas em 5 pontos com 10 leituras por ponto para cada amostra.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 2100. As amostras foram pingadas com pipeta de Pasteur sobre um *grid* de cobre *mash* 300, apoiado sobre papel filtro em uma placa de Petri. As amostras foram, então, secas em dessecador a vácuo com sílica por 24h antes da análise. Os grids foram manipulados com caneta a vácuo para evitar danos ao filme. As imagens de microscopia obtidas foram analisadas utilizando o *software* Image J. As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* Minitab 19.1.1 com número amostral de partículas $n \geq 300$.

3.4 Testes exploratórios

Foi utilizado como referência em testes preliminares o estudo de Yagyu *et al.* [79], no qual foram obtidas AuNPs através da reação de sal de ouro com NaCt como agente redutor e ácido tânico como agente protetor em dispositivo microfluídico à temperatura ambiente.

Em uma das entradas do microdispositivo, foi utilizada uma solução de sal de ouro 0,368 mM (0,145 g/L), chamada de “Solução A”. Para o preparo dessa solução, 14,492 mg de cloreto de ouro foram adicionados a um balão volumétrico de 100 mL com água ultrapura. Na outra entrada, foi utilizada uma mistura de solução de NaCt (“Solução redutora”) e solução de ácido tânico (“Solução protetora”, com finalidade de melhorar a estabilidade das AuNPs), chamada de “Solução B”. A “Solução redutora” é composta de NaCt 33,7 mM (9,911 g/L), sendo 99,112 mg de NaCt em 10 mL de água ultrapura. A “Solução protetora” é composta de ácido tânico 5,82 mM (9,9 g/L), sendo 99,0 mg de ácido tânico em 10 mL de água ultrapura. A “Solução B” é, então, composta por 4 mL de “Solução redutora” e 0,1 mL de “Solução protetora” em 75,9 mL de água ultrapura. O esquema da Figura 17 ilustra o preparo das soluções utilizadas. Todas as soluções foram preparadas em balão volumétrico e deixadas em banho de ultrassom à temperatura ambiente por 15 minutos para garantir que todos os sais fossem completamente solubilizados.

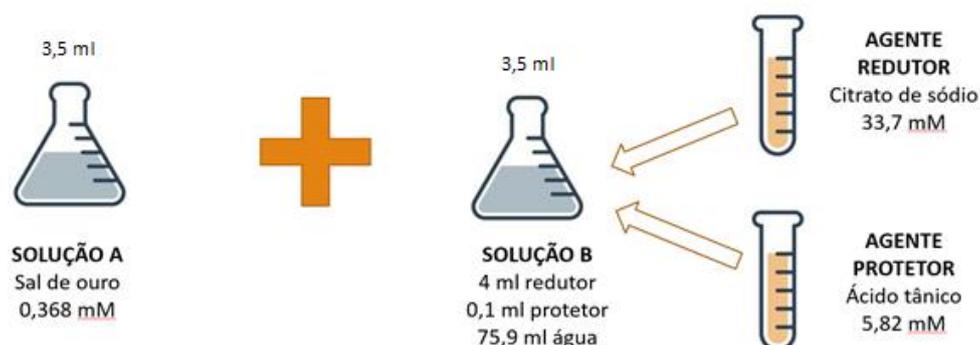


Figura 17 – Preparo de soluções para testes preliminares segundo Yagy *et al.* [79].

3.4.1 Avaliação de diferentes geometrias do misturador

A fim de avaliar a influência da geometria do misturador no resultado da síntese de AuNPs, foram feitas reações em triplicata variando tempo de residência de 14,7 s a 467 s em temperatura ambiente, reagindo a “Solução A” e a “Solução B”, em ambos os microdispositivos “Reator A” e “Reator B”. Os produtos de reação foram analisados por DLS, UV-vis, potencial zeta e aspecto visual.

3.4.2 Avaliação de reprodutibilidade

Para avaliar a reprodutibilidade dos experimentos, foi fixada uma condição que apresentou resultados satisfatórios e foram feitas duas novas triplicatas em dias e horários diferentes para comparação dos resultados. A condição escolhida foi tempo de residência de 32,4 s (vazão 0,50 mL/min, velocidade 0,05 m/s, Re 23,41), temperatura ambiente, dispositivo “Reator B” e soluções “Solução A” e “Solução B”. Os produtos de reação foram analisados por DLS, UV-vis, potencial zeta e aspecto visual.

3.4.3 Avaliação da influência da temperatura de reação

Para avaliar a influência da temperatura nos experimentos, foi fixada uma condição que apresentou resultados satisfatórios e foram feitas reações em triplicata variando a temperatura da reação em 25°C, 50°C, 75°C e 100°C. A conversão de sal de ouro em AuNPs foi verificada em todos os experimentos em diferentes

temperaturas. A condição escolhida foi tempo de residência de 32,4 s (vazão 0,50 mL/min, velocidade 0,05 m/s, Re 23,41), dispositivo “Reator B” e soluções “Solução A” e “Solução B”. Os produtos de reação foram analisados por DLS, UV-vis, potencial zeta e aspecto visual.

3.4.4 Avaliação de estabilidade

Para avaliar a estabilidade dos produtos da síntese de AuNPs, foram feitas reações em duplicata a 25°C e a 50°C, fixando tempo de residência em 32,4 s (vazão 0,50 mL/min, velocidade 0,05 m/s, Re 23,41), no dispositivo “Reator B” e com as Soluções “A” e “B”. Para cada uma das condições, uma amostra foi armazenada em geladeira a 8°C e outra em temperatura ambiente ao abrigo de luz por até 42 dias. Periodicamente, foram feitas análises de UV-vis e foi monitorado o aspecto visual das amostras a fim de verificar se houve degradação no período de estudo e se houve diferença no perfil de degradação nas diferentes formas de armazenamento ao longo do tempo.

3.5 Reprodução da reação clássica de Turkevich

Para a reprodução da reação clássica de Turkevich [69], foram preparadas uma solução de cloreto de ouro 0,25 mM, equivalente a 0,09 g/L (4,92 mg de cloreto de ouro em 50 mL de água ultrapura), chamada de “Solução TurkOuro”, e uma solução de NaCt 0,75 mM, equivalente a 0,22 g/L (11,03 mg de NaCt em 50 mL de água ultrapura), chamada de “Solução TurkCitrato”, a fim de manter a razão molar NaCt:Ouro em 3:1.

Foram feitas reações em triplicata em duas condições com as soluções “TurkOuro” e “TurkCitrato”. Foi fixada temperatura de reação de 100 °C, variando o tempo de residência de 300 s (velocidade 0,006 m/s, Re 2,53) e 900 s (velocidade 0,002 m/s, Re 0,84), no dispositivo “Reator B”. Os produtos de reação foram analisados por DLS, UV-vis, potencial zeta e aspecto visual.

3.6 Método de Turkevich adaptado

3.6.1 Variação da concentração inicial dos reagentes

Foram feitas sínteses de AuNPs pelo método de Turkevich partindo de soluções de cloreto de ouro e NaCt mais concentradas que as soluções “TurkOuro” e “TurkCitrato”, mantendo a proporção NaCt:Ouro em 3:1, conforme estudo de Cardoso *et al.*[96]. Foram preparadas uma solução de cloreto de ouro 2,5 mM, equivalente a 0,99 g/L (49,23 mg de cloreto de ouro em 50 mL de água ultrapura), chamada de “Solução RobOuro”, e uma solução de NaCt 7,5 mM, equivalente a 2,21 g/L (110,29 mg de NaCt em 50 mL de água ultrapura), chamada de “Solução RobCitrato”.

Foram feitas reações em triplicata em duas condições com as soluções “RobOuro” e “RobCitrato”. Foi fixada temperatura de reação de 100 °C, variando o tempo de residência de 90 s (velocidade 0,02 m/s, Re8,42) e 300 s (velocidade 0,006 m/s, Re 2,52), no dispositivo “Reator B”. Os produtos de reação foram analisados por DLS, UV-vis, potencial zeta e aspecto visual.

3.6.2 Variação da temperatura de reação

Foram feitas reações em triplicata com as soluções “RobOuro” e “RobCitrato” fixando tempo de residência de 90 s (velocidade 0,02 m/s, Re 8,42, vazão 0,18 mL/min) no dispositivo “Reator B”. Os produtos das sínteses variando a temperatura de reação de 25°C a 100°C foram analisados por DLS, UV-vis, potencial zeta, MET e aspecto visual.

O produto das sínteses feitas a 25 °C foi, ainda, posicionado em banho a 100 °C por 1h para verificar a continuidade da reação. Além disso, foi analisado o comportamento dessa suspensão na presença de grupamentos tiol através de análise visual, DLS, potencial zeta e UV-vis, a fim de verificar uma possível aglomeração das partículas. Nesse ensaio, foi adicionado à solução 5mM de β -mercaptoetanol (1:1 molar em relação ao NaCt em excesso, considerando que houve 100% de conversão do sal de ouro). A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente antes das análises.

3.7 Sínteses com ácido tânico

As sínteses de AuNPs utilizando ácido tânico como agente redutor foram adaptadas ao dispositivo microfluídico. Foram feitas sínteses utilizando as soluções “RobOuro” (cloreto de ouro 2,5mM) e diferentes concentrações de ácido tânico (0,01mM, 0,02mM, 0,05mM, 0,10mM, 0,15mM e 0,20mM) em entradas diferentes do dispositivo “Reator B”. Foram fixadas as condições de tempo de residência em 90 s (velocidade 0,02 m/s, Re 8,42, vazão 0,18 mL/min) e temperatura ambiente. Os produtos desses ensaios foram analisados quanto ao aspecto visual, tamanho de partícula por DLS, potencial zeta, espectro UV-vis e conversão de sal de ouro.

3.7.1 Sínteses com ácido tânico e citrato de sódio

As sínteses de AuNPs utilizando ácido tânico e NaCt como agentes redutores foram conduzidas à temperatura ambiente, com tempo de residência de 90 s, utilizando uma solução de cloreto de ouro 2,5mM em uma das entradas do dispositivo “Reator B” e uma solução contendo ácido tânico 0,1mM com concentrações variáveis de NaCt na outra entrada. Foram analisadas as concentrações de NaCt de 1,25 mM, 2,5 mM, 5,0 mM e 7,5 mM. Os produtos desses ensaios foram analisados quanto ao aspecto visual, tamanho de partícula por DLS, potencial zeta, espectro UV-vis, conversão de cloreto de ouro e MET.

3.8 Análise da conversão de cloreto de ouro

Para verificar se a conversão do cloreto de ouro foi parcial ou completa, usou-se a metodologia de Haiss *et al.* [97]. As amostras dos produtos de síntese foram diluídas a 5% (v/v) em água ultrapura e foi feita a leitura em triplicata de absorbância UV-visível em comprimento de onda de 190 nm a 320 nm utilizando cubeta de quartzo e intervalo de leitura de 0,5 nm em um espectrofotômetro da marca BEL modelo UV-M51. Espera-se que o pico de absorbância do cloreto de ouro apareça na leitura em comprimento de onda em torno de 220 nm. O racional dessa análise foi, portanto, avaliar a conversão do sal em AuNPs através da diminuição do pico de absorbância do cloreto de ouro (diretamente proporcional à sua concentração).

Para verificar a sensibilidade do método, amostras da solução precursora foram preparadas em concentrações de 1,25 mM a 0,01 mM, representando de 0% a

99% de conversão, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 3. As amostras das soluções precursoras em diferentes concentrações foram diluídas a 5% em água ultrapura e seus espectros de absorvância de luz foram medidos nas mesmas condições das amostras de AuNPs produzidas. A Figura 18 mostra que o método é sensível até 95% de conversão.

Tabela 3 - Amostras da solução precursora preparadas em concentrações de 1,25mM a 0,01mM para avaliar a sensibilidade do método usado para verificar a conversão do sal de ouro.

Concentração de sal (mM)	Conversão de sal
1,25	0%
0,25	80%
0,06	95%
0,03	98%
0,01	99%

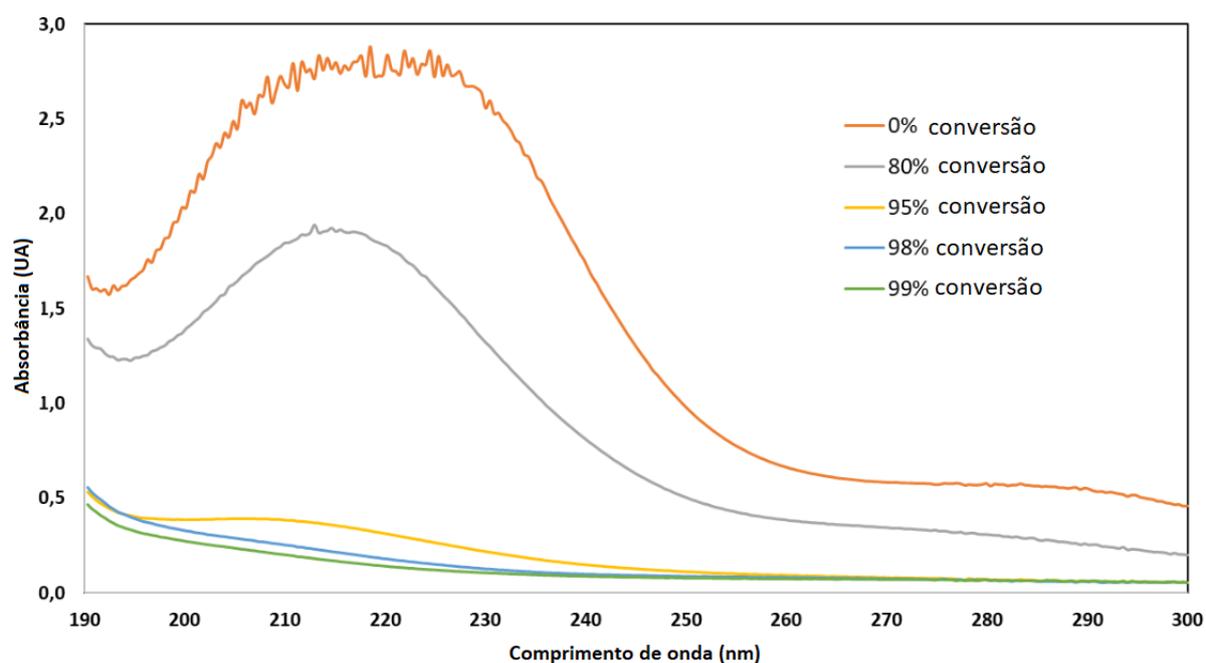


Figura 18 - Espectros de absorvância de luz do sal de ouro em diferentes concentrações e seus equivalentes em “% de conversão de sal”: 1,25 mM (0% de conversão – linha laranja); 0,25 mM (80% de conversão – linha cinza); 0,06 mM (95% de conversão – linha amarela); 0,03 mM (98% de conversão – linha azul); 0,01 mM (99% de conversão – linha verde).

3.9 Funcionalização da superfície das AuNPs com proteínas

3.9.1 Funcionalização com r-GFP

Curvas de adsorção foram determinadas para avaliar a capacidade de conjugação de AuNPs à proteína rGFP. Para a conjugação da proteína na superfície das AuNPs, 10 μ L de diferentes AuNPs 0,50 μ g/ μ L e rGFP em concentrações iniciais crescentes (de 0 a 0,07 μ g/ μ L) foram adicionados em tampão PBS pH 7,4 até um volume final de 250 μ L, utilizando microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram então agitados em vórtex e mantidos à temperatura ambiente por 1h. Para quantificar a capacidade de adsorção, as suspensões foram centrifugadas a 18500 g por 10 minutos para sedimentar os complexos AuNP+proteína. Os sobrenadantes contendo a proteína não adsorvida foram então analisados por espectrofotometria UV-visível em comprimento de onda de 280 nm utilizando um espectrofotômetro BEL UV-M51 previamente calibrado com rGFP em diferentes concentrações, conforme curva de calibração mostrada na Figura 19.

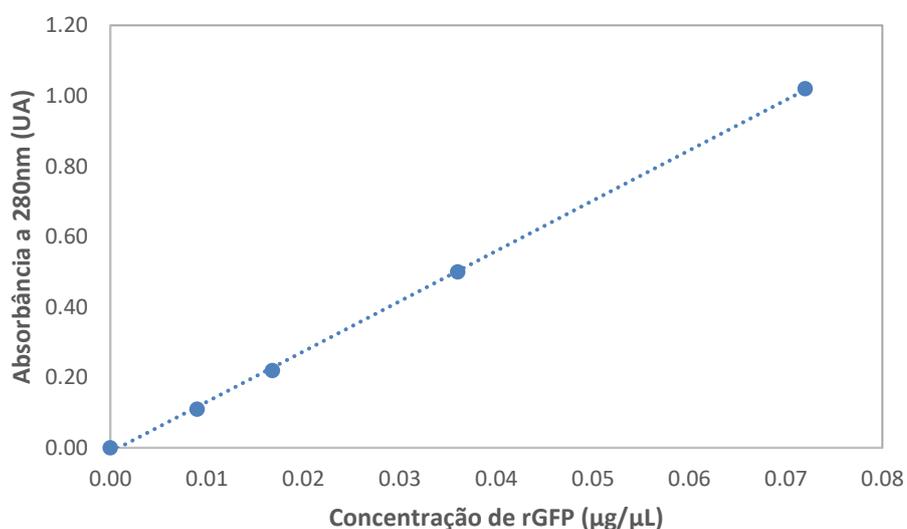


Figura 19 – Curva de calibração da quantificação de rGFP por UV-vis.

Foi ajustado um modelo linear à curva de calibração para a quantificação de rGFP em solução por interpolação, conforme Equação 3, com ajuste R^2 de 0,999.

$$\text{Abs} = 14,289 \cdot [\text{rGFP}] - 0,0124$$

Equação 3

Sendo Abs a absorvância a 280 nm e [rGFP] a concentração de rGFP.

3.9.2 Funcionalização com RBD

Curvas de adsorção foram determinadas para avaliar a capacidade de adsorção de AuNPs à proteína RBD. Para a conjugação da proteína na superfície das AuNPs, 10 μ L de diferentes AuNPs 0,50 μ g/ μ L e RBD em concentrações iniciais crescentes (de 0 a 0,3 μ g/ μ L) foram adicionados em tampão PBS pH 7,4 até um volume final de 250 μ L, utilizando microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram então agitados em vórtex e mantidos à temperatura ambiente por 1h. Para quantificar a capacidade de adsorção, as suspensões foram centrifugadas a 18500 g por 10 minutos para sedimentar os complexos AuNP+proteína. Os sobrenadantes contendo a proteína não adsorvida foram então analisados por espectrofotometria UV-visível em comprimento de onda de 280 nm utilizando um espectrofotômetro BEL UV-M51 previamente calibrado com RBD em diferentes concentrações, conforme curva de calibração mostrada na Figura 20.

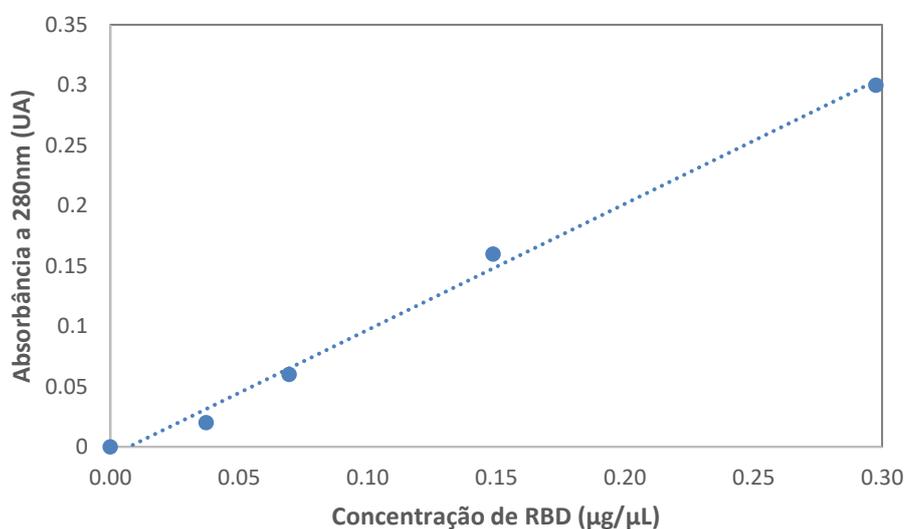


Figura 20 – Curva de calibração da quantificação de RBD por UV-vis.

Foi ajustado um modelo linear à curva de calibração para a quantificação de RBD em solução por interpolação, conforme Equação 4, com ajuste R^2 de 0,994.

$$\text{Abs} = 1,0453 \cdot [\text{RBD}] - 0,0076$$

Equação 4

Sendo Abs a absorbância a 280 nm e [RBD] a concentração de RBD.

As formulações dos testes *in vivo* e *in vitro* foram feitas através da adição de 10 µg de RBD e 10 µg de AuNP em tampão PBS pH 7,4 para um volume final de 100 µL, utilizando microtubos de 0,5 mL. Os tubos com as formulações foram então agitados em vórtex até a homogeneização e mantidos em temperatura ambiente por 1h antes da sua utilização.

3.9.2.1 Avaliação da estabilidade dos complexos AuNP+RBD

Para avaliar a estabilidade dos complexos AuNP+RBD, diferentes AuNPs foram funcionalizadas com RBD em tampão PBS pH 7,4, (conforme descrito no Item 3.9.2) e armazenadas a 8 °C ao abrigo de luz por até 15 dias. As análises de espectrofotometria UV-visível foram realizadas após 5 dias e após 15 dias em comprimentos de onda de 360 nm a 800 nm.

Para avaliar as interações entre as partículas dos complexos AuNP+RBD, foram adicionados 1M de NaCl às formulações e foi medido o tamanho das partículas por DLS antes e após a adição de sal. Os resultados obtidos pelo espalhamento dinâmico de luz foram analisados por número e por intensidade.

3.10 Estudos de citotoxicidade *in vitro*

As citotoxicidades de diferentes AuNPs, sozinhas ou conjugadas com a proteína RBD, foram avaliadas usando o ensaio *Neutral Red Uptake* (NRU) [98] no Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT. Nesses ensaios, amostras de 100 µL de meio de cultivo para células animais DMEM contendo nanopartículas em três concentrações diferentes foram adicionadas a células NCTC 929 uma microplaca de 96 poços (10⁵ células por poço). Para a amostra mais concentrada, chamada de “1x”, um volume de 10 µL de AuNPs ou RBD ou complexo AuNP+RBD foi aplicado em cada poço e incubado a 37°C e com CO₂ 5 % por 24 horas. Após a incubação com as diferentes nanopartículas, as células foram lavadas com PBS e a viabilidade

celular foi avaliada usando o protocolo de NRU. As células foram, então, incubadas por três horas com o corante vermelho neutro (50 µg/ml em DMEM) e extraídas com uma mistura de ácido acético, etanol e água (1:50:49, v:v:v). A absorção de NR foi medida por UV-vis a 540 nm utilizando um leitor de microplacas KASUAKI DR-200BN-BI. A viabilidade celular foi calculada como uma porcentagem da absorção das células não tratadas (controle positivo). O látex, substância conhecida citotóxica, foi utilizado no teste como controle positivo. Seis réplicas para cada nanopartícula em cada diluição (1x, 8x, 128x) foram utilizadas em cada ensaio.

3.11 Estudos de aplicação *in vivo*

Diferentes AuNPs foram conjugadas com RBD (segundo metodologia do Item 3.9.2) para formulação de vacinas contra o vírus Sars-CoV-2. Dois experimentos de imunização foram realizados independentemente para avaliar o potencial vacinal de formulações contendo os complexos AuNP+RBD. Cinco camundongos fêmeas de 6-8 semanas de idade foram utilizados em cada grupo experimental, em um esquema de vacinação realizado com a administração de 3 doses por via subcutânea em intervalos de 2 semanas entre as doses. Os animais receberam 10 µg de RBD/dose e 10 µg de AuNP/dose. Como controle de imunização, foi utilizada solução salina. O sangue dos animais imunizados foi coletado um dia antes da administração de cada dose e 13 dias após a última dose via sangramento submandibular. O sangue foi processado para obtenção do soro por incubação por 30 min a 37 °C, seguida de incubação por 30 min a 4 °C e centrifugação a 5000g por 30 min. O soro obtido foi armazenado a -20 °C para avaliação dos níveis, classes e afinidade dos anticorpos gerados contra o antígeno vacinal.

A utilização de animais obedeceu aos procedimentos aprovados pelo comitê de ética no uso de animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) sob o certificado CEUA 6961041120. Todos os ensaios *in vivo* foram realizados pelo ICB-USP. Os experimentos dessa seção foram conduzidos em parceria com o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

3.11.1 Análise de dos níveis de anticorpos IgG, subclasse e afinidade

Para determinar os níveis de anticorpos IgG resultantes da administração de cada dose, foi realizado um ensaio ELISA indireto. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 200 ng/poço de proteína RBD por 2 h a 37 °C, seguido de três lavagens com PBS e Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueio com 300 µL de solução de bloqueio/diluyente PBS-T + 0,5% BSA durante a noite a 4 °C. As placas foram então incubadas com os soros dos camundongos individualmente em duplicata, diluídos em série de 1:50 (dose 1 e 2) e 1:200 (dose 3) para um volume final de 100 µL e incubados por 90 min a 37 °C. Após novo ciclo de lavagem, foram adicionados 100 µL de anticorpo secundário conjugado a peroxidase para detecção de IgG total com anti-IgG-HRP 1:10.000 (SIGMA - A2304) e detecção de subclasses de anticorpos IgG com anti-IgG1-HRP (SIGMA - A4416) 1:8000 e com anti-IgG2c-HRP 1:4000 (SOUTHERBIOTEC-1079-05). Essa etapa foi seguida de novas lavagens com PBS-T, sendo a revelação realizada com 100 µL/poço da solução reveladora (OPD/H₂O₂) por 15 min em temperatura ambiente ao abrigo de luz. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de solução de ácido sulfúrico 1 M. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em um leitor de placas EPOCH (BIOTEK). A avaliação da afinidade do anticorpo ao antígeno segue um protocolo de ELISA semelhante, com a adição de uma etapa envolvendo incubação por 15 min com diferentes concentrações de tiocianato de amônio (0M a 4M) antes da incubação com o anticorpo secundário. Em todos os casos, os títulos obtidos para o grupo salina foram usados para calcular um resultado médio, que foi deduzido dos títulos de todos os outros grupos experimentais. Os experimentos dessa seção foram conduzidos em parceria com o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

3.11.2 Avaliação do potencial imunizante dos anticorpos anti-RBD

Um teste de neutralização viral (VNT) baseado em efeito citopático (CPE) foi realizado utilizando SARS-CoV-2/humano/BRA/SP02cc/2020 (GenBank MT350282.1) [99], com uso de células Vero/mL (referência ATCC CCL-81), plaqueadas a 5x10⁴ células Vero/mL em placas de 96 poços 24 h antes do experimento. As células foram mantidas a 37 °C com 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% de FBS inativado pelo calor (Thermo Fisher Scientific Inc.,

MA, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA). Os soros de cada grupo de animais foram preparados em *pools* inativados por calor e diluídos em série por um fator de base dois, resultando em oito diluições (1:20 a 1:10.240). Posteriormente, as amostras de soro foram misturadas 1:1 em volume com 10³ TCID (50/mL) de SARS-CoV-2 diluído em DMEM, e a mistura foi pré-incubada a 37 °C por 1 h para fins de neutralização. As misturas de soro e vírus foram transferidas para uma monocamada de células confluentes e incubadas por 72 h. Após esse procedimento, as placas foram analisadas utilizando microscopia óptica e avaliadas quanto à presença ou ausência de CPE-VNT. Os títulos de anticorpos neutralizantes correspondem à maior diluição do soro capaz de neutralizar o crescimento viral. Uma confirmação adicional foi realizada fixando as placas e manchando-as com amido black (solução de amido black a 0,1% [m/m] com ácido acético a 5,4% e acetato de sódio a 0,7%) por 30 min. Um soro de controle positivo interno foi utilizado para cada ensaio com finalidade de monitoramento da qualidade. Todos os procedimentos envolvendo SARS-CoV-2 foram realizados em um laboratório de nível 3 de biossegurança localizado no ICB-USP, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde [100]. Os experimentos dessa seção foram conduzidos em parceria com o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

3.11.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Prism 9 (GraphPad Software, EUA) e incluíram uma análise de variância (ANOVA) *two-way*, seguida de um teste-t corrigido para comparações múltiplas (pós-teste de correção de Bonferroni). Valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os valores são relatados como valores individuais ou como média ± DP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios exploratórios de síntese de AuNPs

A fim de realizar uma prova de conceito da síntese de AuNPs em dispositivo microfluídico, foi feita uma primeira reação seguindo parâmetros descritos em literatura. Com base no estudo de Yagyu *et al.* [79], o primeiro experimento de síntese de AuNPs (amostra chamada de A01) foi conduzido à temperatura ambiente, com vazão de 0,05 ml/min, utilizando solução de NaCt como agente redutor e solução de ácido tânico como agente redutor complementar para conversão de cloreto de ouro no dispositivo microfluídico “Reator A”. O produto da síntese apresentou coloração rosa-acinzentado, conforme mostrado na Figura 21.



Figura 21 – Produto da síntese de AuNPs à temperatura ambiente, com vazão de 0,05 ml/min, utilizando “Solução A” e “Solução B” no microdispositivo “Reator A” (amostra A01).

No estudo de referência, o dispositivo utilizado foi confeccionado em vidro, com diâmetro de canal de 430 μm , obtendo nanopartículas esféricas monodispersas de 11,5 nm. A presença de AuNPs esféricas monodispersas de diâmetro em torno de 10 nm resulta em uma suspensão de coloração vermelha [101], diferente da coloração da amostra obtida, indicando qualitativamente que o resultado do estudo

de referência não foi reproduzido nesse experimento devido às diferentes características de geometria e material do dispositivo utilizado. As análises de DLS da amostra A01 mostraram a presença de nanopartículas de diâmetro hidrodinâmico médio de 141,1 nm com índice de polidispersão (PD) de 0,102 e potencial zeta de -43,4 mV. Além da diferença de material, geometria e diâmetro dos canais do dispositivo “Reator A” em relação ao microdispositivo utilizado no estudo de referência, a diferença significativa no tamanho das partículas obtidas pode ter sido influenciada pela diferença no tempo de residência das partículas no misturador. A vazão de 0,05 ml/min utilizada por Yagyu e colaboradores é equivalente a um tempo de residência de 467 s no “Reator A”, contra 46,2 s no dispositivo da referência. Dessa forma, a velocidade linear do fluido (v) e, conseqüentemente, o número de Reynolds (Re) equivalentes à vazão de 0,05 ml/min no “Reator A” são menores ($v = 0,002$ m/s, $Re = 1,49$), dificultando a transferência de massa e calor. Esse resultado confirma que o tempo de residência é um fator importante para a síntese de AuNPs em microfluídica.

A vazão foi, então, definida em 0,5 mL/min de forma a ajustar o tempo de residência para 46,7 s, sem alteração nas outras variáveis do processo, para obtenção de resultado passível de comparação com o estudo de referência. Nessas condições, foram obtidas nanopartículas de diâmetro hidrodinâmico médio de 253,2 nm, PD de 0,179 e potencial zeta -38,8 mV. Percebe-se, portanto, que mesmo com tempos de retenção similares, o produto obtido apresentou características físico-químicas ainda mais divergentes do produto do estudo de Yagyu e colaboradores. Isso indica que a geometria e material do microdispositivo impacta diretamente no resultado da síntese, devido à influência desses fatores nas características do regime de escoamento (alteração no número de Reynolds, que é influenciado, também, pela geometria do canal e rugosidade do material [102]).

4.1.1 Avaliação de diferentes geometrias do misturador

A fim de avaliar a influência da geometria do microdispositivo no resultado da síntese de AuNP, foram sintetizadas partículas utilizando dois microdispositivos diferentes, “Reator A” e “Reator B”, cujas características estão descritas no Item 2.1. As condições e resultados das sínteses nos dispositivos “Reator A” e “Reator B” estão

sintetizadas nas tabelas Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente. O tamanho de partícula e o índice de polidispersão (PD) estão apresentados baseados em intensidade.

Tabela 4 – Condições de experimento e resultados das sínteses no dispositivo “Reator A”.

Amostra	Vazão (mL/min)	Tempo de residência (s)	Velocidade (mm/s)	Tamanho médio de partícula (nm)	PD	Zeta (mV)
TA01	0,90	25,9	39,6	145,1	0,191	-42,8
TA02	0,70	33,4	30,8	319,4	0,219	-22,1
TA03	0,50	46,7	22,0	253,2	0,179	-38,8
TA04	0,30	77,8	13,2	322,2	0,221	-22,0
TA05	0,10	233,5	4,4	453,5	0,303	-18,3
TA06	0,05	467,0	2,2	392,1	0,264	-22,8

Tabela 5 – Condições de experimento e resultados das sínteses no dispositivo “Reator B”.

Amostra	Vazão (mL/min)	Tempo de residência (s)	Velocidade (mm/s)	Tamanho médio de partícula (nm)	PD	Zeta (mV)
TB00	1,10	14,7	115,0	222,8	0,157	-13,4
TB01	0,62	25,9	64,8	121,2	0,308	-41,6
TB02	0,49	33,4	51,2	20,6	0,251	-47,3
TB03	0,35	46,7	36,6	89,7	0,165	-41,9
TB04	0,21	77,8	22,0	278,9	0,194	-44,9
TB05	0,07	233,5	7,3	346,3	0,232	-30,0
TB06	0,03	467,0	3,1	402,0	0,266	-19,8

Através dos experimentos executados no “Reator A”, percebe-se que a alteração no tempo de residência afeta o resultado de tamanho de partícula, porém não parece haver uma relação linear e/ou lógica que possibilite utilizar esse parâmetro de entrada para controlar a obtenção de partículas maiores ou menores nessas condições. Todas as sínteses resultaram em partículas grandes (maiores que 140 nm) com módulo do potencial zeta maior do que 20 mV (com exceção da amostra TA05), indicando que há uma boa estabilidade coloidal devido à alta repulsão de cargas e, portanto, menor tendência das partículas à aglomeração [86]. Já no “Reator B”, percebe-se que o tamanho de partícula atinge um ponto mínimo quando ajustado o tempo de residência em torno de 33,4 s, com aumento gradativo do tamanho para tempos maiores e menores. O experimento TB02 resultou em partículas de 20,6 nm (em média), que é um tamanho adequado para algumas aplicações biológicas como entrega gênica e de fármacos [29]. Essa mesma amostra apresentou potencial zeta de -47,3 mV, indicando boa estabilidade coloidal, além de um PD de 0,251, indicado baixa polidispersão de tamanhos. A variação nos resultados para os experimentos em ambos os dispositivos pôde ser observada também qualitativamente através da análise visual. As figuras Figura 22 e Figura 23 mostram as amostras dos experimentos nos dispositivos “Reator A” e “Reator B”, respectivamente.



Figura 22 – Aspecto visual das amostras resultantes dos experimentos no dispositivo “Reator A”. Da esquerda (maior vazão) para a direita (menor vazão), amostra TA01, TA02, TA03, TA04, TA05 e TA06.

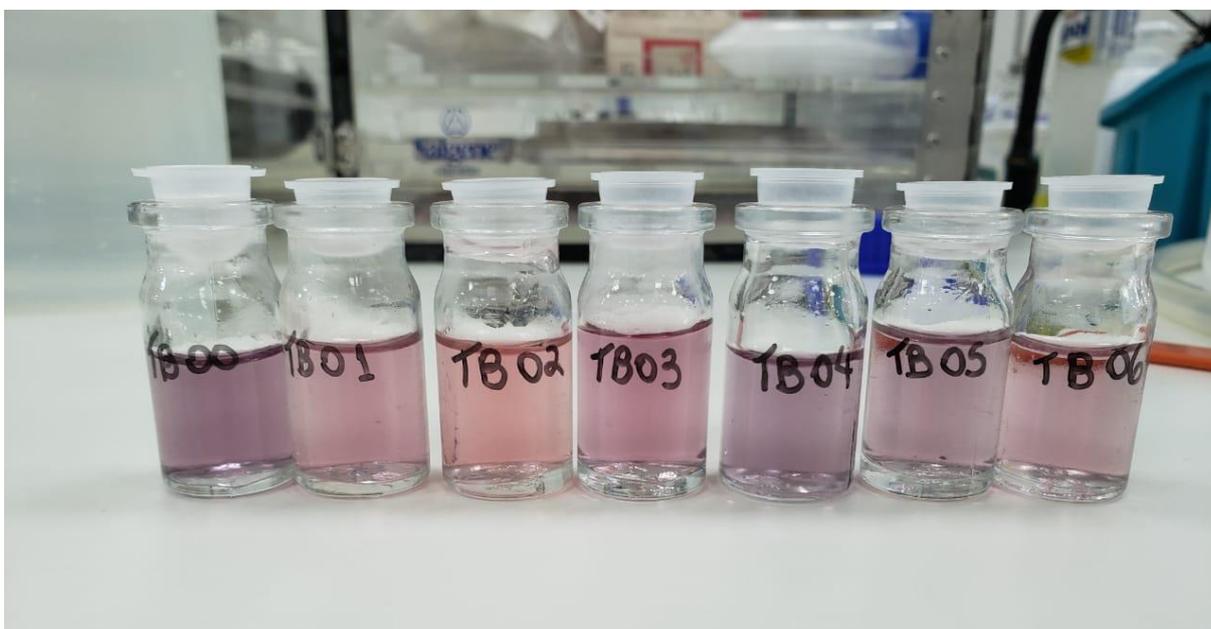


Figura 23 – Aspecto visual das amostras resultantes dos experimentos no dispositivo “Reator B”. Da esquerda (maior vazão) para a direita (menor vazão), amostra TB00, TB01, TB02, TB03, TB04, TB05 e TB06.

Percebe-se que houve mudança visível na coloração das amostras com diferentes tamanhos de partícula. A Figura 24 mostra o espectro de absorbância de luz em comprimentos de onda de 360 nm a 800 nm das amostras dos experimentos feitos no “Reator A”.

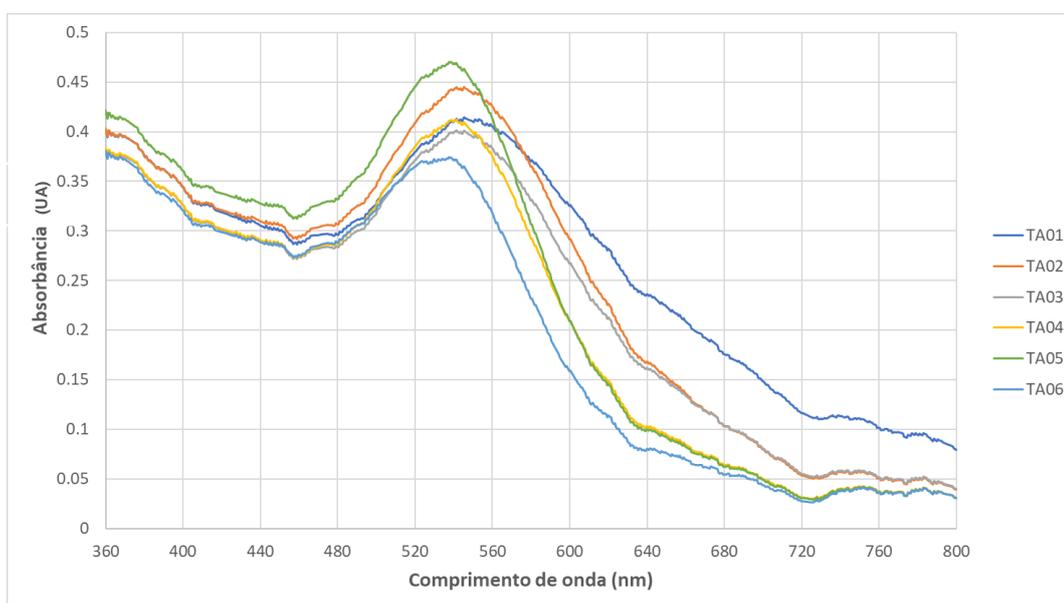


Figura 24 – Espectro de absorbância de luz das amostras dos experimentos feitos no “Reator A”.

Como pode ser observado na Figura 24, há deslocamento do pico de absorbância e diferença na largura dos picos entre as diferentes amostras. Esse resultado condiz com a discrepância de tamanhos e PD observadas nas amostras e com dados da literatura, que mostram que partículas de diferentes tamanhos absorvem luz em comprimentos de onda diferentes e que picos de absorbância mais estreitos indicam menor polidispersão no tamanho das partículas [79,103,104]. A Figura 25 traz o espectro de absorbância das amostras dos experimentos feitos no “Reator B”.

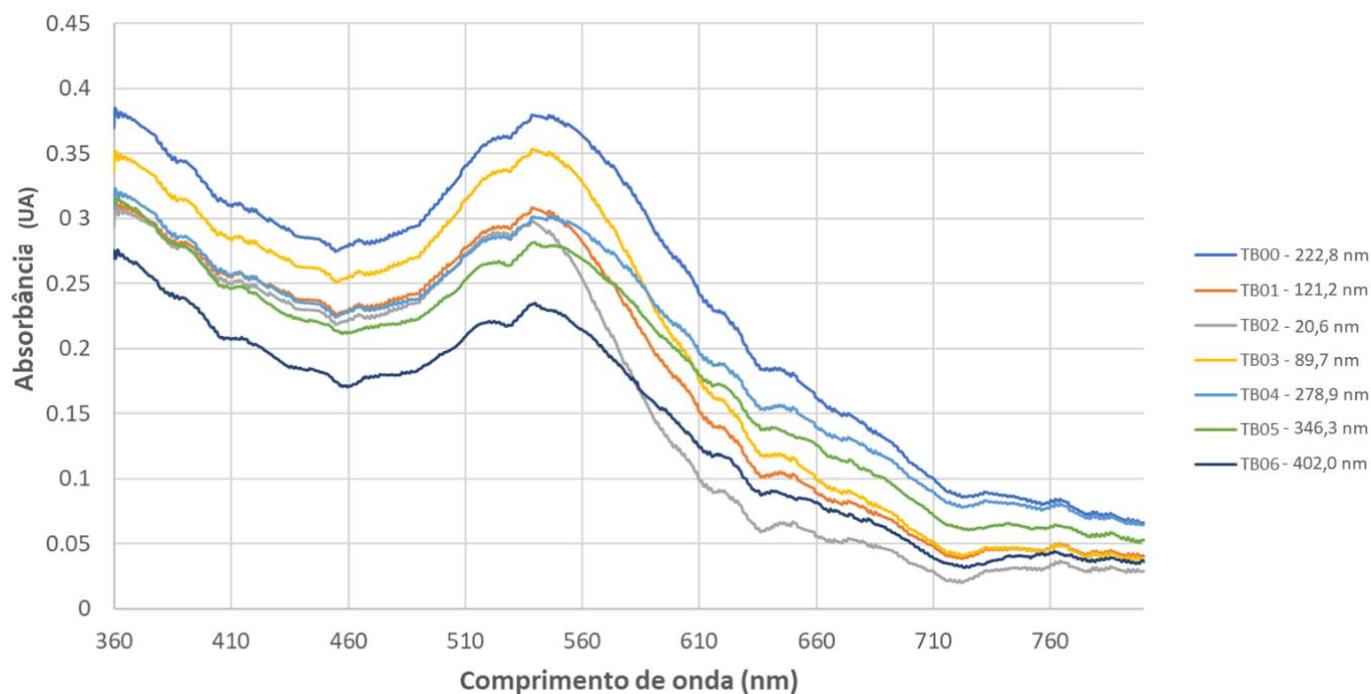


Figura 25 – Espectro de absorvância de luz das amostras dos experimentos feitos no “Reator B”.

Pode ser observado no gráfico da Figura 25 que há diferença na largura dos picos, condizente com as discrepâncias no PD das amostras. Observa-se também que, conforme esperado devido à diferença no tamanho das partículas, há deslocamento dos picos de absorvância. O deslocamento dos picos de absorvância das amostras do “Reator B” pode ser mais bem observado no gráfico apresentado na Figura 26.

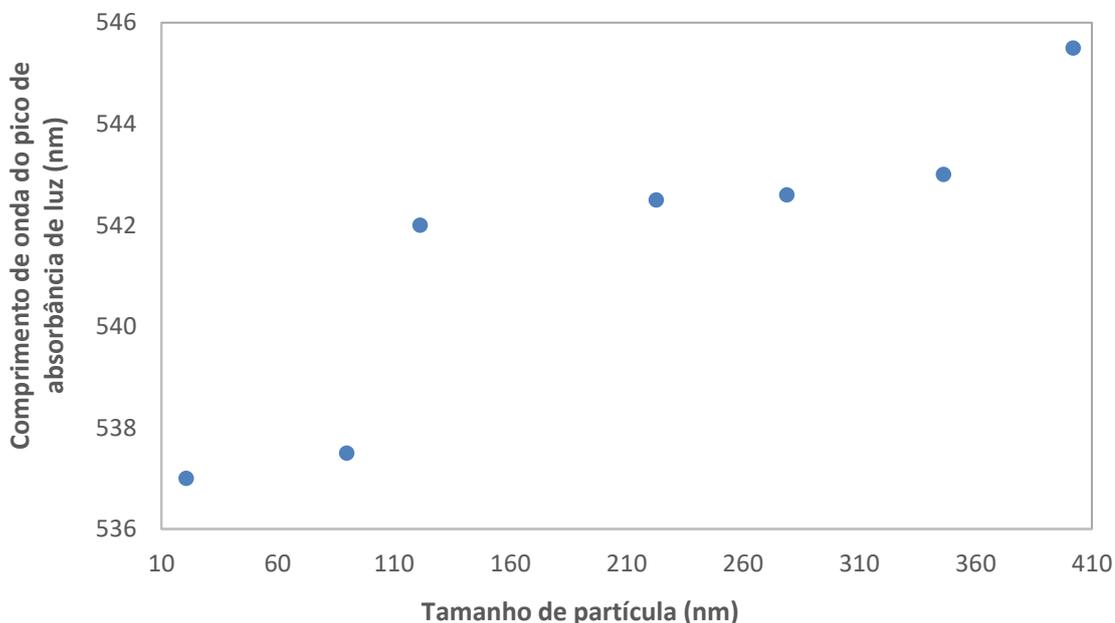


Figura 26 – Comprimento de onda do pico de absorbância de luz das amostras dos experimentos feitos no “Reator B”.

Na Figura 26 observa-se que o comprimento de onda do pico de absorbância diminui conforme a diminuição do tamanho médio das partículas presentes na amostra, atingindo o ponto mínimo para a amostra TB02, que é a amostra com menor tamanho médio de partícula. Esses resultados também estão condizentes com dados da literatura, que mostram que partículas menores deslocam o pico de absorbância na direção de comprimentos de onda menores (espectro azul) [79,104].

4.1.2 Avaliação de reprodutibilidade

Para avaliar a reprodutibilidade da síntese do experimento TB02, condição em que o resultado de tamanho médio de partícula está próximo ao ponto de inflexão, foram feitas mais duas triplicatas nas mesmas condições, porém em dias e horários diferentes, para excluir a possibilidade de os resultados serem influenciados por condições ambientais. Os resultados da triplicata 1, referente à síntese feita no período da manhã, e da triplicata 2, referente à síntese feita no período da tarde no dia seguinte, estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados das triplicatas 1 e 2 das sínteses com tempo de residência de 32,3 s à temperatura ambiente no dispositivo “Reator B” a partir das soluções “Solução A” e “Solução B”.

Triplicata	Amostra	Tamanho médio de partícula (nm)	PD	Média do tamanho (nm)	Desvio padrão do tamanho (nm)	Média do PD	Desvio padrão do PD
1	RB02_R1	19,3	0,233	19,9	0,79	0,234	0,0012
	RB02_R2	20,8	0,235				
	RB02_R3	19,6	0,233				
2	RB02_R4	20,9	0,235	20,1	0,72	0,250	0,0131
	RB02_R5	19,5	0,260				
	RB02_R6	19,9	0,241				

Os resultados de média e desvio padrão das amostras mostram que não há diferença estatística entre as triplicatas em relação à média do tamanho médio de partícula e ao PD, portanto, a síntese de AuNPs nas condições descritas se apresentou reprodutível. A imagem da Figura 27 mostra o aspecto visual das amostras RB02_R1 a RB02_R6. Não houve mudança visível de coloração entre as amostras, o que corrobora qualitativamente com o fato de que os resultados foram reprodutíveis.

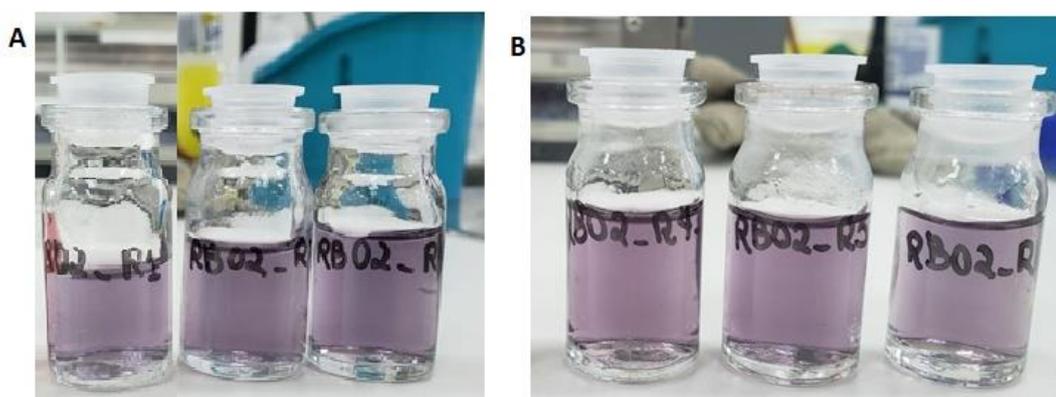


Figura 27 – Aspecto visual das triplicatas feitas na condição do experimento TB02. A) triplicata 1; B) triplicata 2.

A imagem da Figura 28 mostra o espectro de absorvância de luz em comprimentos de onda de 360 nm a 800 nm das amostras RB02_R1 a RB02_R6. Observa-se que não há deslocamento no pico de absorvância entre as amostras,

indicando que o tamanho de partícula se mantém constante.

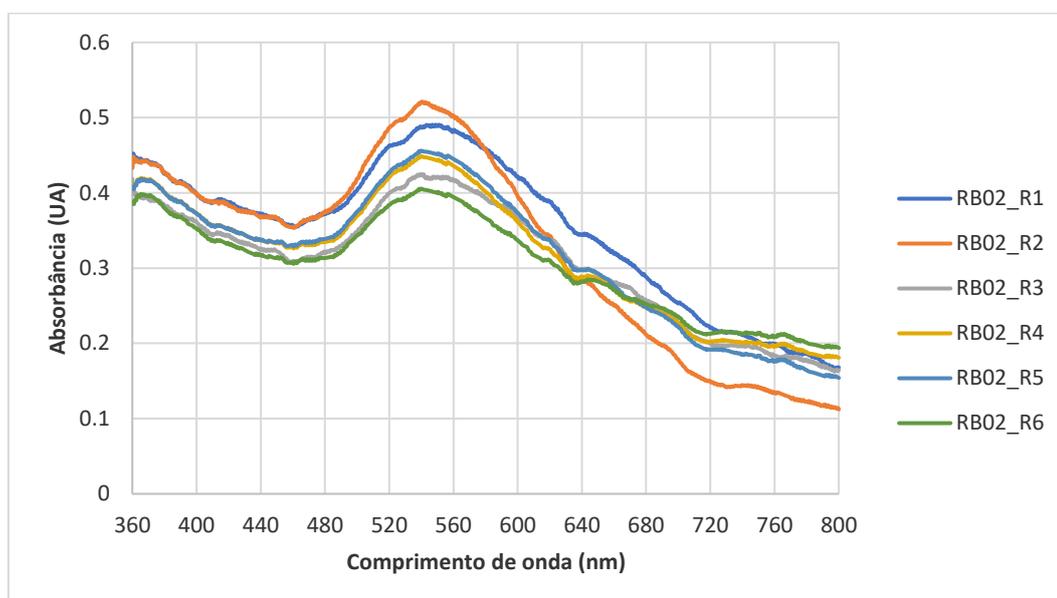


Figura 28 – Espectro de absorvância de luz das amostras RB02_R1 a RB02_R6.

Nota-se na Figura 28 que há variação na largura dos picos. Esse resultado é esperado uma vez que existe variação no PD entre as amostras, porém essa diferença não é estatisticamente significativa, conforme mostrado nos dados da Tabela 6. A diferença da largura dos picos, visualmente, causa a impressão de que há variação na intensidade do pico, que estaria ligada diretamente à concentração de AuNPs da amostra. A concentração de partículas, porém, não está relacionada apenas à altura do pico, e sim à área sob a curva [103]. A Tabela 7 mostra a área sob a curva do espectro de absorvância de cada uma das amostras, integrada de 360 nm a 800 nm.

Tabela 7 – Área sob a curva do espectro de absorvância de luz integrada de 360 nm a 800 nm das triplicatas 1 e 2 das sínteses com tempo de residência de 32,376 s à temperatura ambiente no dispositivo “Reator B” a partir das soluções “Solução A” e “Solução B”.

Triplicata	Amostra	Área do espectro de absorvância	Área média	Desvio padrão
1	RB02_R1	154,79	144,92	9,225
	RB02_R2	143,45		
	RB02_R3	136,52		
2	RB02_R4	140,06	138,07	3,374
	RB02_R5	139,97		
	RB02_R6	134,17		

Não houve diferença estatística entre os valores de área de $144,9 \pm 9,2$ e $138,1 \pm 3,4$, portanto não houve diferença significativa na concentração de AuNPs entre as triplicatas, ratificando a reprodutibilidade do experimento. Esses experimentos mostram que, de fato, a síntese de AuNPs no sistema microfluídico desenvolvido gerou resultados reprodutíveis por possibilitar o controle preciso dos parâmetros de processo [81,105]. Esse resultado corrobora com dados da literatura que mostram que a produção de nanopartículas por via microfluídica tende a resultados mais reprodutíveis, especialmente em comparação com sínteses nas mesmas condições em reatores tradicionais [33,34].

4.1.3 Avaliação da influência da temperatura de reação

Para avaliar a influência da temperatura de reação no resultado da síntese de AuNPs, foram mantidas as condições dos experimentos RB02 (tempo de residência 32,4 s; vazão 0,5 ml/min; velocidade 0,05 m/s; $Re_{23,4}$; dispositivo “Reator B”), que apresentaram resultados reprodutíveis, e foram feitas novas sínteses a temperaturas de 50°C, 75°C e 100°C, cujos resultados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições de experimento e resultados das sínteses no dispositivo “Reator B” com variação da temperatura de reação (tempo de residência 32,4 s)

Amostra	Vazão (ml/min)	Temperatura (°C)	Tamanho médio de partícula (nm)	PD	Zeta (mV)
RB02	0,5	25	19,2	0,240	-40,3
RB03	0,5	50	136,7	0,184	-33,7
RB04	0,5	75	285,8	0,199	-31,9
RB05	0,5	100	289,7	0,138	-19,5

Nota-se, nos resultados apresentados na Tabela 8

Tabela 8, que sínteses feitas sob temperaturas mais altas resultaram em partículas de tamanho maior. Esse resultado condiz com dados da literatura, que mostram outras sínteses de AuNPs em dispositivo microfluídico que resultam em partículas de tamanho maior conforme aumento da temperatura de reação, para uma mesma vazão [106]. A temperatura de reação influencia nos processos de nucleação e crescimento dos cristais de ouro e os resultados mostraram que, nas condições estudadas, temperaturas mais elevadas favorecem o crescimento do cristal. O aumento da temperatura também influenciou na estabilidade da suspensão coloidal, causando a diminuição do módulo do potencial zeta. Todos os produtos de reação, porém, apresentaram PD abaixo de 0,3, indicando baixa polidispersão no tamanho das partículas. O aspecto visual das amostras RB03, RB04 e RB05 pode ser visto na Figura 29.



Figura 29 – Aspecto visual das amostras RB03 (50°C), RB04 (75°C) e RB05 (100°C).

Observa-se que a amostra RB03 apresentou tonalidade vermelha, enquanto as RB04 e RB05 não apresentaram coloração significativa. A ausência de cor pode ser resultado da baixa concentração de AuNPs, indicando baixa conversão do sal de ouro. Outras hipóteses possíveis seriam a formação de partículas grandes que decantaram dentro do dispositivo ou as partículas ficaram aderidas às paredes do dispositivo. O espectro de absorvância de luz das amostras RB02 a RB05 está apresentado no gráfico da Figura 30.

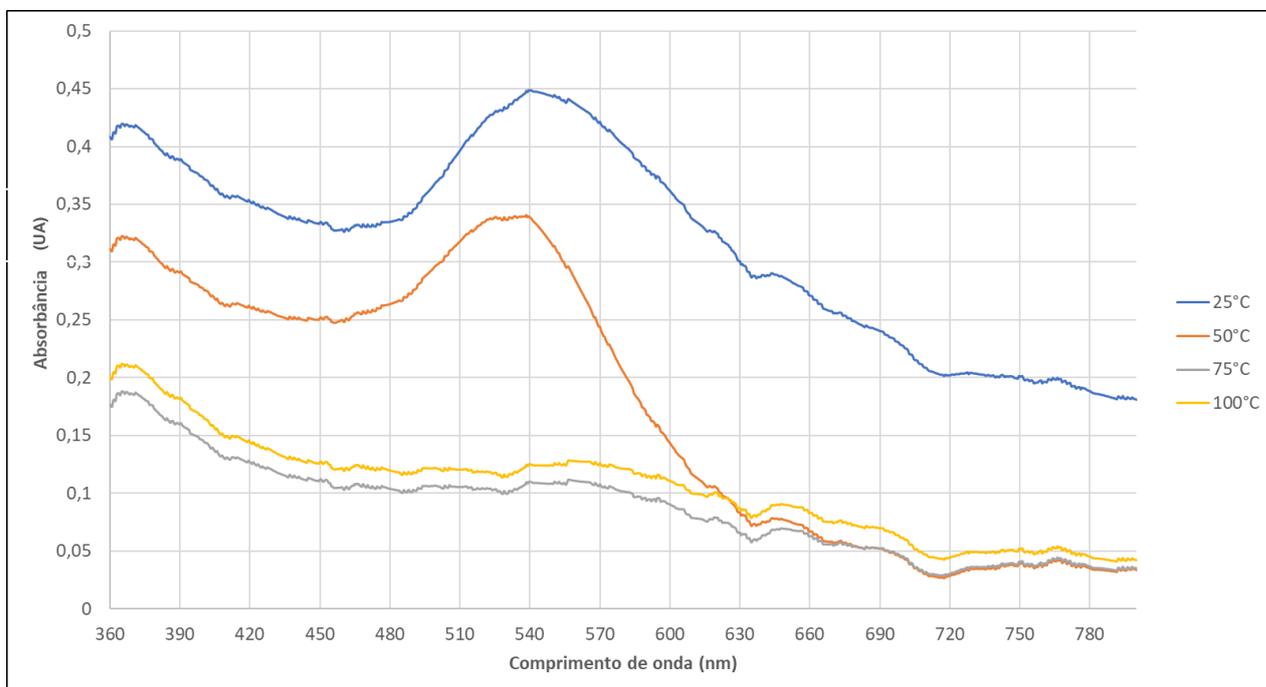


Figura 30 – Espectro de absorvância de luz das amostras RB02 (25°C), RB03 (50°C), RB04 (75°C) e RB05 (100°C).

O gráfico da Figura 30 mostra que o aumento da temperatura de reação de 25°C para 50°C resultou no deslocamento do pico de absorvância no sentido do comprimento de onda azul (de 544 nm a 536 nm). Esse deslocamento no sentido de comprimentos de ondas menores está associado à formação de AuNPs menores, porém, os resultados de DLS da amostra RB03 mostram um aumento no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas em suspensão. Isso significa que entre as amostras RB02 e RB03 pode haver mudança não apenas de tamanho de partícula, mas também de morfologia, uma vez que a morfologia das nanopartículas também influencia no deslocamento do pico de absorvância [104]. Percebe-se também que há diminuição da área sob a curva do espectro UV-VIS de 360 nm a 800 nm conforme aumento da temperatura de síntese, indicando que, nas condições estudadas, temperaturas mais altas resultam em menor concentração de AuNPs, devido, novamente, a precipitação das partículas no dispositivo ou à baixa conversão de sal. As reações a 75°C e a 100°C não apresentaram pico de absorvância em torno de 540 nm, indicando baixa concentração de AuNPs na suspensão, o que justifica a

ausência de coloração das amostras.

4.1.4 Avaliação de estabilidade

Duas amostras de mesmo lote de cada uma das reações RB02 e RB03 foram armazenadas pelo período de até 42 dias. Uma das amostras de cada síntese foi armazenada a frio em geladeira e a outra à temperatura ambiente, ambas ao abrigo da luz. Os espectros de absorbância de luz das amostras RB02 e RB03 ao longo do tempo para ambas as condições de armazenamento estão mostrados nas figuras Figura 31 e Figura 32, respectivamente.

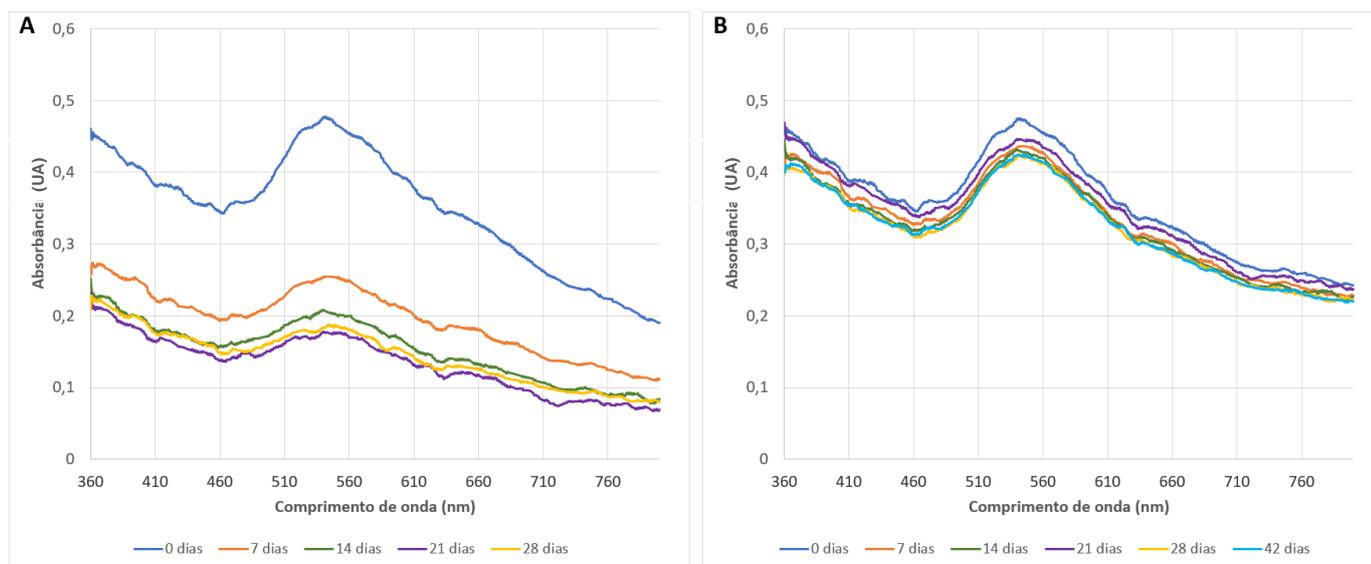


Figura 31 – Espectro de absorbância de luz da amostra RB02 ao longo do tempo. A) armazenada à temperatura ambiente; B) armazenada em geladeira.

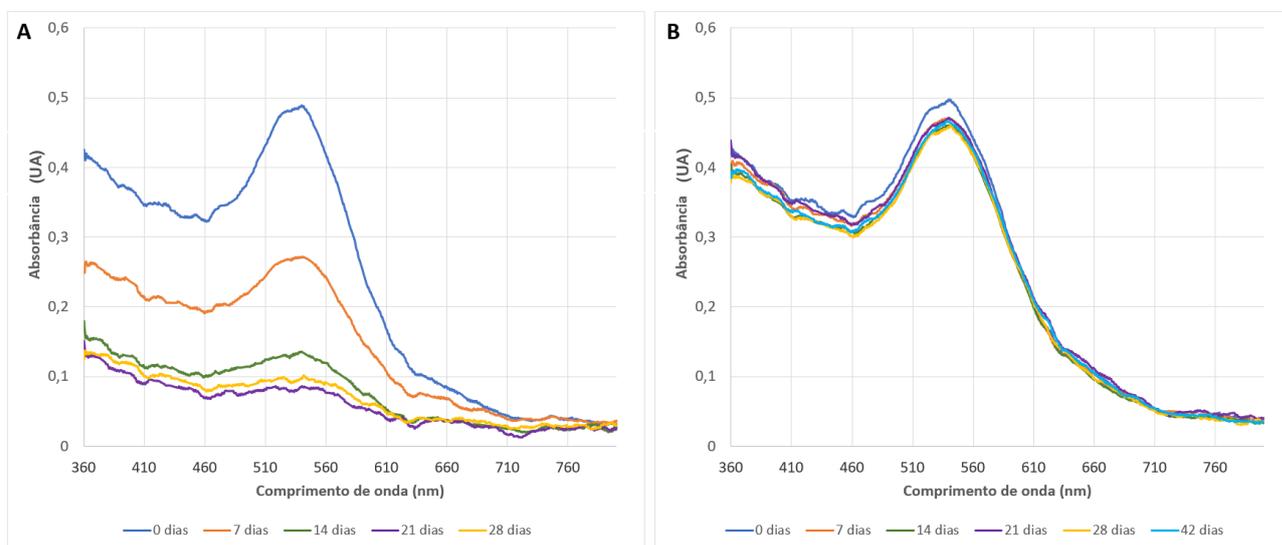


Figura 32 – Espectro de absorvância de luz da amostra RB03 ao longo do tempo. A) armazenada à temperatura ambiente; B) armazenada em geladeira.

Ambas as amostras armazenadas à temperatura ambiente apresentaram degradação significativa ao longo do tempo. Isso pode ser comprovado através da diminuição da intensidade do pico de absorvância em torno de 540 nm, que indica diminuição da concentração de AuNPs em suspensão ao longo do tempo. A concentração diminui quando há aglomeração e precipitação das partículas. Foi possível observar a formação de precipitado e a perda expressiva de cor nas amostras armazenadas à temperatura ambiente ao longo do tempo. Já nas amostras armazenadas em geladeira, observou-se que não há diminuição expressiva de intensidade no pico de absorvância de luz ao longo de 42 dias, indicando assim que não houve mudança significativa na concentração de nanopartículas e, portanto, as amostras se mantiveram estáveis. Também não houve formação visível de precipitado ou alteração de cor nas amostras armazenadas em geladeira, confirmando a estabilidade das suspensões quando armazenadas nas condições indicadas. O aspecto visual de todas as amostras no dia zero e no dia 42 pode ser visualizado nas figuras Figura 33 e Figura 34, respectivamente.

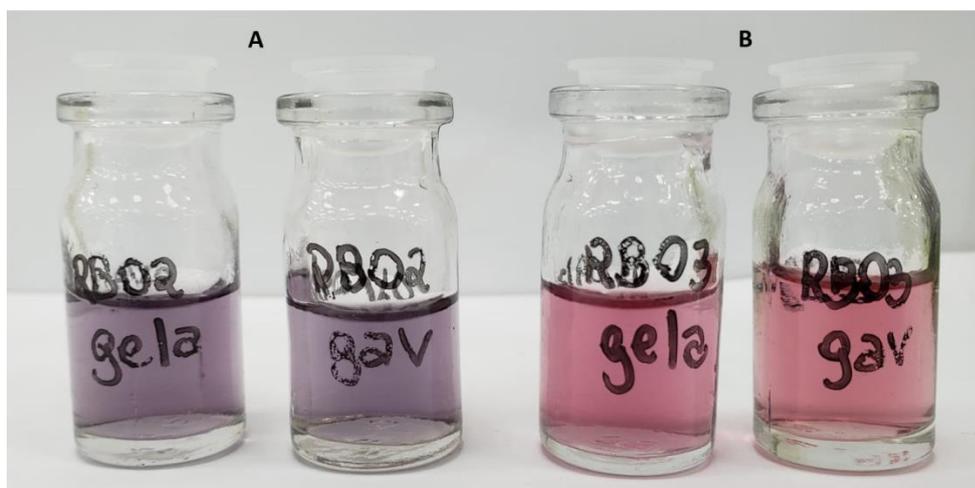


Figura 33 – Amostras no dia zero. A) RB02; B) RB03.

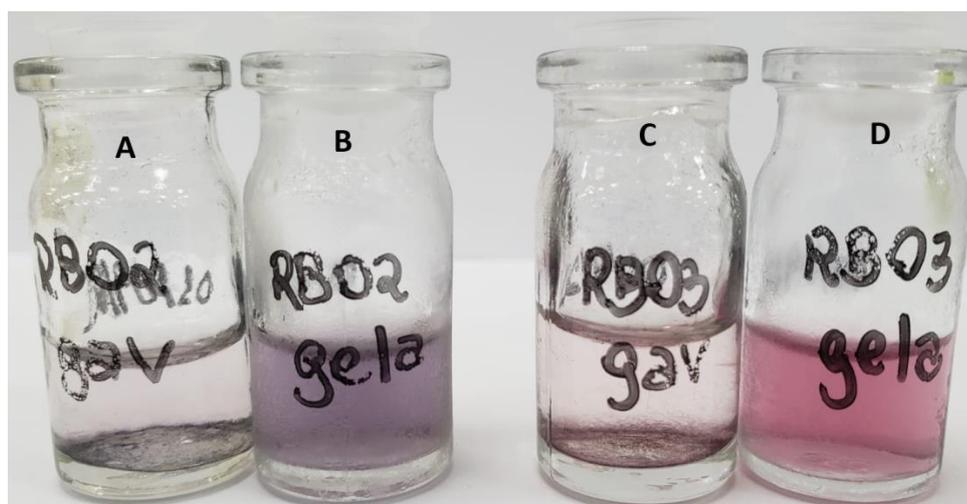


Figura 34 – Amostras após 42 dias de armazenamento. A) RB02 armazenada à temperatura ambiente; B) RB02 armazenada sob refrigeração; C) RB03 armazenada à temperatura ambiente; D) RB03 armazenada sob refrigeração.

4.2 Reprodução da reação clássica de Turkevich

A reação clássica de Turkevich para síntese de AuNPs a partir de NaCl e cloreto de ouro (razão molar 3:1) em reator tradicional foi adaptada ao microdispositivo “Reator B” utilizando tempo de residência de 300 s (amostra “BTurk01”) e 900 s (amostra “BTurk02”). Foram ajustados os tempos de residência de acordo com os tempos de reação comumente utilizados em literatura nas reações de Turkevich em

sistemas de reatores clássicos, de 5 minutos (300 s) [103] e 15 minutos (900 s) [107]. O aspecto visual dos produtos das reações pode ser visto na Figura 35.

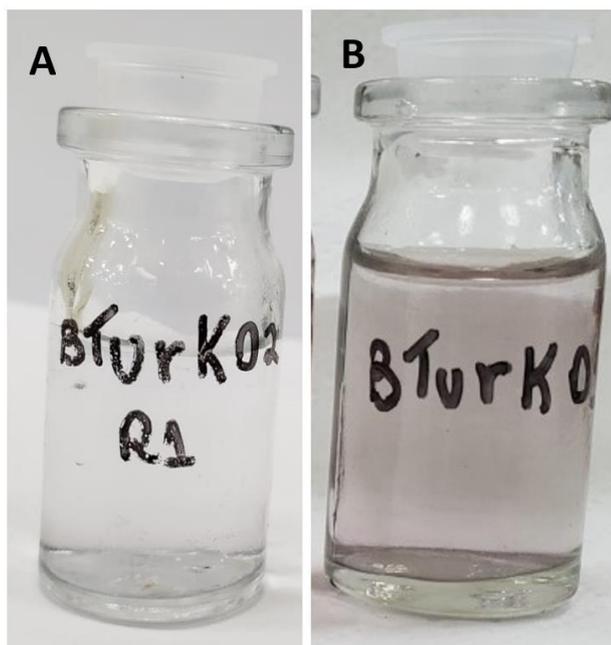


Figura 35 – Aspecto visual das reações de Turkevich feitas no “Reator B”. A) tempo de residência de 900 s (amostra BTurk02); B) tempo de residência de 300 s (amostra BTurk01).

A amostra BTurk01 (tempo de residência 300 s) apresentou coloração cinza. A mudança de cor do produto de reação em relação às soluções dos reagentes indica a presença de nanopartículas, mas não em concentração suficiente para a amostra apresentar coloração típica de AuNPs em suspensão. De fato, a análise de DLS indicou a presença de nanopartículas, com média de tamanho de 146,7 nm monodispersas (PD 0,109) e estáveis (potencial zeta -42,0), porém o espectro de absorbância de luz, conforme gráfico da Figura 36, não apresentou um pico bem definido em torno de 540 nm, indicando baixa concentração de AuNPs.



Figura 36 – Espectro de absorbância de luz da amostra BTurk01 (reação de Turkevich com tempo de residência de 300 s).

Na amostra BTurk02 (900 s) não houve alteração perceptível de coloração, indicando ausência de AuNPs em suspensão. Não foi possível analisar essa amostra por DLS porque, mesmo sem diluição, a concentração de nanopartículas estava abaixo do limite de detecção do equipamento. Nota-se, no gráfico do espectro de absorbância da amostra BTurk02 na Figura 37, que não foi possível detectar a presença de AuNPs em torno de 540 nm.



Figura 37 – Espectro de absorbância de luz da amostra BTurk02 (reação de Turkevich com tempo de residência de 900 s).

A síntese com tempo de residência mais baixo (maior velocidade linear e maior Re) resultou na presença de nanopartículas em suspensão, mesmo que em baixa concentração, enquanto o aumento no tempo de residência nas mesmas condições não resultou presença de AuNPs em quantidade detectável. Isso indica que, nas condições estudadas, o transporte de massa está limitando a cinética de nucleação dos cristais, ou que as partículas apresentaram baixa estabilidade e precipitaram dentro do dispositivo. Entende-se, dessa forma, que para viabilizar a reação de Turkevich no microdispositivo, outras adaptações ao método clássico devem ser empregadas.

4.3 Método de Turkevich adaptado

4.3.1 Variação da concentração inicial dos reagentes

A redução do cloreto de ouro com apenas NaCt em excesso como agente redutor, com tempo de residência de 300 s no dispositivo “Reator B”, foi repetida nas mesmas condições do experimento BTurk01, porém com os reagentes iniciais dez vezes mais concentrados (mantendo a proporção NaCt:Ouro em 3:1 molar). A síntese também foi feita com tempo de residência de 90 s, conforme estudo de Cardoso *et al.* [96]. O resultado da análise de DLS das amostras resultantes dos experimentos mencionados está apresentado na Tabela 9 e o aspecto visual das amostras está mostrado na Figura 38.

Tabela 9 - Condições de experimento e resultados das sínteses pelo método de Turkevich adaptado com concentrações iniciais de NaCt de 7,5 mM e cloreto de ouro de 2,5 mM em reação a 100 °C

Amostra	Tempo de residência (s)	Tamanho (nm)	PD	Zeta (mV)
BRob01	300	124,8	0,205	-36,8
BRob02	90	119,8	0,210	-34,2

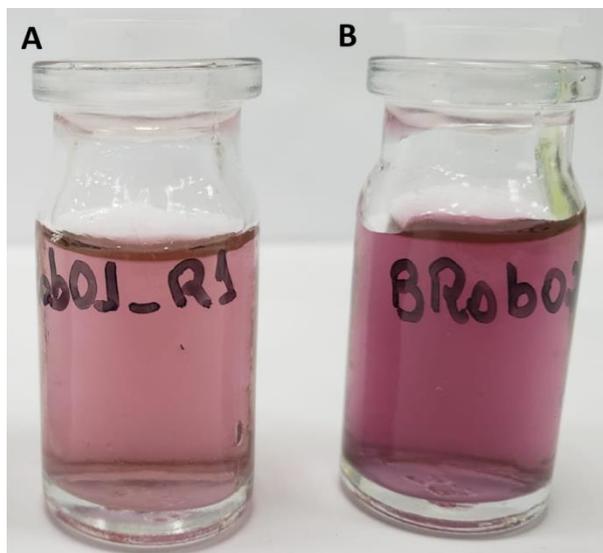


Figura 38 - Condições de experimento e resultados das sínteses pelo método de Turkevich adaptado com concentrações iniciais de NaCt de 7,5 mM e cloreto de ouro de 2,5 mM. A) Amostra BRob01 (tempo de residência de 300 s); B) Amostra BRob02 (tempo de residência de 90 s).

A mudança visível de coloração da amostra BRob01 em relação à amostra BTurk01 (feita nas mesmas condições, porém com menor concentração inicial de reagentes), indica maior concentração de AuNPs em suspensão. A amostra BRob01 também apresentou tamanho de partícula menor (124,7 nm contra 146,7 nm da BTurk01). Esse resultado mostra que o aumento da concentração dos reagentes favorece a síntese de AuNPs pelo método de Turkevich. A limitação de transferência de massa, nesse caso, é superada pelo aumento da concentração de moléculas de sal de ouro e de NaCt, aumentando a probabilidade de colisão dessas moléculas e, conseqüentemente, aumentando a taxa de reação. O aumento da vazão entre BRob01 e BRob02 resultou na diminuição pouco significativa no tamanho de partícula, com PD e potencial zeta também semelhantes. Observou-se, porém, diferença visível na coloração das amostras. O espectro de absorvância de luz das amostras BRob01 e BRob02 está mostrado no gráfico da Figura 39.

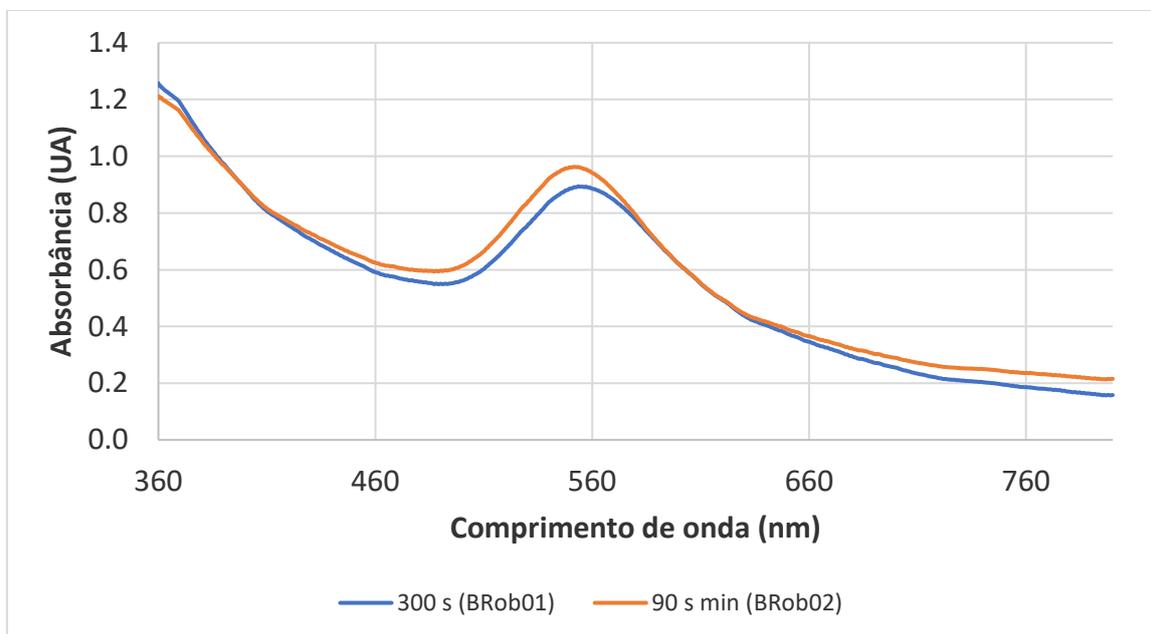


Figura 39 – Espectro de absorvância de luz das amostras BRob01 (tempo de residência de 300 s) e BRob02 (tempo de residência de 90 s) de 360 nm a 800 nm

Pode-se observar o deslocamento do pico de absorvância no sentido da luz azul no espectro da amostra BRob02, mesmo com tamanho médio de partículas muito próximo entre as duas amostras. É possível que haja diferença de morfologia entre as partículas das amostras BRob01 e BRob02, o que justificaria a alteração de cor e o deslocamento do pico de absorvância, mesmo com partículas de tamanho médio semelhante.

Para avaliar a conversão do sal de ouro, foi analisado o espectro de absorção de luz das amostras de 190 nm a 320 nm, sabendo que o cloreto de ouro apresenta pico de absorvância em torno de 220 nm [97]. O resultado dessa análise é mostrado no gráfico da Figura 40.

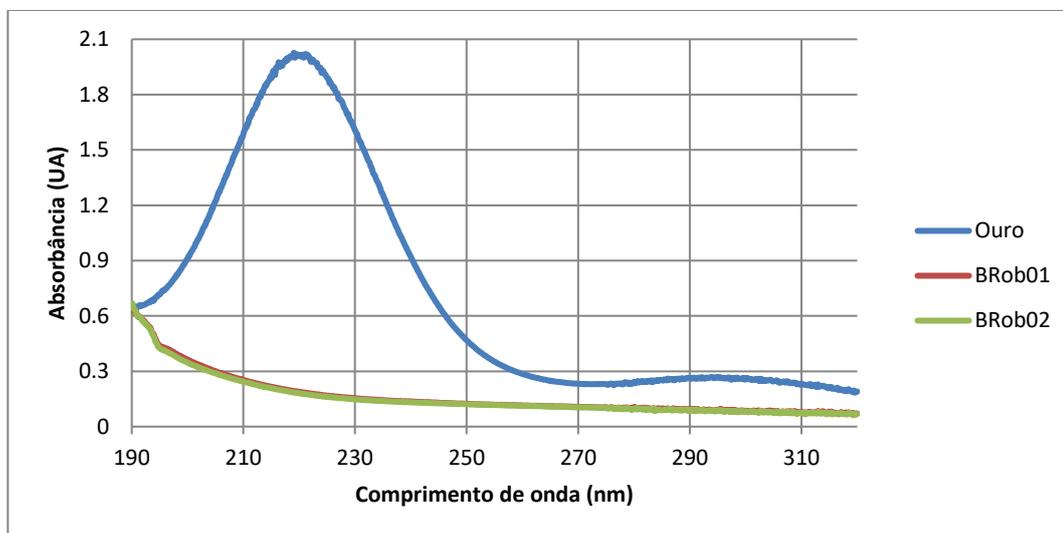


Figura 40 – Espectro de absorvância de luz das amostras BRob01 (tempo de residência de 300 s) e BRob02 (tempo de residência de 90 s) de 190 nm a 320 nm.

A amostra identificada no gráfico da Figura 40 como “Ouro”, que é a solução de cloreto de ouro 2,5 mM utilizada nas sínteses BRob01 e BRob02, conforme esperado, apresentou um pico de absorvância bem definido em comprimento de onda de 218 nm, confirmando a presença do reagente. Já nas amostras BRob01 e BRob02, não foi possível identificar a presença do cloreto de ouro, indicando que a conversão do reagente em AuNPs foi de ao menos 95% (limite de sensibilidade do método) em ambas as condições de síntese.

4.3.2 Variação da temperatura de reação

Mantidas as condições de BRob02 quanto à concentração inicial de reagentes, tempo de residência de 90 s e dispositivo “Reator B”, foi feita a variação na temperatura de síntese de 25°C a 100°C. O aspecto visual das amostras obtidas é apresentado na Figura 41.

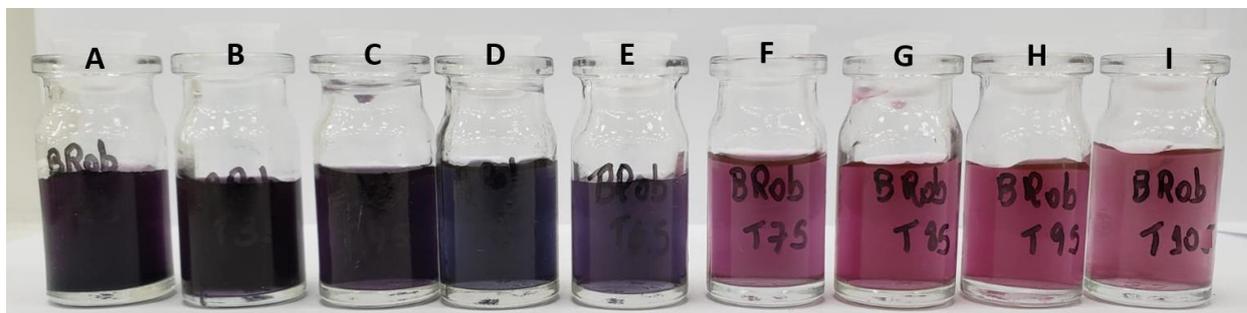


Figura 41 – Aspecto visual das amostras resultantes dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura. A) 25°C; B) 35°C; C) 45°C; D) 55°C; E) 65°C; F) 75°C; G) 85°C; H) 95°C; I) 100°C. Imagem publicada em [1].

Nota-se que, com o aumento gradual da temperatura de reação, as amostras resultantes das sínteses formam um gradiente de cores variando de roxo escuro (na reação a 25°C), passando por uma tonalidade azulada (entre 55°C e 65°C), até rosa (a partir de 75°C). Esse resultado indica, qualitativamente, que houve formação de AuNPs em todas as condições de síntese, porém com tamanho de partícula e/ou morfologia diferentes entre si. A Tabela 10 sintetiza os resultados quantitativos das sínteses com variação de temperatura.

Tabela 10 – Resultados das sínteses dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura. Tabela publicada em [1].

Amostra	T (°C)	Tamanho (nm)	PD	Zeta (mV)
BRob03	25	19,1	0,350	-45,60
BRobT30	30	32,0	0,339	-36,46
BRobT45	45	64,9	0,277	-35,12
BRobT60	60	83,4	0,258	-34,94
BRobT75	75	107,5	0,227	-33,37
BRobT85	85	106,4	0,208	-35,61
BRobT95	95	108,4	0,219	-37,43
BRob02	100	119,8	0,210	-34,16

Todas as amostras apresentaram potencial zeta em módulo acima de 20 mV, indicando boa estabilidade coloidal. As amostras obtidas a temperaturas mais

próximas à ambiente resultaram em nanopartículas de tamanho médio menor (19,1 nm para síntese a 25 °C), indicando que o aumento da temperatura de reação, nessas condições, favorece o crescimento do cristal sobre a nucleação. Porém, segundo resultados de análise de DLS, menores temperaturas também resultaram em partículas mais polidispersas, com PD de 0,350 para a síntese a 25°C. O gráfico da Figura 42 mostra o aumento gradativo no tamanho de partícula e a diminuição gradativa na PD conforme aumento da temperatura de reação.

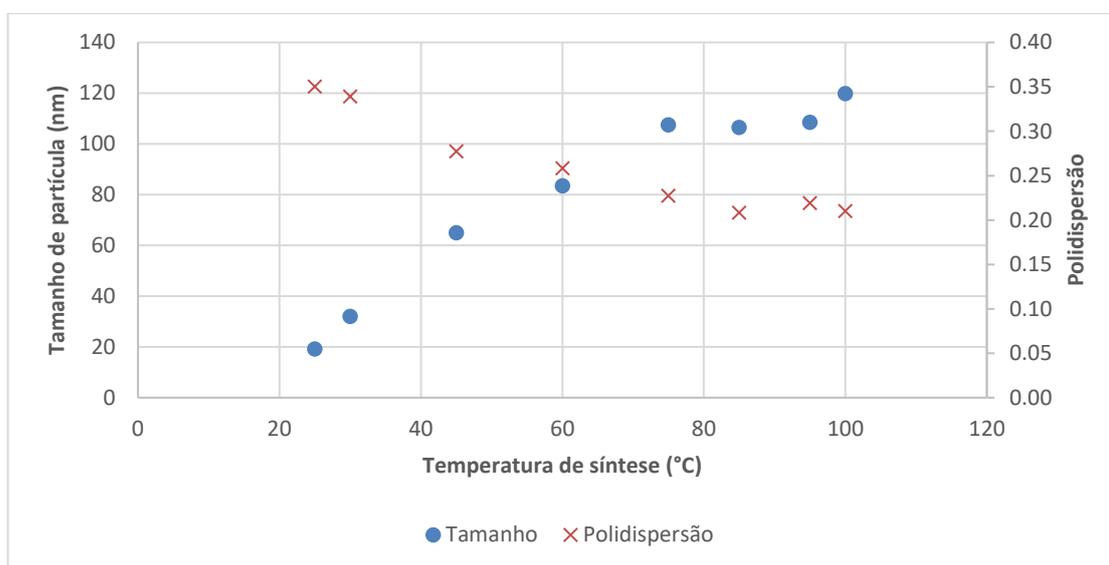


Figura 42–Tamanho de partícula e polidispersão das amostras resultantes dos experimentos com NaCl 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura de síntese. Imagem publicada em [1].

No gráfico apresentado na Figura 42, nota-se que o aumento da temperatura de reação até 75°C resulta em aumento gradual do tamanho de partícula e diminuição gradual da PD. A partir de 75°C, observa-se que o aumento da temperatura até 100 °C não afeta de forma significativa o resultado da síntese. O gráfico da Figura 43 mostra o espectro de absorvância das amostras em estudo.

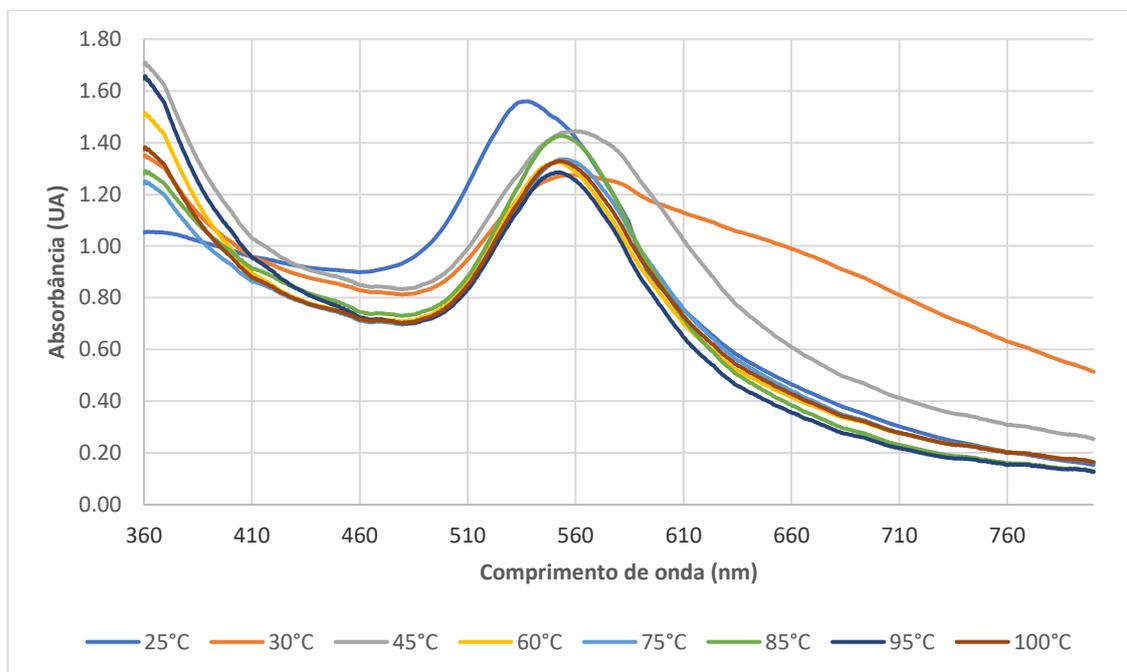


Figura 43 – Espectro de absorvância de luz das amostras resultantes dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura de síntese.

Com o aumento na temperatura de síntese de 25°C a 45°C há o deslocamento do pico de absorvância no sentido da luz vermelha, indicando aumento no tamanho das partículas em suspensão, conforme observado nos dados de DLS da Tabela 10. Nesse mesmo intervalo, nota-se que o aumento da temperatura resulta no aumento da largura do pico, indicando aumento do PD. Esse resultado é contrário ao obtido nas análises de DLS. A partir de 60°C, não há deslocamento significativo no comprimento de onda e na largura do pico de absorvância, indicando que não há alteração significativa no tamanho das partículas e no PD. Esse resultado também está em desacordo com os dados obtidos das análises de DLS. Isso indica que não é apenas o tamanho de partícula que está influenciando no comportamento da curva de absorvância, mas que pode haver também alteração de morfologia das AuNPs presentes na suspensão. Esses resultados mostram também que a PD obtida nas análises de DLS pode não estar representando fielmente a realidade das amostras. As fórmulas matemáticas utilizadas para cálculo de tamanho de partícula e PD a partir do espalhamento de luz incidente sobre as amostras na análise de DLS têm como

premissa a presença de nanopartículas perfeitamente esféricas [108,109]. A presença de partículas de diferentes morfologias pode estar induzindo erro nos cálculos da análise, portanto, é importante a utilização de técnicas analíticas complementares (como a microscopia eletrônica, apresentada a seguir) para validação dos resultados.

Ainda no gráfico da Figura 43, nota-se que as áreas sob as curvas do espectro de absorvância nos comprimentos de onda de 360 nm a 800 nm estão todas na mesma ordem de grandeza, o que mostra que a concentração de AuNPs e, conseqüentemente, a conversão do cloreto de ouro foi semelhante em todas as sínteses realizadas nesse lote de experimentos. O gráfico da Figura 44 mostra, no espectro de absorvância de luz em comprimentos de onda de 190 nm a 320 nm, que de fato a conversão de sal de ouro foi de ao menos 95% em todas as reações, uma vez que não houve formação de pico em torno de 220 nm em nenhuma das amostras.

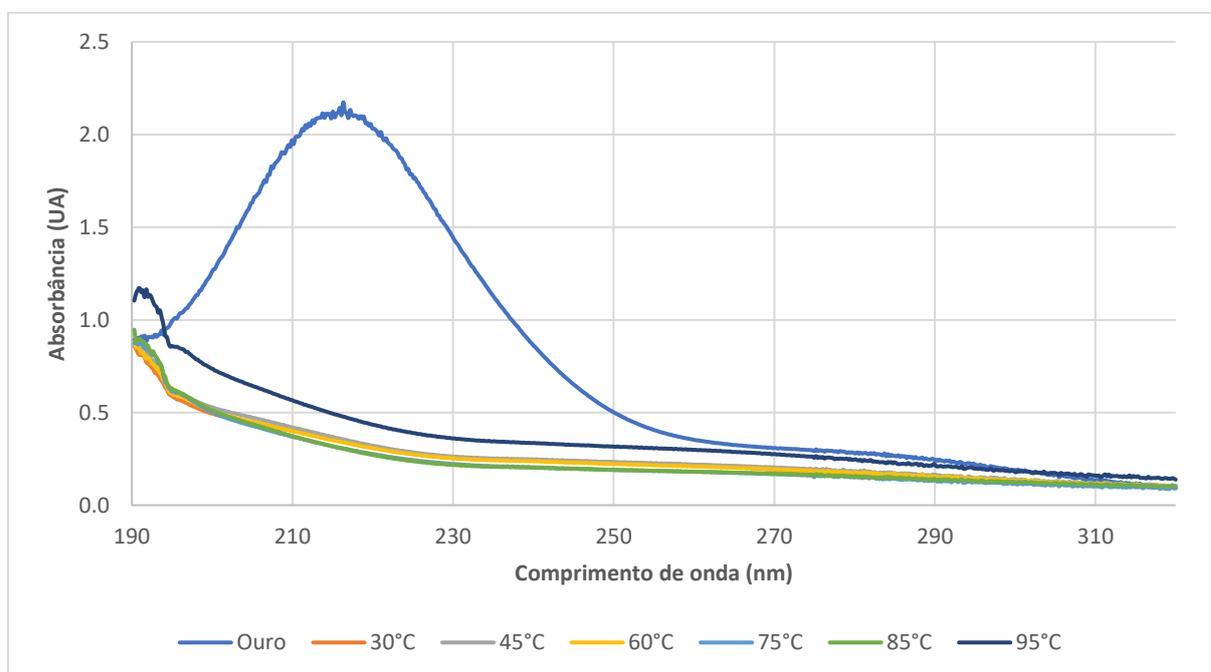


Figura 44 - Espectro de absorvância de luz de 190 nm a 320 nm das amostras resultantes dos experimentos com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” com variação de temperatura de síntese.

A fim de observar a morfologia das AuNPs e validar os resultados obtidos nas

análises de DLS, três amostras foram selecionadas e analisadas por MET. As amostras escolhidas foram das sínteses a 25°C, 60°C e 95°C, de modo a representar toda a faixa de temperatura estudada, e as imagens obtidas por microscopia eletrônica estão apresentadas nas figuras Figura 45, Figura 46 e Figura 47, respectivamente.

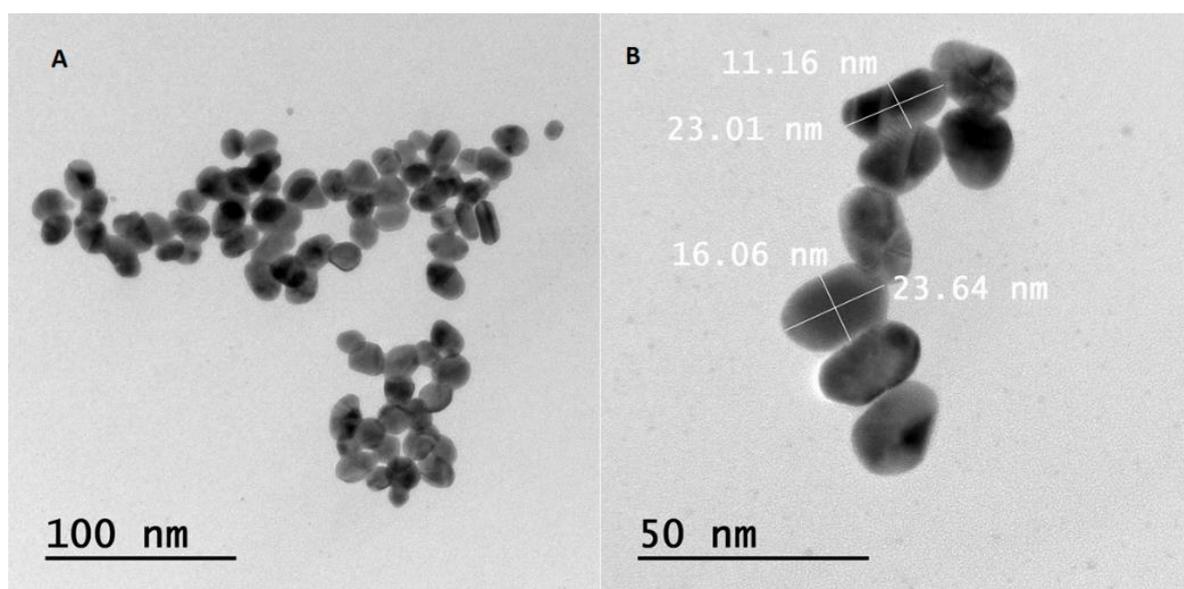


Figura 45 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs obtidas pela síntese a 25°C. A) ampliação com escala de 100 nm; B) ampliação com escala de 50 nm. Imagem publicada em [1].

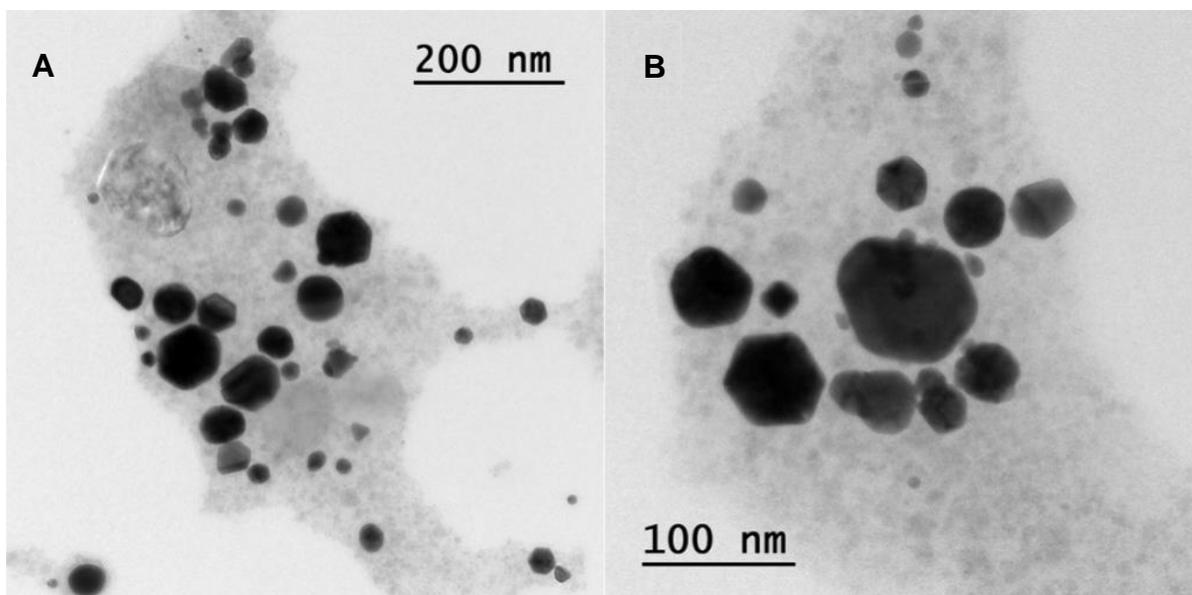


Figura 46 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs obtidas pela síntese a 60°C. A) ampliação com escala de 200 nm; B) ampliação com escala de 100 nm. Imagem publicada em [1].

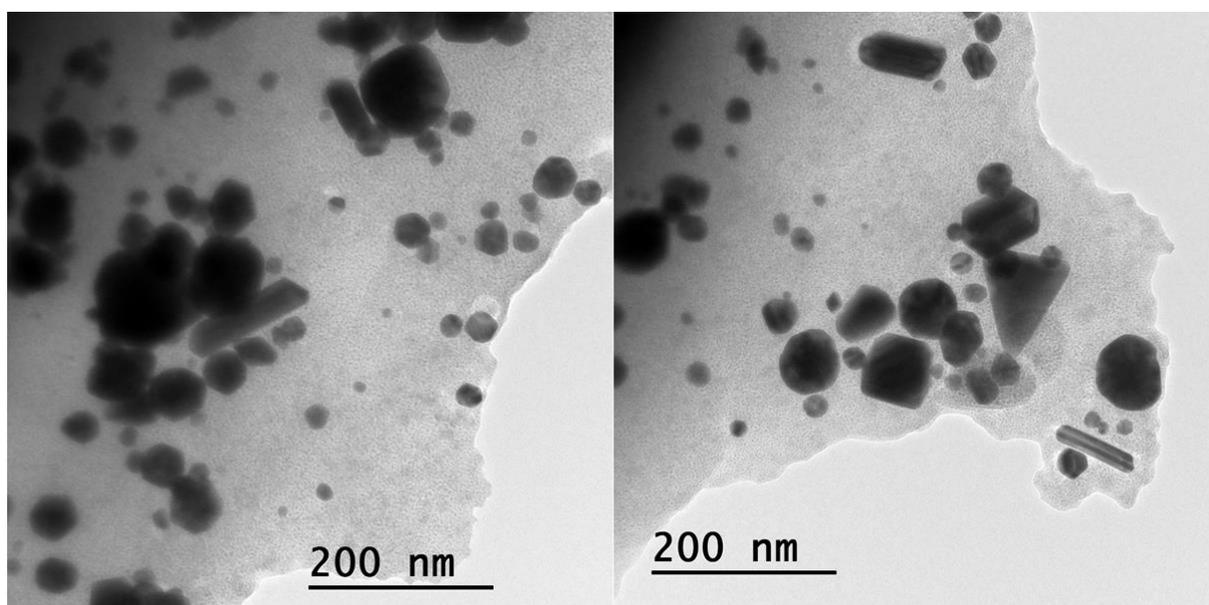


Figura 47 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs obtidas pela síntese a 95°C. Imagem publicada em [1].

Na Figura 45, observa-se que as AuNPs presentes na amostra da síntese a

25 °C apresentam formato que varia entre oval e bastão, com tamanho médio de $15,7 \pm 4,1$ nm e aspecto de raio (R/r) de 1,4. O tamanho médio de partícula para essa mesma amostra obtido pelo DLS foi de 19,1 nm, portanto, considerando o desvio padrão obtido pela análise das imagens de microscopia, foi possível validar os resultados da análise de DLS para tamanho médio de partícula nessa amostra.

Na Figura 46 é possível visualizar que as AuNPs presentes na amostra da síntese a 60°C apresentam morfologia variada, com predominância de formas hexagonais de 59,5%. A variação de tamanhos não segue uma distribuição normal e nota-se a presença de grande quantidade de partículas de diâmetro em torno de 30 nm. A média, porém, é de $70,9 \pm 64,5$ nm, sendo próxima do valor obtido no DLS de 83,4 nm.

Nas imagens da Figura 47, é possível observar uma variedade ainda maior de morfologia e tamanho das partículas. Esses resultados mostram que o aumento da temperatura de reação resulta em partículas de tamanho médio maior, com morfologia menos uniforme e maior polidispersão de tamanhos, e que os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio obtidos no DLS são representativos, mas há limitações da técnica analítica do DLS que apresentaram resultado de PD pouco confiáveis.

Dado que os produtos das sínteses a temperaturas abaixo de 65 °C apresentaram coloração roxa, atípica de AuNPs esféricas obtidas em reatores tradicionais, investigou-se mais a fundo se essas AuNPs eram de fato nanopartículas ou precursores de reações incompletas. Para tanto, o produto da síntese conduzida a 25 °C foi posicionado em banho a 100 °C por 1h para verificar se haveria continuidade na reação, que seria evidenciada através da mudança de coloração. A Figura 48 mostra a suspensão antes e depois desse procedimento. Nota-se que não houve nenhuma alteração visível no produto de síntese após 1h a 100 °C, evidenciando, mais uma vez, que se trata de uma reação completa e estável.

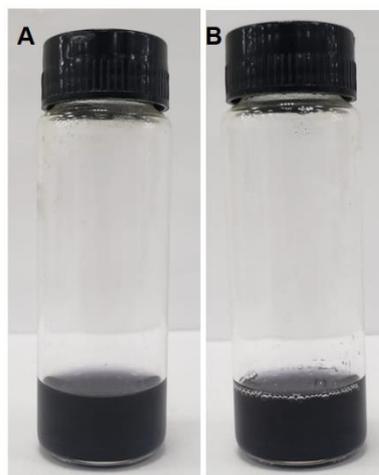


Figura 48 – Aspecto visual de amostra resultante da síntese de AuNPs com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” conduzida a 25 °C. A) Sem nenhum tratamento adicional; B) Após 1h em banho a 100 °C.

Apesar dos dados de DLS, UV-vis e MET não indicarem a presença significativa de aglomerados, para investigar mais a fundo se a coloração das suspensões que apresentaram tonalidade roxa não era devido à presença de material aglomerado, o produto da síntese conduzida a 25 °C foi avaliado na presença de β -mercaptoetanol (substância que possui grupamento tiol), segundo metodologia descrita no Item 3.6.2. A Figura 49 mostra o aspecto visual, o espectro de absorbância UV-visível e os resultados de potencial zeta e tamanho médio de partícula da suspensão antes e depois da adição de β -mercaptoetanol.

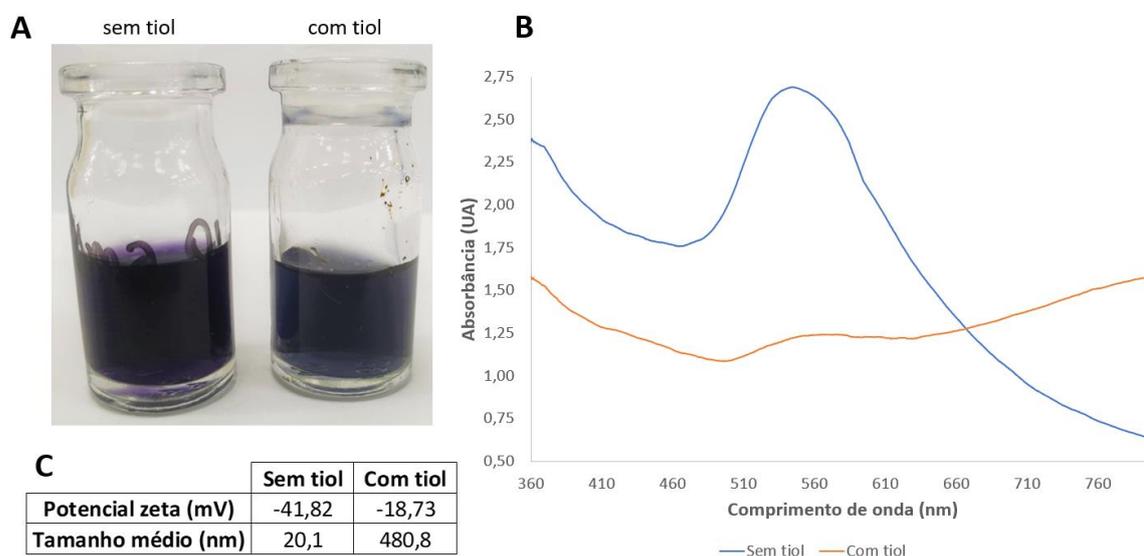


Figura 49 - Amostra resultante da síntese de AuNPs com NaCt 7,5 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” conduzida a 25 °C, antes e depois da adição de β -mercaptopetanol. A) aspecto visual; B) gráfico de absorvância UV-visível; C) resultado das análises de potencial zeta e tamanho de partícula.

Esperava-se que a adição de grupamentos tiol à suspensão causasse aglomeração e conseqüente precipitação das AuNPs, caso elas não estivessem já aglomeradas. O β -mercaptopetanol é capaz de deslocar a camada estabilizante de NaCt, devido à alta afinidade do grupamento tiol pelo ouro, e não possui carga suficiente para estabilizar de forma adequada as nanopartículas, causando a aglomeração e conseqüente precipitação [110]. Além de ter sido observada a presença de material precipitado na amostra tratada com β -mercaptopetanol, a Figura 49 mostra que houve alteração de cor (de roxo para azul-acinzentado), diminuição no pico de absorvância de luz em torno de 540 nm, diminuição significativa do módulo do potencial zeta e aumento significativo no tamanho médio de partícula após o tratamento. Esse resultado indica que houve aglomeração das partículas, reiterando que a suspensão estava anteriormente estabilizada e que, portanto, a coloração roxa não era devido à presença de nanopartículas aglomeradas.

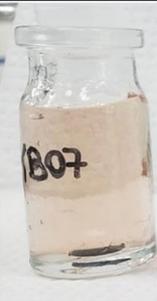
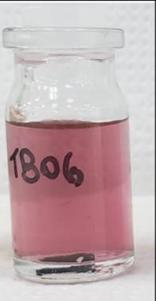
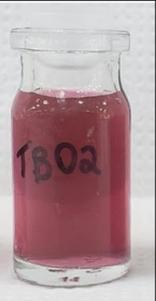
4.4 Síntese de AuNPs com ácido tânico

Para verificar a possibilidade de obtenção de AuNPs de outros tamanhos e

morfologias utilizando o mesmo dispositivo “Reator B”, foi estudada a síntese de AuNPs utilizando ácido tânico como agente redutor. O ácido tânico, componente polifenólico contendo 25 extremidades redutoras, além de ser ambientalmente amigável [111] e apresentar propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas [112], é também um bom agente redutor e de estabilizador para síntese de nanopartículas metálicas [111], sendo capaz de ser utilizado para síntese eficiente de AuNPs à temperatura ambiente [113], mesmo em baixas concentrações [104].

Utilizando como ponto de partida as condições das sínteses com NaCt no microdispositivo “Reator B” que apresentaram melhores resultados (tempo de residência 90s e sal de ouro 2,5 mM), foram feitas sínteses de AuNPs utilizando ácido tânico como agente redutor e estabilizador, à temperatura ambiente, em concentrações variando de 0,01 mM a 0,20 mM, conforme metodologia descrita no Item 3.7. Os resultados de aspecto visual, tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta dos produtos de síntese resultante desses experimentos estão resumidos na Tabela 11, os espectros de absorvância de luz UV-visível estão mostrados na Figura 50.

Tabela 11 - Resultados das sínteses de AuNPs com ácido tânico como agente redutor e estabilizador em diferentes concentrações, utilizando sal de ouro 2,5 mM, temperatura ambiente, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B”.

Ácido tânico (mM)	0,01	0,02	0,05	0,10	0,15	0,20
Aspecto visual						
Tamanho (nm)	99,1	105,8	86,6	86,1	91,4	89,9
Polidispersão	0,193	0,173	0,177	0,200	0,196	0,198
Zeta (mV)	-32,76	-47,68	-33,27	-24,19	-13,52	-10,97

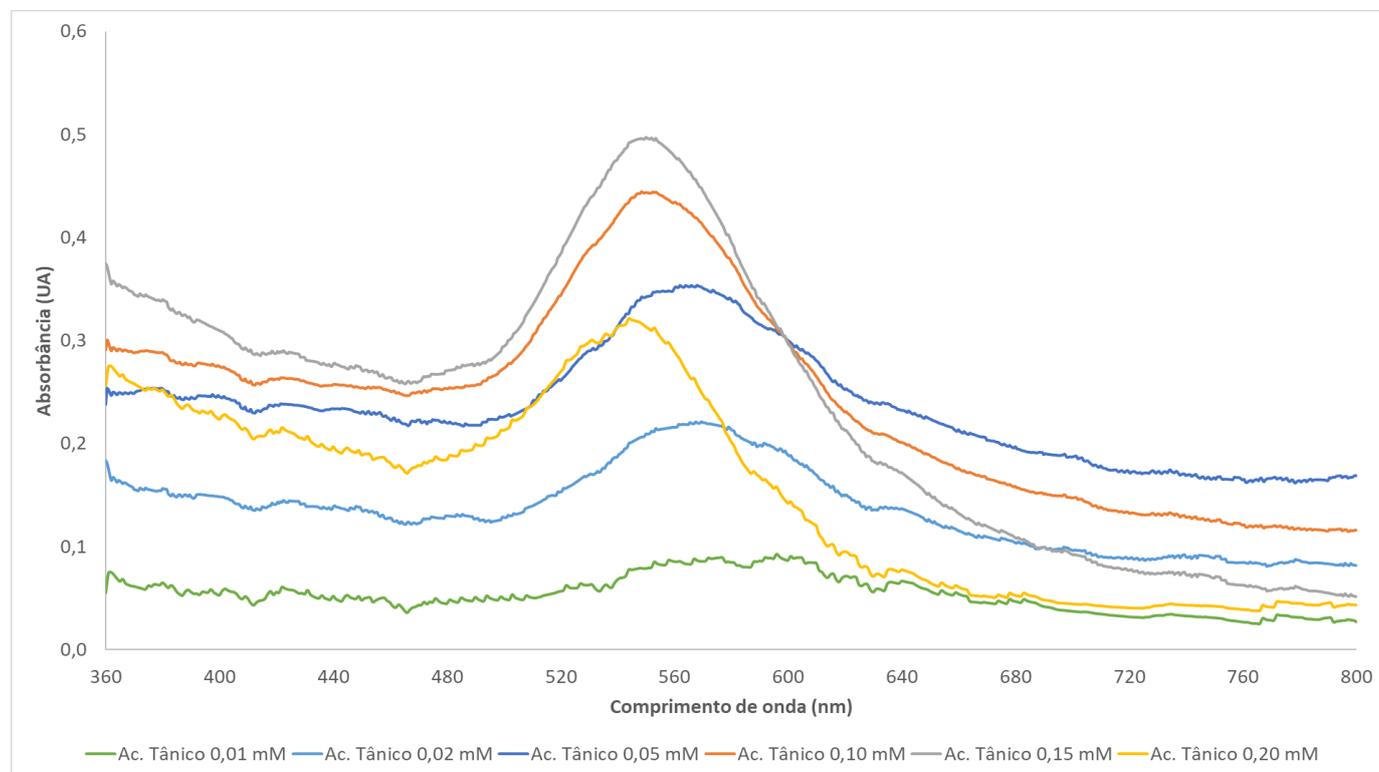


Figura 50 – Espectro de absorvância UV-visível das sínteses de AuNPs conduzidas à temperatura ambiente no dispositivo “Reator B” com tempo de residência de 90s a sal de ouro 2,5 mM, com diferentes concentrações de ácido tânico como agente redutor e estabilizador.

Na Tabela 11, percebe-se que quanto maior a quantidade de ácido tânico, mais intensa é a coloração vermelha da suspensão resultante, indicando maior concentração de AuNPs. As sínteses conduzidas com menores quantidades de ácido tânico (0,01 mM e 0,02 mM) apresentaram maior tamanho de partícula (99,1 nm e 105,8 nm, respectivamente), enquanto as sínteses conduzidas com ácido tânico entre 0,05 mM e 0,20 mM apresentaram tamanho de partícula e polidispersidade semelhantes entre si. O potencial zeta, porém, não foi satisfatório nos produtos das sínteses com 0,15 mM e 0,20 mM ácido tânico (- 13,52 mV e - 10,97 mV, respectivamente), indicando baixa estabilidade coloidal, ratificada pela observação de material precipitado após pouco tempo de repouso. Esse resultado está de acordo com dados da literatura, que mostram que o aumento na quantidade de ácido tânico tende a favorecer a nucleação nos estágios iniciais da síntese de AuNPs, mas rapidamente a taxa de crescimento dos cristais ultrapassa a de nucleação, resultando

em baixa estabilidade coloidal [104]. Além disso, pelo gráfico da Figura 50, nota-se que quanto maior a concentração inicial de ácido tânico, maior é o *blueshift* dos picos de absorbância. Como não há aumento significativo no tamanho das partículas e nem alteração de cor (que poderia indicar variação de morfologia) conforme aumento da concentração de ácido tânico, o *blueshift* pode ser associado à aglomeração das partículas devido à maior instabilidade coloidal. Isso também se confirma ao observar a área sob a curva de absorbância da amostra resultante da síntese com ácido tânico a 0,20 mM, que, apesar da coloração intensa que poderia ser associada à alta concentração de AuNPs, apresenta menor área em relação às curvas de 0,05 mM, 0,10 mM e 0,15 mM devido à precipitação rápida e significativa de material particulado.

Com exceção do produto de reação com ácido tânico 0,20 mM, que apresentou intensa precipitação, quanto maior a concentração de agente redutor, maior a área sob o pico de absorbância na Figura 50, indicando maior concentração de AuNPs e, portanto, maior conversão de sal de ouro. Para confirmar esse indicativo, foi analisada a conversão de sal de ouro através de espectrofotometria UV-visível em comprimentos de onda entre 190 nm e 320 nm (segundo metodologia descrita no Item 3.7), conforme Figura 51.

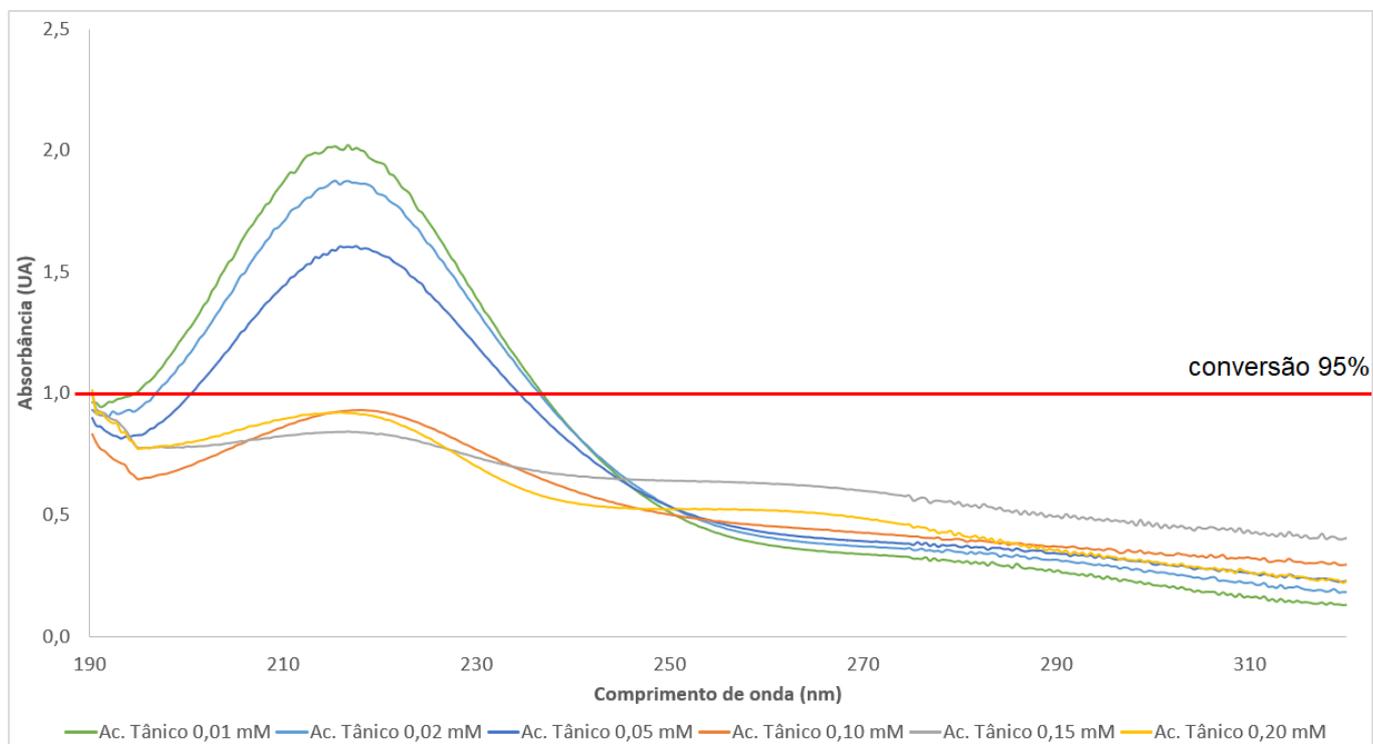


Figura 51 – Espectro de absorvância de luz entre 190 nm a 320 nm das amostras resultantes das sínteses com sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” à temperatura ambiente utilizando diferentes concentrações iniciais de ácido tânico como agente redutor e estabilizador.

Através do gráfico da Figura 51, observa-se que para sínteses com concentração inicial de ácido tânico de até 0,10 mM, quanto maior a concentração inicial de ácido tânico, maior a conversão de sal de ouro. Para concentrações iniciais a partir de 0,10 mM, porém, não há diferença significativa na conversão de sal de ouro, sendo que nas três concentrações mais altas a conversão ultrapassa 95%.

4.4.1 Sínteses com ácido tânico e citrato de sódio

Para alcançar uma melhor estabilidade das nanopartículas resultantes das sínteses com ácido tânico, foram estudadas reações com ácido tânico como agente redutor na presença de NaCt. Foram mantidas as principais condições de reação (tempo de residência de 90s, sal de ouro 2,5 mM, temperatura ambiente, dispositivo “Reator B”), fixando a concentração inicial de ácido tânico em 0,10 mM e variando a concentração de NaCt entre 1,25 mM e 7,5 mM, conforme metodologia descrita no

Item 3.7.1. A concentração de ácido tânico de 0,10 mM foi escolhida para esses experimentos por ter apresentado boa taxa de conversão de sal de ouro e baixa precipitação de material particulado. Os resultados de aspecto visual, tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta dos produtos de síntese resultante desses experimentos estão resumidos na Tabela 12, os espectros de absorbância de luz UV-visível estão mostrados na Figura 52.

Tabela 12 - Resultados das sínteses de AuNPs com ácido tânico 0,10 mM como agente redutor e diferentes concentrações de NaCt como agente estabilizador, utilizando sal de ouro 2,5 mM, temperatura ambiente, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B”. Dados publicados em [1].

NaCt (mM)	1,25	2,5	5,0	7,5
Aspecto visual				
Tamanho (nm)	85,7	79,5	47,2	21,6
Polidispersão	0,207	0,225	0,323	0,344
Zeta (mV)	-35,07	-42,22	-44,84	-46,77

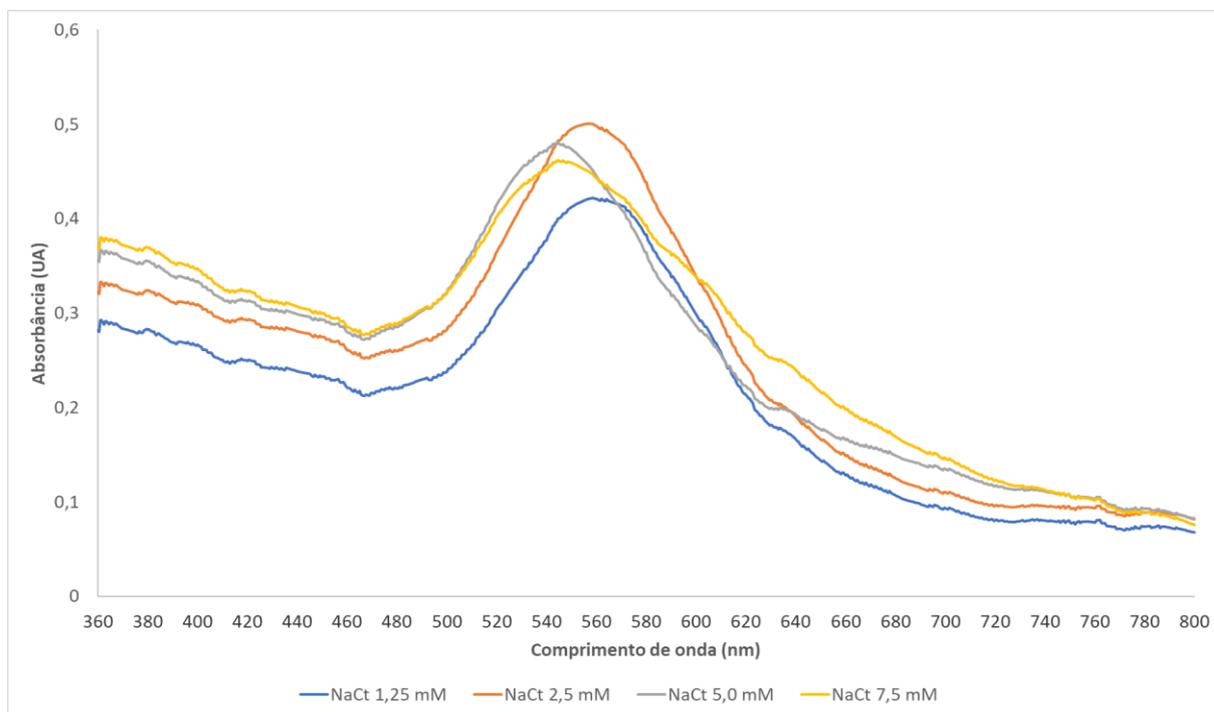


Figura 52 – Espectro de absorvância de luz dos produtos das sínteses de AuNPs com ácido tânico 0,10 mM como agente redutor e diferentes concentrações de NaCt como agente estabilizador, utilizando sal de ouro 2,5 mM, temperatura ambiente, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B”.

A síntese conduzida com ácido tânico 0,10 mM e NaCt 7,5 mM, apresentou coloração, tamanho de partícula e polidispersão muito próximos da síntese com NaCt 7,5 mM sem ácido tânico nas mesmas condições (sal de ouro 2,5 mM, temperatura ambiente, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B”, conforme resultado apresentado no Item 4.3.2), indicando que o NaCt tende a ser o agente redutor preferencial em relação ao ácido tânico. Pelo aspecto visual das amostras, nota-se que quanto maior a quantidade de NaCt, mais a tonalidade da suspensão varia do vermelho ao roxo. Essa mudança na coloração condiz com o *blueshift* do pico de absorvância em torno de 540 nm, mais acentuado conforme maior a quantidade inicial de NaCt. No gráfico da Figura 52, observa-se também um alargamento do pico de absorvância conforme aumento da quantidade de NaCt, indicando maior polidispersão de tamanhos das partículas, estando de acordo com os resultados de polidispersão obtidos por DLS, mostrados na Tabela 12.

Com o aumento da concentração inicial de NaCt, nota-se também uma diminuição no tamanho médio das partículas e aumento no módulo do potencial zeta. Isso indica que maiores quantidade de NaCt favorecem a nucleação e melhoram significativamente a estabilidade coloidal, provavelmente devido à presença de uma camada maior de moléculas de citrato (carregadas negativamente) protegendo as partículas da agregação como consequência da repulsão eletrostática. De fato, não foi observado material precipitado em nenhum dos produtos de reação nos experimentos com ácido tânico na presença de NaCt. Esse resultado indica que o *blueshift* nos picos de absorbância dos produtos de reação com maiores concentrações iniciais de NaCt não pode ser explicado pela aglomeração das partículas, podendo, então, indicar que essa alteração pode ser dada por uma diferença de morfologia. A Figura 53 mostra as imagens de MET dos produtos de reação desse bloco de experimentos, evidenciando a variação na morfologia das partículas.

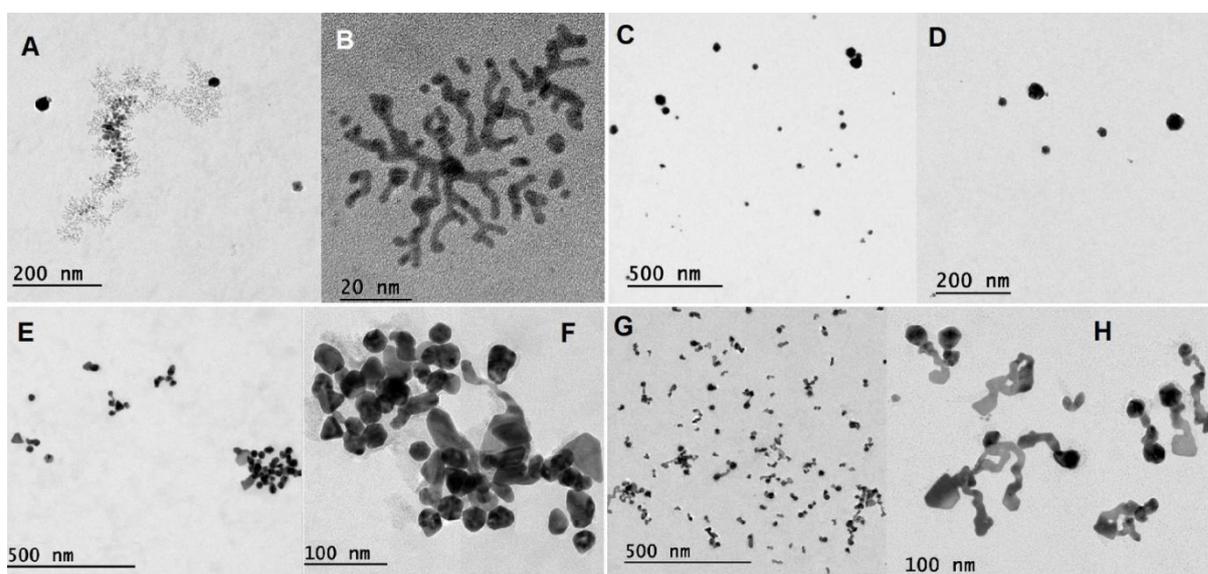


Figura 53 – Imagens de TEM dos produtos das sínteses realizadas utilizando ácido tânico 0,10 mM com diferentes concentrações de NaCt, variando em: A e B) 1,3 mM; C e D) 2,5 mM; E e F) 5,0 mM; G e H) 7,5 mM. Imagem publicada em [1].

Nas imagens de microscopia da Figura 53, observa-se que a síntese realizada

com NaCt 1,3 mM resultou predominantemente em AuNPs dendríticas com diferentes graus de ramificação (Figura 53A e B). Variações dessa morfologia específica já foram vistas na literatura e têm potencial para serem utilizadas em aplicações eletrônicas e de sensoriamento [53,94,114]. As reações com NaCt 2,5 mM resultaram principalmente em esferas com diâmetro médio de 79,5 nm (Figura 53 C e D). As sínteses realizadas com NaCt 5,0 mM resultaram em formas irregulares sem morfologia predominante (Figura 53 E e F). Por fim, as sínteses realizadas com NaCt 7,5 mM produziram partículas em forma de girino (Figura 53 G e H). AuNPs em forma de girino foram relatadas anteriormente na literatura [115–118] e há evidências de que essa estrutura particular possa ser resultado do crescimento de cristais partindo de núcleos de partículas com outras morfologias [115]. Estudos de aplicação AuNPs de morfologias complexas, como girinos e dendritos, são escassos na literatura, porém, a síntese de novas nanoestruturas metálicas pouco conhecidas tem a sua importância, pois essas estruturas podem exibir uma ampla gama de propriedades elétricas e óticas únicas e que podem encontrar aplicações em áreas diversas, como nanodispositivos, biomateriais e eletroquímica [117,118].

Todas as sínteses dessa batelada de experimentos com ácido tânico na presença de diferentes concentrações de NaCt apresentaram conversão de sal de ouro similar entre si e superior a 95%, conforme gráfico da Figura 54.

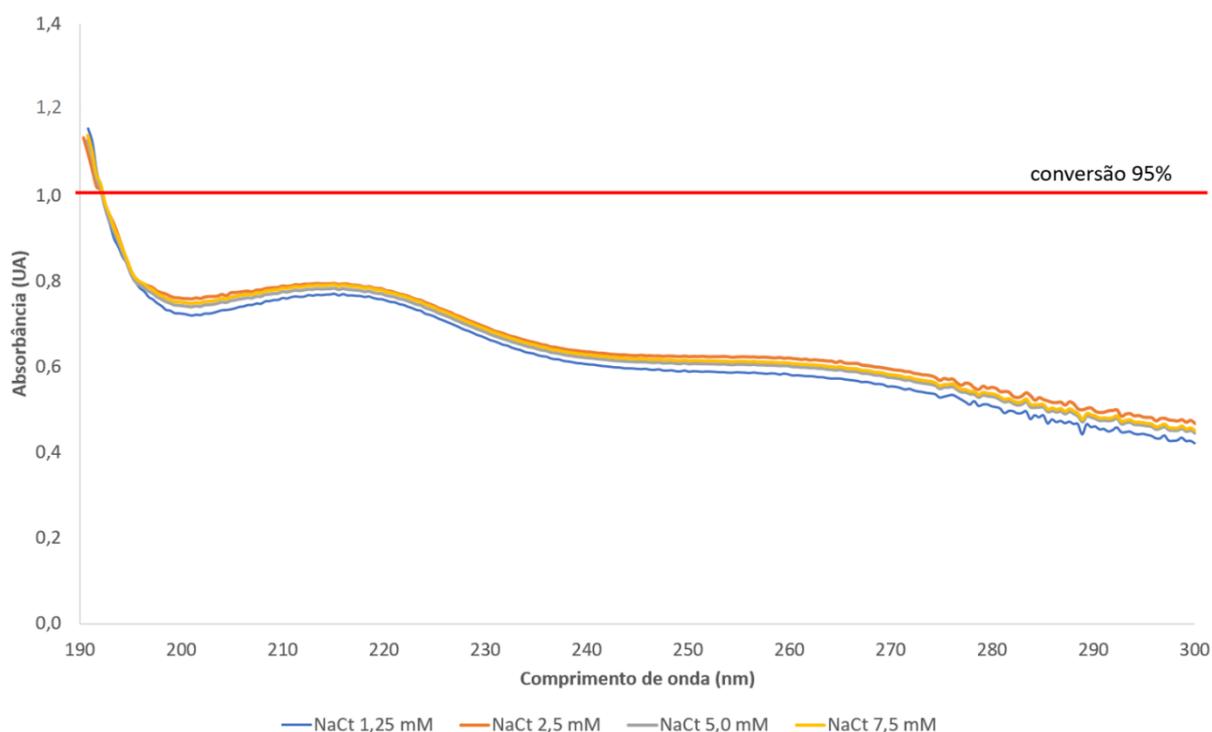


Figura 54 – Espectro de absorvância de luz entre 190 nm a 320 nm das amostras resultantes das sínteses com ácido tânico 0,10 mM, sal de ouro 2,5 mM, tempo de residência de 90 s no dispositivo “Reator B” à temperatura ambiente utilizando diferentes concentrações iniciais de NaCt como agente estabilizador.

4.5 Funcionalização da superfície das AuNPs com proteínas

4.5.1 Funcionalização com r-GFP

A fim de avaliar a interação das partículas sintetizadas com biomoléculas de interesse farmacêutico, primeiramente foi estudada a adsorção da proteína recombinante modelo GFP (rGFP) na superfície de diferentes AuNPs, segundo metodologia descrita no Item 3.9.1. Nesse estudo, foram selecionados três grupos de AuNPs com diferentes características de tamanho e morfologia. Dois dos grupos selecionados foram produzidos pelo método de Turckevich adaptado ao microdispositivo, utilizando NaCt como agente redutor e estabilizador. O primeiro grupo de AuNPs apresenta tamanho médio de 19,1 nm e formato de bastão, produzido a 25 °C (nomeado “NaCt25”), e o segundo apresenta tamanho médio de 108,4 nm e alta polidispersão de tamanhos e morfologias, produzido a 95 °C

(nomeado “NaCt95”), conforme experimentos descritos no Item 4.3.2, cujas principais caracterizações encontram-se resumidas na Tabela 10. O terceiro grupo foi produzido utilizando ácido tânico 0,10 mM na presença de NaCt 1,25 mM, apresentando tamanho médio de 79,5 nm e morfologia predominantemente esférica (chamado de “TA+NaCt”), conforme experimentos descritos no Item 4.4.1. Esses grupos foram selecionados de modo a representar uma faixa significativa de tamanhos e morfologias distintas. O gráfico da Figura 55 mostra as curvas de adsorção de rGFP para os diferentes grupos de AuNPs.

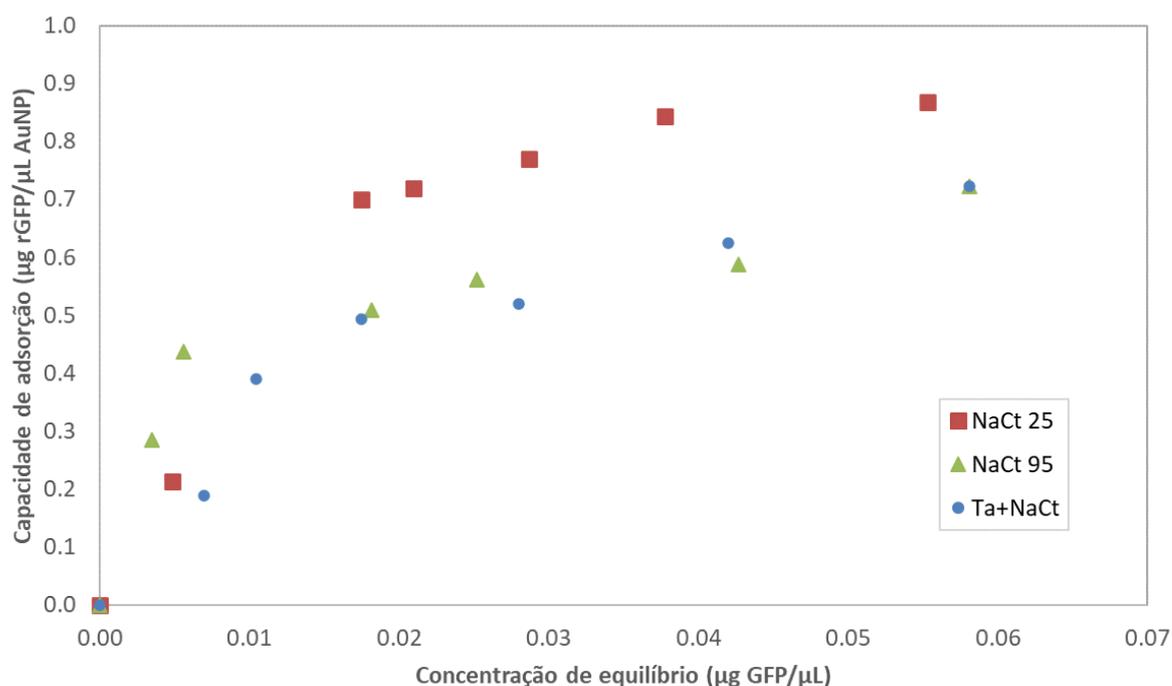


Figura 55 – Curvas de adsorção de rGFP na superfície de AuNPs com características de tamanho e morfologia distintas. NaCt25) bastões com tamanho médio de 19,1 nm; NaCt95) formas variadas com tamanho médio de 108,4 nm; TA+NaCt) esferas com tamanho médio de 79,5 nm.

Pelo gráfico da Figura 55, observa-se que o grupo NaCt25 apresenta maior capacidade de adsorção para concentrações de equilíbrio a partir de 0,02 µg GFP/µL. Essa maior capacidade de adsorção pode ser associada ao menor tamanho de partícula entre os três grupos estudados, tendo, assim, possivelmente, maior área de

superfície, tornando esse grupo capaz de adsorver maior quantidade de moléculas de rGFP por área. A hipótese da maior área de superfície, porém, é uma aproximação, uma vez que ela é dependente não apenas do tamanho das partículas, mas também da sua morfologia, que difere no caso dos três grupos de partículas estudados nesse ensaio. Os grupos NaCt95 e TA+NaCt, porém, não apresentam diferença significativa na capacidade de adsorção, mesmo apresentando média de tamanhos diferentes. Essa característica pode ser devido ao fato de que as propriedades químicas de superfície (por exemplo, o tamanho da camada de átomos com carga negativa ao redor das AuNPs e a hidrofiliabilidade das partículas [119]) das partículas estabilizadas por excesso de NaCt e das estabilizadas simultaneamente por NaCt e ácido tânico podem ser diferentes entre si, influenciando na interação AuNP-proteína. Além disso, outros fatores associados à morfologia das AuNPs também podem influenciar na capacidade de adsorção, como por exemplo a curvatura da partícula, fazendo com que partículas com menor curvatura de superfície tendam a apresentar maior capacidade de adsorção de proteínas [119].

4.5.2 Funcionalização com RBD

A fim de avaliar uma possível aplicação das AuNPs produzidas como plataforma vacinal, foi testada a funcionalização da superfície de quatro grupos de AuNPs com a proteína *Receptor Binding Domain* (RBD), antígeno do vírus SARS-CoV-2, para formulação de vacinas contra Covid-19. Nessa estratégia de formulação, as AuNPs atuam como vetores para carregamento das proteínas RBD, podendo apresentar múltiplas cópias de antígeno carregadas por uma mesma partícula, evocando o efeito multivalente e potencializando a resposta imunológica [63]. Foram escolhidos grupos de AuNPs produzidos com NaCt como agente redutor que apresentam diferentes médias de tamanhos: 30,9 nm (M25), 50,5 nm (M45), 82,3 nm (M60) e 129,2 nm (M95). A Figura 56 mostra imagens de MET caracterizando a morfologia de cada um desses grupos de partículas. Conforme discutido nos resultados apresentados no Item 4.3.2, os grupos escolhidos representam não apenas tamanhos distintos, mas também morfologia e polidispersão morfológica e de tamanhos variada. A Tabela 13 mostra a caracterização do tamanho médio de

partícula e dispersão de tamanhos de cada grupo de AuNPs antes e após a funcionalização por RBD, analisador por DLS (em número). Esses mesmos grupos foram escolhidos para avaliação *in vivo*.

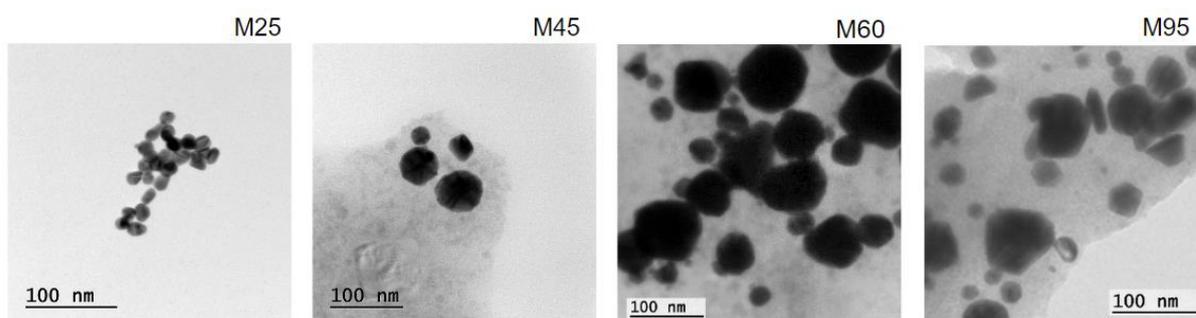


Figura 56 – Imagens de MET das amostras M25, M45, M60 e M95 utilizadas nos ensaios funcionalização das AuNPs com RBD. Imagem publicada em [2].

Tabela 13 – Tamanho de partícula e dispersão de tamanhos das amostras M25, M45, M60 e M95 antes e depois da interação com a proteína RBD (DLS é apresentado em número). Tabela publicada em [2].

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico			
	Média (nm)	D 10% (nm)	D 50% (nm)	D 90% (nm)
M25	30,9 ± 0,5	1,3 ± 0,2	28,1 ± 1,9	61,4 ± 2,1
M45	50,5 ± 1,8	17,1 ± 2,9	49,1 ± 1,5	68,1 ± 7,1
M60	82,3 ± 2,7	32,9 ± 1,4	73,7 ± 0,7	90,3 ± 8,5
M95	129,2 ± 2,2	69,9 ± 2,9	126,1 ± 0,9	196,2 ± 10,9
M25+RBD	42,5 ± 3,5	20,2 ± 4,8	40,0 ± 6,0	62,0 ± 6,9
M45+RBD	73,1 ± 5,7	55,1 ± 9,5	77,5 ± 8,9	94,3 ± 14,2
M60+RBD	110,3 ± 11,5	70,7 ± 6,9	87,6 ± 12,2	145,9 ± 12,3
M95+RBD	132,1 ± 17,8	115,2 ± 17,0	126,5 ± 11,7	158,6 ± 13,5

Os resultados mostrados na Tabela 13 mostram que há um aumento de tamanho das AuNPs antes e depois da funcionalização com RBD, evidenciando a presença da corona proteica [120]. Supõe-se que a interação entre as nanopartículas de ouro e a proteína RBD ocorre via grupo tiol, uma vez que RBD possui aminoácidos cisteína altamente reativos em sua composição [121] e que AuNPs possuem alta afinidade por grupos tiol, tendendo a formar ligações covalentes [63]. Essa hipótese é

evidenciada pelo perfil das curvas de isoterma de adsorção apresentadas na Figura 57.

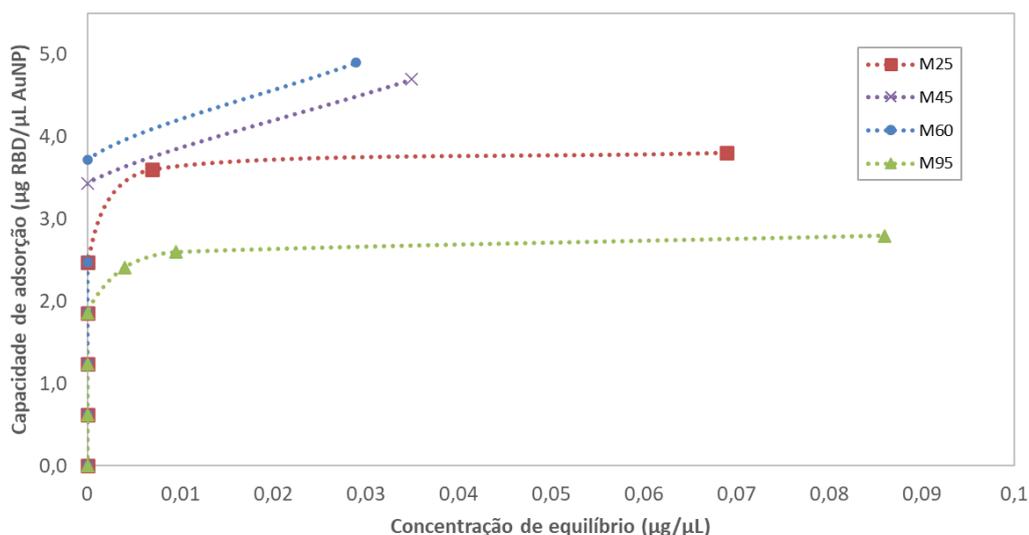


Figura 57 – Curvas de adsorção de RBD na superfície de AuNPs dos grupos M25, M45, M60 e M95. Imagem publicada em [2].

As curvas de adsorção apresentadas na Figura 57 mostram que, embora as diferentes AuNPs tenham uma capacidade máxima de adsorção distinta devido à variação na área de superfície e curvatura (já que diferem em tamanho e morfologia), os quatro grupos de AuNPs estudados foram capazes de adsorver fortemente todas as proteínas RBD até sua saturação limite. Isso também é evidenciado pela ausência de proteína livre em solução em concentrações abaixo do limite de saturação encontrado para todas as nanopartículas. Esta é uma informação crucial, pois, conhecendo o limite de saturação (capacidade máxima de ligação) das nanopartículas, é possível garantir que os grupos de AuNPs escolhidos podem carrear a quantidade desejada de RBD durante a avaliação *in vivo* do desempenho da vacina, que é formulada com 0,52 µg RBD/µL AuNP.

4.6. Estudos *in vitro* e *in vivo*

O objetivo dos estudos *in vivo* foi determinar se a inclusão de diferentes grupos

de nanopartículas (M25, M45, M60 e M95) em uma formulação de vacina contra SARS-CoV-2 poderia aumentar a imunogenicidade do antígeno, a fim de induzir altos títulos de anticorpos com forte capacidade neutralizante. Para isso, primeiramente a formulação contendo o complexo M95+RBD foi comparada em relação à eficiência com formulações contendo apenas RBD. O grupo M95 foi selecionado devido à alta polidispersão de tamanhos e morfologias das AuNPs presentes em uma mesma amostra, contendo, assim, uma distribuição ampla de tamanhos e forma que engloba os demais grupos de AuNPs estudados. Grupos de 5 camundongos fêmeas com idade de 6-8 semanas foram imunizados por via subcutânea com 3 doses das nossas formulações de vacina, administradas com intervalos de 14 dias. Observou-se que a presença de AuNPs permitiu um ganho substancial tanto na quantidade quanto na qualidade dos anticorpos induzidos, conforme mostrado na Figura 58, uma vez que, após 3 doses de imunização, os títulos de IgG observados para M95+RBD foram mais altos do que os obtidos com as formulações apenas com RBD (Figura 1 B). A análise das subclasses de IgG revelou que a formulação M95+RBD induziu um perfil misto de subclasses, com títulos de 10^4 para IgG₁ e 10^2 para IgG₂, mas nenhuma diferença significativa na afinidade anticorpo-antígeno foi observada quando os soros de ambos os grupos tiveram seus títulos normalizados e foram avaliados por ELISA na presença de tiocianato de amônio (Figura 58 C-D). Mostrou-se, assim, que apenas os soros dos animais imunizados com M95+RBD foram capazes de neutralizar eficientemente partículas virais *in vitro* até uma diluição de 1/160, ao contrário do observado para os soros dos animais imunizados com RBD, que não conseguiram neutralizar adequadamente o SARS-CoV-2 *in vitro* (Figura 58 E).

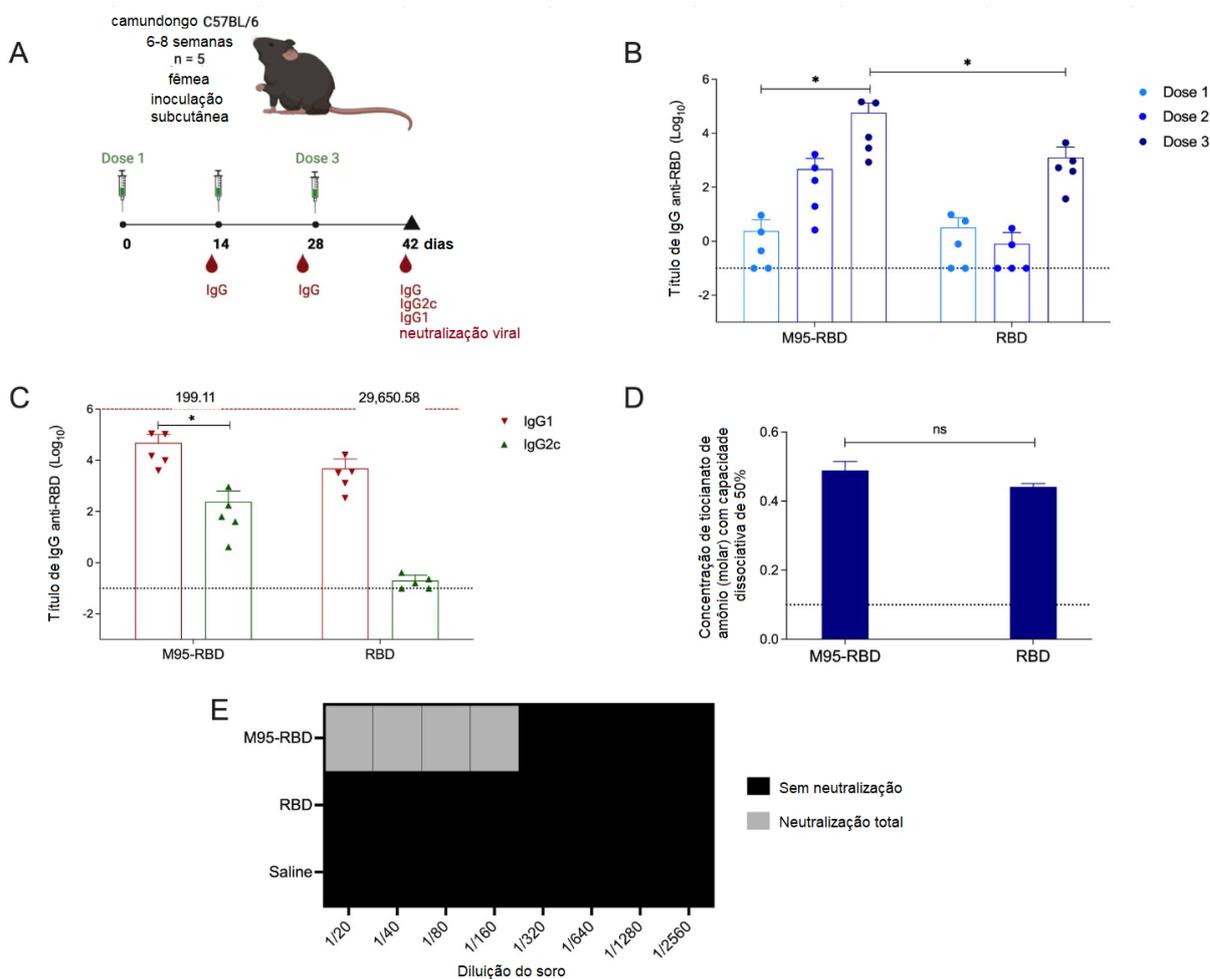


Figura 58 – Imunização piloto para avaliar o potencial da formulação contendo M95+RBD. Camundongos C57/Bl-6 com idade de 6 a 8 semanas ($n=5/\text{grupo}$) receberam, por via subcutânea, $10 \mu\text{g}$ de RBD conjugado ou não a AuNPs. Os títulos de anticorpos IgG específicos para o RBD foram avaliados por ensaio de ELISA com soros obtidos 13 dias após cada administração da dose. A) desenho do esquema de vacinação realizado; B) títulos de IgG anti-RBD totais gerados 14 dias após cada dose da vacina, obtidos por ELISA; C) títulos das subclasses IgG_1 e IgG_{2c} nos soros obtidos após a administração da terceira dose, medidos por ELISA; D) afinidade dos anticorpos anti-RBD pelo antígeno-alvo por incubação com diferentes quantidades de tiosulfato de amônio. Nos ensaios de ELISA, os valores representam a média \pm erro padrão dos valores de absorbância obtidos em um ensaio com soros individuais de camundongos, em duplicata, para cada formulação. Os valores observados no grupo controle de solução salina (média + 2x desvio padrão) foram subtraídos dos demais grupos experimentais. As diferenças estatísticas são indicadas no gráfico. $*p < 0,01$; por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni; E) avaliação do potencial neutralizante de anticorpos específicos anti-RBD. A neutralização viral foi realizada em duplicata para cada diluição. O ensaio considerou apenas 100% de neutralização viral, sendo destacada na figura a última diluição em que nenhuma morte celular foi observada.

Após avaliar que a presença de AuNPs teve uma contribuição positiva na imunogenicidade da formulação da vacina, buscou-se determinar se as AuNPs de diferentes tamanhos e morfologias também poderiam impactar a eficiência da vacina. Para isso, foi realizada uma imunização com camundongos fêmeas de 6-8 semanas de idade, administrando 3 doses de vacinas formuladas com os complexos M25+RBD, M45+RBD, M60+RBD e M95+RBD (repetição) por via subcutânea com intervalos de 14 dias, seguindo o regime de vacinação descrito na Figura 59 A. Os animais foram imunizados em cada dose com 10 µg de RBD, sozinha ou combinada com 10 µg dos diferentes grupos de AuNPs. Um grupo adicional recebeu solução salina como controle. Semelhante ao que foi observado no experimento anterior (Figura 58 B), foi observado que todas as formulações de vacina contendo AuNPs induziram uma resposta mais forte de IgG em relação a RBD sozinha. Isso ocorreu de forma dose-dependente, com o pico de titulação de IgG após a terceira dose (Figura 59 B). Vale ressaltar que apenas os camundongos imunizados com M45+RBD e M60+RBD apresentaram títulos de IgG significativamente mais altos do que os induzidos apenas pela RBD.

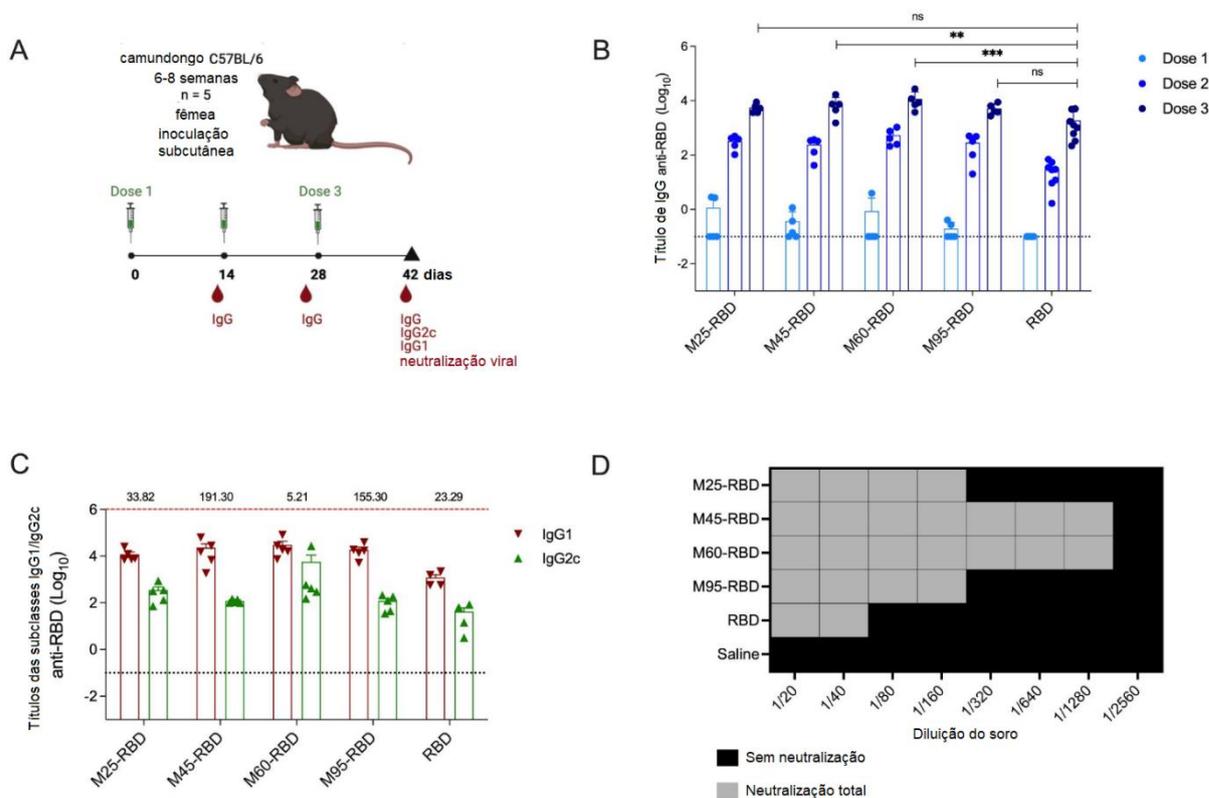


Figura 59 – Imunização para avaliar o potencial vacinal de diferentes formulações de AuNP+RBD. Camundongos C57/BI-6 com idade de 6 a 8 semanas (n=5/grupo) foram imunizados por via subcutânea com 10 µg de RBD isolada ou conjugada a AuNPs dos diferentes grupos. Os títulos de anticorpos IgG específicos para o RBD foram avaliados por ensaio de ELISA com soros obtidos 13 dias após cada administração da dose. A) regime de vacinação utilizado na imunização; B) ensaio de ELISA para determinar os títulos de IgG anti-RBD totais gerados 14 dias após cada dose da vacina; C) títulos das subclasses IgG₁ e IgG_{2c} nos soros obtidos após a administração da terceira dose, medidos por ELISA. Para todos os ensaios de ELISA, os valores representam a média ± erro padrão dos valores de absorbância obtidos em um ensaio com soros individuais de camundongos, em duplicata, para cada formulação. Os valores observados no grupo controle de solução salina (média + 2x desvio padrão) foram subtraídos dos demais grupos experimentais. As diferenças estatísticas são indicadas no gráfico. **p < 0,01; *** p < 0,001 por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni; D) avaliação do potencial neutralizante de anticorpos específicos anti-RBD. A neutralização viral foi realizada em duplicata para cada diluição. O ensaio considerou apenas 100% de neutralização viral, sendo destacada na figura a última diluição em que nenhuma morte celular foi observada. Imagem publicada em [2].

Por fim, foi avaliada a capacidade dos anticorpos séricos anti-RBD produzidos em camundongos imunizados com as formulações vacinais testadas de neutralizar partículas do SARS-CoV-2 em condições *in vitro*. Para esse propósito, soros

inativados de cada grupo de imunização foram diluídos em série em duplicatas e expostos a partículas virais antes de serem transferidos para células Vero cultivadas. Todas as formulações de AuNP foram capazes de induzir anticorpos com maior capacidade de neutralização em comparação com RBD isolada (Figura 59 D). Além disso, não apenas as formulações M45+RBD e M60+RBD induziram títulos mais altos de IgG do que em camundongos imunizados com RBD purificado, mas também induziram anticorpos altamente neutralizantes capazes de bloquear a infecção pelo SARS-CoV-2 em diluições de até 1/1.280. A explicação para esse resultado é provavelmente multifatorial, abrangendo desde as características das coroas proteicas, que variam de acordo com o tamanho e a morfologia das AuNPs, até o sistema imunológico animal, que é estimulado de forma diferencial de acordo com as características físicas das partículas. O tamanho é um fator importante, uma vez que nanopartículas de tamanho semelhante ao viral (tipicamente na faixa de 50-100 nm) podem entrar nos linfonodos com facilidade, onde as respostas imunes adaptativas são iniciadas. Tipicamente, nanopartículas dentro dessa faixa de tamanho também podem ser processadas de maneira mais eficiente por células dendríticas [122]. O revestimento proteico (corona) de nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos e formas também pode apresentar espessura e densidade diferentes. A corona proteica é o que é "visto" pelas células e pode influenciar fortemente a resposta imune induzida [120]. Nanopartículas de ouro muito grandes (>80 nm) podem apresentar características superficiais semelhantes a superfícies planas, onde múltiplas camadas de proteínas são formadas, incluindo uma variedade de mudanças conformacionais que podem ser ideais no contexto da apresentação antigênica. As características da corona proteica podem ajudar a explicar os resultados encontrados aqui, uma vez que as nanopartículas M45 e M60 mostraram valores de tamanho e polidispersidade que parecem ser mais adequados para conferir maior imunogenicidade às formulações vacinais. Enquanto as nanopartículas M25 parecem ser muito pequenas e homogêneas para uma apresentação antigênica eficiente, a M95 pode ser muito grande e polidispersa para induzir efeitos semelhantes.

Coletivamente, esses resultados destacam a relevância das nanopartículas de ouro como plataformas de entrega de antígenos para o desenvolvimento de

formulações vacinais, uma vez que as AuNPs apresentaram desempenho consistentemente superior em comparação com RBD isolada na indução de anticorpos de alta qualidade e alto título que bloqueiam efetivamente a infecção viral *in vitro*. Esse efeito comum a todas as formulações de AuNP provavelmente pode ser atribuído não apenas à geometria das nanopartículas, mas também à multimerização do antígeno, uma vez que a apresentação lado a lado pode ser reconhecida como um padrão molecular associado a patógenos (PAMP) e desencadear respostas imunes de maneira mais adequada [123–125]. Além disso, a multimerização pode permitir uma melhor interação dos antígenos com os BCRs (receptores de células B), atuando como uma ligação cruzada entre esses receptores e, assim, levando à ativação celular [126].

É importante salientar que a melhora substancial na eficiência imunológica aqui observada foi obtida sem a inclusão de quaisquer adjuvantes convencionais na formulação, confirmando que as nanopartículas de ouro são, de fato, uma plataforma promissora para a entrega de antígenos, visando expandir a aplicabilidade das vacinas de subunidades.

4.7. Estudos de estabilidade dos complexos AuNPs+RBD

Dado o melhor desempenho imunológico obtido pelas formulações com M45+RBD e M60+RBD, a estabilidade desses complexos foi avaliada por espectrofotometria UV-visível ao longo de 15 dias, considerando que dados de estabilidade são fundamentais para avaliação de qualquer produto farmacêutico. Os resultados dessa avaliação estão mostrados nos gráficos da Figura 60.

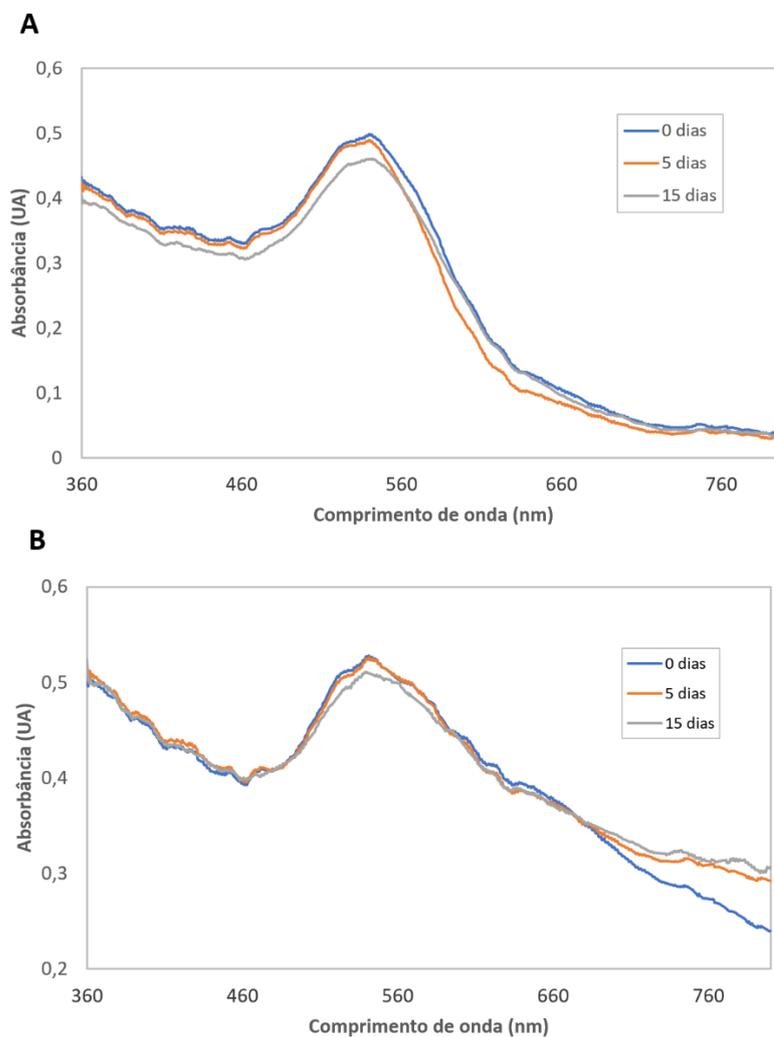


Figura 60 – Análise espectrofotométrica das nanopartículas funcionalizadas com RBD após 0, 5 e 15 dias de armazenamento a 4°C. A) M45+RBD; B) M60+RBD. Imagem publicada em [2].

O acompanhamento de 15 dias demonstrou que não foram observadas diferenças significativas na espectroscopia UV-visível ao longo desse período, sugerindo que essas são formulações estáveis e adequadas para o armazenamento em condições refrigeradas. Além disso, a ausência de material precipitado nas amostras ao longo do tempo também reforça a boa estabilidade das formulações.

Apesar dos complexos terem demonstrado boa estabilidade, curiosamente as análises de DLS por intensidade indicaram tamanho médio de partícula de

825,4 ± 10,88 nm (contra 73,1 ± 6,09 nm nos resultados por número) e 888,5 ± 28,64 nm (contra 110,3 ± 12,81 nm) para as amostras M45+RBD e M60+RBD, respectivamente. Partículas grandes tendem a precipitar rapidamente devido à forte atração entre elas, consequência de uma menor área superficial e, portanto, menor camada de solvatação de íons carregados que tendem a se repelir por interações eletrostáticas [127]. Como não foi observada baixa estabilidade ou precipitação dos complexos, foi levantada a hipótese de que as partículas maiores de 800 nm identificadas na análise de DLS por intensidade eram resultado de interações eletrostáticas fracas entre as proteínas da corona proteica. Para testar essa hipótese, foi adicionado 1M de NaCl às amostras M45+RBD e M60+RBD, conforme metodologia descrita no Item 3.9.2.1, e analisado o tamanho das partículas por intensidade de DLS na presença de sal. A Tabela 14 mostra o resultado dessa análise.

Tabela 14 – Resultado de tamanho médio de partícula na ausência e na presença de NaCl 1M por número e por intensidade utilizando DLS para os complexos M45+RBD e M60+RBD

Amostra	Tamanho por intensidade (nm)		Tamanho por número (nm)	
	Sem NaCl adicional	Com NaCl adicional	Sem NaCl adicional	Com NaCl adicional
M45+RBD	825,4 ± 10,88	101,8 ± 10,31	73,1 ± 6,09	70,4 ± 5,76
M60+RBD	888,5 ± 28,64	120,0 ± 12,33	110,3 ± 12,81	100,7 ± 10,23

A presença de quantidades acima de 500 mM de sal tende a aumentar a solubilidade de proteínas desfazendo as ligações eletrostáticas fracas entre elas (efeito *salting-in*) [128]. Na presença de NaCl 1M, houve diminuição significativa no tamanho das partículas na análise de DLS por intensidade para ambas as amostras. Em relação ao DLS por número, não houve alteração significativa do resultado na presença de sal. Isso mostra que havia uma baixa partículas interagindo fracamente entre si em quantidade insuficiente para alterar o resultado em número, mas que apresentavam tamanhos grandes (por isso a alteração por intensidade, uma vez que o espalhamento de luz é proporcional ao tamanho $\times 10^6$ [108]). A adição de sal desfez esses aglomerados, o que indica que eram, de fato, interações fracas. Essas interações fracas justificam o fato de não haver precipitação mesmo com partículas

que aparentavam ser muito grandes.

4.8. Estudos de citotoxicidade *in vitro*

Estudos recentes têm demonstrado que as nanopartículas de ouro possuem características de segurança adequadas para aplicações biomédicas [29]. O antígeno RBD ao qual as AuNPs são combinadas também é amplamente utilizado na literatura e foi relatado como não tóxico em estudos anteriores [123]. Novamente, considerando o melhor desempenho imunológico e o potencial de aplicação das formulações com os complexos M45+RBD e M60+RBD, foram feitos testes de citotoxicidade dos grupos de AuNPs M45 e M60, da proteína RBD e dos complexos M45+RBD e M60+RBD. Para esses testes, as formulações de vacina contendo os complexos M45+RBD e M60+RBD foram preparadas conforme metodologia descrita no Item 3.9.2 e 60% do equivalente a uma dose animal foi utilizado em cada poço de uma placa de 96 poços (6 µg/poço), representando uma condição extrema. Duas condições adicionais foram avaliadas usando diferentes diluições de dose: diluição 8 vezes (correspondendo a 0,75 µg/poço) e diluição 128 vezes (correspondendo a 47 ng/poço). O gráfico da Figura 61 mostra os resultados de viabilidade celular após exposição das células às diferentes formulações.

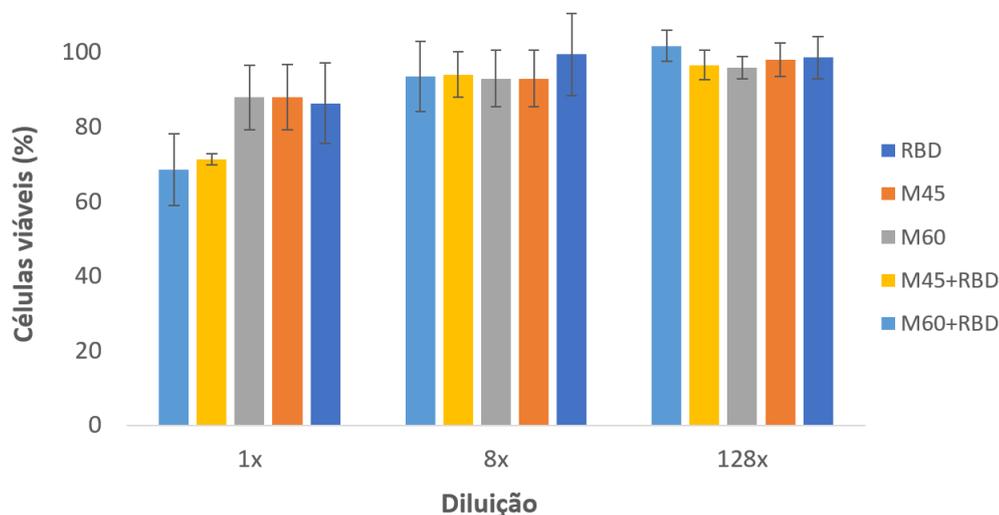


Figura 61 – Ensaio de citotoxicidade NRU das formulações com RBD, M45, M60, M45+RBD e M60+RBD em três diferentes concentrações adicionadas às células NCTC 929 (mais diluída, intermediária e mais concentrada). Para o "ensaio 1x", um volume de 10 μ L de AuNPs + 10 μ L de RBD (6 μ g) foi aplicado em uma placa de 96 poços (10^5 células), o que representa uma alta exposição das células às nanopartículas conjugadas quando comparado às condições in vivo observadas após a administração da vacina. Imagem publicada em [2].

Embora tenha sido observado um pequeno impacto na viabilidade celular para os complexos M45+RBD e M60+RBD ao utilizar a dose mais concentrada (condição extrema), nenhum impacto significativo foi observado para as condições mais diluídas, sugerindo que os grupos de AuNPs estudados são seguros e não possuem efeito proeminente na viabilidade celular. No geral, os dados de toxicidade negligenciável obtidos para esses grupos, estando ou não conjugados com RBD, confirmam que as AuNPs com as características apresentadas atendem aos principais requisitos para serem classificadas como uma potencial estratégia de entrega de antígenos para incorporação em formulações de vacinas.

5. CONCLUSÕES

Foi demonstrado que a síntese controlada e reprodutível de AuNPs de diferentes morfologias e tamanhos, com alta conversão do sal de ouro, é possível por via microfluídica através do ajuste dos parâmetros de processo. Observou-se que as dimensões e geometria do misturador, concentração de reagentes e temperatura de reação influenciam diretamente no produto da síntese. Mantendo as condições de processo de razão molar NaCt:Ouro 3:1, sendo o sal de ouro a 2,5 mM e NaCt a 7,5 mM, com tempo de residência de 90 s, foi possível controlar o tamanho e geometria das AuNPs sintetizadas apenas variando a temperatura da reação para sínteses com NaCt. Mantendo as condições de processo, foi possível obter AuNPs de morfologias ainda mais complexas em reações utilizando ácido tânico junto ao NaCt como agente redutor. As nanopartículas sintetizadas apresentaram estabilidade satisfatória (módulo do potencial zeta ≥ 20 mV). A suspensão de partículas se mostrou estável, mantendo suas características por ao menos 42 dias quando armazenadas à temperatura subambiente. Foi possível, também, validar, através da comparação com imagens de MET, os resultados das análises de DLS em relação ao tamanho médio de partículas das amostras estudadas.

Para a produção controlada dessas AuNPs, foi desenvolvido e otimizado um sistema microfluídico baseado em LTCC de baixa manutenção, quimicamente inerte, portátil e robusto. Utilizando um único dispositivo, com apenas alguns ajustes no processo, foi demonstrado que é possível sintetizar AuNPs estáveis de diferentes tamanhos e formas, incluindo morfologias complexas como nanodendritos e partículas em forma de girino, de maneira controlada e reprodutível, sendo assim ideal para aplicações médicas e farmacêuticas.

As AuNPs produzidas demonstraram alta afinidade pela proteína RBD, antígeno do vírus SARS-Cov-2. Em testes *in vivo* em modelo animal, observou-se que a presença de AuNPs permitiu um ganho substancial tanto na quantidade quanto na qualidade dos anticorpos anti-RBD induzidos. Para formulação de vacina contra SARS-CoV-2, foram testados diferentes grupos de AuNPs conjugadas a RBD e

observou-se que todas as formulações de vacina contendo AuNPs induziram uma resposta mais forte de IgG em relação a RBD sozinha, mas apenas os camundongos imunizados com M45+RBD e M60+RBD apresentaram títulos de IgG significativamente mais altos do que os induzidos apenas pela RBD. Além disso, as formulações com M45+RBD e M60+RBD também induziram anticorpos altamente neutralizantes capazes de bloquear a infecção pelo SARS-CoV-2 em diluições de até 1/1.280, mesmo sem a adição de adjuvantes tradicionais, e apresentaram boa estabilidade (ao menos 15 dias sob refrigeração) e baixa citotoxicidade mesmo em situação extrema (6 μg em 10^5 células). Esses resultados demonstraram que a presença das AuNPs melhorou significativamente a imunização dos animais nos testes *in vivo* e que, além disso, as características físicas das AuNPs exercem grande influência no desempenho da vacina em ambiente biológico.

Coletivamente, esses resultados destacam a relevância das nanopartículas de ouro como plataformas de entrega de antígenos para o desenvolvimento de formulações vacinais, uma vez que as AuNPs apresentaram desempenho consistentemente superior em comparação com RBD isolada na indução de anticorpos de alta qualidade e alto título que bloqueiam efetivamente a infecção viral *in vitro*. Isso confirma que as nanopartículas de ouro são, de fato, uma plataforma promissora para a entrega de antígenos, visando expandir a aplicabilidade das vacinas de subunidades e possivelmente outras aplicações farmacêuticas.

Em oportunidades futuras, o sistema microfluídico desenvolvido pode ser utilizado para a busca por AuNPs com morfologias e tamanhos diversos aos apresentados neste trabalho, através da variação de outros parâmetros de processo como pH, diferentes agentes redutores e adição de surfactantes. Além disso, o microdispositivo apresentado pode ser utilizado para síntese de outras nanopartículas metálicas e, também, pode ser aprimorado com adição de sensores e controladores, ou utilizado em série com outros misturadores para a funcionalização contínua das partículas produzidas com proteínas e outras biomoléculas de interesse médico. Além das possibilidades de exploração do dispositivo microfluídico, as AuNPs produzidas nesse trabalho podem ser também utilizadas para outras aplicações médicas como

entrega de biomoléculas para desenvolvimento de biosensores, terapia gênica, entrega direcionada de fármacos ou mesmo a funcionalização com proteínas recombinantes visando a formulação de vacinas para demais doenças de origem viral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] N.C. Dalibera, A.F. Oliveira, A.R. Azzoni, Synthesis of gold nanoparticles with different sizes and morphologies using a single LTCC-based microfluidic system for point-of-care use in personalized medicine, *Microfluid. Nanofluidics*. 27 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10404-023-02667-y>.
- [2] N.C. Dalibera, M.J. Rodrigues-jesus, R. Andreatta-santos, M. Luiz, A.F. Oliveira, A.R. Azzoni, D.S. Ferreira, M.T.P. Favaro, SARS-CoV - 2 Nanovaccine Composed of Microfluidic-Produced Gold Nanoparticles Induces Neutralizing Immune Responses, (2023). <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c03905>.
- [3] B. Bahrami, M. Hojjat-Farsangi, H. Mohammadi, E. Anvari, G. Ghalamfarsa, M. Yousefi, F. Jadidi-Niaragh, Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy, *Immunol. Lett.* 190 (2017) 64–83. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.015>.
- [4] M.M. Ow Sullivan, J.J. Green, T.M. Przybycien, Development of a novel gene delivery scaffold utilizing colloidal gold-polyethylenimine conjugates for DNA condensation, *Gene Ther.* 10 (2003) 1882–1890. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302083>.
- [5] K.R. Abdul, S.R. Makhsin, N.D. Zakaria, N.M. Nor, Gold nanoparticles for diagnostic development, in: *Sustain. Diagnostics Low Resour. Areas*, 2017. <https://www.researchgate.net/publication/331111795>.
- [6] U. Unzueta, M.V. Céspedes, E. Vázquez, N. Ferrer-Miralles, R. Mangués, A. Villaverde, Towards protein-based viral mimetics for cancer therapies, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.02.007>.
- [7] C. Mayer, Nanocapsules as drug delivery systems, *Int. J. Artif. Organs*. 28 (2005) 1163–1171. <https://doi.org/10.1177/039139880502801114>.
- [8] M.T.P. Favaro, M.A.S. de Toledo, R.F. Alves, C.A. Santos, L.L. Beloti, R. Janissen, L.G. de la Torre, A.P. Souza, A.R. Azzoni, Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide,

- J. Biotechnol. 173 (2014) 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.01.001>.
- [9] H. Ledford, Anti-cancer viruses take off, *Nature*. 557 (2018) 150–151.
- [10] M.L. Edelstein, M.R. Abedi, J. Wixon, Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update, *J. Gene Med.* 9 (2007) 833–842. <https://doi.org/10.1002/jgm>.
- [11] P. Saccardo, A. Villaverde, N. González-Montalbán, Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.03.004>.
- [12] R. Díaz, V. Pallarès, O. Cano-Garrido, N. Serna, L. Sánchez-García, A. Falgàs, M. Pesarrodona, U. Unzueta, A. Sánchez-Chardi, J.M. Sánchez, I. Casanova, E. Vázquez, R. Manges, A. Villaverde, Selective CXCR4+ Cancer Cell Targeting and Potent Antineoplastic Effect by a Nanostructured Version of Recombinant Ricin, *Small*. 14 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1002/sml.201800665>.
- [13] M. Ruponen, S. Arkko, A. Urtti, M. Reinisalo, V.P. Ranta, Intracellular DNA release and elimination correlate poorly with transgene expression after non-viral transfection, *J. Control. Release*. 136 (2009) 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.02.012>.
- [14] A. Vartak, S.J. Sucheck, Recent advances in subunit vaccine carriers, *Vaccines*. 4 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.3390/vaccines4020012>.
- [15] P. Moyle, I. Toth, Self-Adjuvanting Lipopeptide Vaccines, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 506–516. <https://doi.org/10.2174/092986708783503249>.
- [16] Atze T Das, Rienk E Jeeninga, Ben Berkhout, Possible applications for replicating HIV-1 vectors, *HIV Ther.* 4 (2010) 361–369. <https://doi.org/10.2217/hiv.10.20>.
- [17] B. Pulendran, R. Ahmed, Immunological mechanisms of vaccination, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 509–517. <https://doi.org/10.1038/ni.2039>.
- [18] P.M. Moyle, I. Toth, Modern Subunit Vaccines: Development, Components, and Research Opportunities, *ChemMedChem*. 8 (2013) 360–376.

<https://doi.org/10.1002/cmdc.201200487>.

- [19] E. Mastrobattista, M.A.E.M. van der Aa, W.E. Hennink, D.J.A. Crommelin, Artificial viruses: A nanotechnological approach to gene delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 115–121. <https://doi.org/10.1038/nrd1960>.
- [20] I. Casanova, U. Unzueta, I. Arroyo-Solera, M.V. Céspedes, A. Villaverde, R. Manges, E. Vazquez, Protein-driven nanomedicines in oncotherapy, *Curr. Opin. Pharmacol.* 47 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.12.004>.
- [21] E. Vázquez, N. Ferrer-Miralles, A. Villaverde, Peptide-assisted traffic engineering for nonviral gene therapy, *Drug Discov. Today.* 13 (2008) 1067–1074. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.08.008>.
- [22] M.T. de P. Favaro, N. Serna, L. Sánchez-García, R. Cubarsi, M. Roldán, A. Sánchez-Chardi, U. Unzueta, R. Manges, N. Ferrer-Miralles, A.R. Azzoni, E. Vázquez, A. Villaverde, Switching cell penetrating and CXCR4-binding activities of nanoscale-organized arginine-rich peptides, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 14 (2018) 1777–1786. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.05.002>.
- [23] A.E. Gregory, R. Titball, D. Williamson, Vaccine delivery using nanoparticles, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00013>.
- [24] Y. Krishnamachari, S.M. Geary, C.D. Lemke, A.K. Salem, Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines, *Pharm. Res.* 28 (2011) 215–236. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0241-4>.
- [25] P. Sahdev, L.J. Ochyl, J.J. Moon, Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems, *Pharm. Res.* 31 (2014) 2563–2582. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1419-y>.
- [26] L. Zhao, A. Seth, N. Wibowo, C.X. Zhao, N. Mitter, C. Yu, A.P.J. Middelberg, Nanoparticle vaccines, *Vaccine.* 32 (2014) 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>.
- [27] P.M. Tiwari, K. Vig, V.A. Dennis, S.R. Singh, Functionalized gold nanoparticles

- and their biomedical applications, *Nanomaterials*. 1 (2011) 31–63. <https://doi.org/10.3390/nano1010031>.
- [28] P. Singh, S. Pandit, V.R.S.S. Mokkalapati, A. Garg, V. Ravikumar, I. Mijakovic, Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>.
- [29] L.A. Dykman, Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious diseases, *Expert Rev. Vaccines*. 19 (2020) 465–477. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1758070>.
- [30] R.F. Alves, M.T.P. Favaro, T.A. Balbino, M.A.S. de Toledo, L.G. de la Torre, A.R. Azzoni, Recombinant protein-based nanocarriers and their association with cationic liposomes: Characterization and in vitro evaluation, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 513 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.11.019>.
- [31] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature*. 442 (2006) 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- [32] D. Li, *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812295-2.00132-X>.
- [33] Z. Liu, F. Fontana, A. Python, J.T. Hirvonen, H.A. Santos, Microfluidics for Production of Particles: Mechanism, Methodology, and Applications, *Small*. 16 (2020) 1–24. <https://doi.org/10.1002/sml.201904673>.
- [34] M. Thiele, J.Z.E. Soh, A. Knauer, D. Malsch, O. Stranik, R. Müller, A. Csáki, T. Henkel, J.M. Köhler, W. Fritzsche, Gold nanocubes - Direct comparison of synthesis approaches reveals the need for a microfluidic synthesis setup for a high reproducibility, *Chem. Eng. J.* 288 (2016) 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.020>.
- [35] O. Sohnel, J.W. Mullin, Interpretation of Crystallization Induction Periods, *J. Colloid Interface Sci.* 123 (1988) 43–50.
- [36] A.J. Mahajan, D.J. Kirwan, Nucleation and growth kinetics of biochemicals

- measured at high supersaturations, *J. Cryst. Growth.* 144 (1994) 281–290. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(94\)90468-5](https://doi.org/10.1016/0022-0248(94)90468-5).
- [37] C.Y. Lee, C.L. Chang, Y.N. Wang, L.M. Fu, Microfluidic mixing: A review, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 3263–3287. <https://doi.org/10.3390/ijms12053263>.
- [38] J.M. Lim, A. Swami, L.M. Gilson, S. Chopra, S. Choi, J. Wu, R. Langer, R. Karnik, O.C. Farokhzad, Ultra-high throughput synthesis of nanoparticles with homogeneous size distribution using a coaxial turbulent jet mixer, *ACS Nano.* 8 (2014) 6056–6065. <https://doi.org/10.1021/nn501371n>.
- [39] C.H. Weng, C.C. Huang, C.S. Yeh, H.Y. Lei, G. Bin Lee, Synthesis of hexagonal gold nanoparticles using a microfluidic reaction system, *J. Micromechanics Microengineering.* 18 (2008). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/18/3/035019>.
- [40] E. Cao, I. Zuburtukudis, N. Al-Rifai, M. Roydhouse, A. Gavriilidis, Enhanced Performance of Oxidation of Rosalva (9-decen-1-ol) to Costenal (9-decenal) on Porous Silicon-Supported Silver Catalyst in a Microstructured Reactor, 2014. <https://doi.org/10.3390/books978-3-03842-039-2>.
- [41] G. Tofighi, H. Lichtenberg, J. Pesek, T.L. Sheppard, W. Wang, L. Schöttner, G. Rinke, R. Dittmeyer, J.D. Grunwaldt, Continuous microfluidic synthesis of colloidal ultrasmall gold nanoparticles:: In situ study of the early reaction stages and application for catalysis, *React. Chem. Eng.* 2 (2017) 876–884. <https://doi.org/10.1039/c7re00114b>.
- [42] D.N. Kim, Y. Lee, W.G. Koh, Fabrication of microfluidic devices incorporating bead-based reaction and microarray-based detection system for enzymatic assay, *Sensors Actuators, B Chem.* 137 (2009) 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.12.042>.
- [43] T. Noal, S. Kuhn, A.J. Musacchio, K.F. Jensen, S.L. Buchwald, Suzuki-miyaura cross-coupling reactions in flow: Multistep synthesis enabled by a microfluidic extraction, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50 (2011) 5943–5946. <https://doi.org/10.1002/anie.201101480>.

- [44] T. Habib, C. Brämer, C. Heuer, J. Ebbecke, S. Beutel, J. Bahnemann, 3D-Printed microfluidic device for protein purification in batch chromatography, *Lab Chip*. 22 (2022) 986–993. <https://doi.org/10.1039/d1lc01127h>.
- [45] H. Debus, M. Beck-Broichsitter, T. Kissel, Optimized preparation of pDNA/poly(ethylene imine) polyplexes using a microfluidic system, *Lab Chip*. 12 (2012) 2498–2506. <https://doi.org/10.1039/c2lc40176b>.
- [46] G. Cai, L. Xue, H. Zhang, J. Lin, A review on micromixers, *Micromachines*. 8 (2017) 1–27. <https://doi.org/10.3390/mi8090274>.
- [47] A. Otten, S. Köster, B. Struth, A. Snigirev, T. Pfohl, Microfluidics of soft matter investigated by small-angle X-ray scattering, *J. Synchrotron Radiat*. 12 (2005) 745–750. <https://doi.org/10.1107/S0909049505013580>.
- [48] E. Jang, W.G. Koh, Multiplexed enzyme-based bioassay within microfluidic devices using shape-coded hydrogel microparticles, *Sensors Actuators, B Chem*. 143 (2010) 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.10.028>.
- [49] T. Endres, M. Zheng, M. Beck-Broichsitter, O. Samsonova, H. Debus, T. Kissel, Optimising the self-assembly of siRNA loaded PEG-PCL-IPEI nano-carriers employing different preparation techniques, *J. Control. Release*. 160 (2012) 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.013>.
- [50] B.S. Ferguson, S.F. Buchsbaum, J.S. Swensen, K. Hsieh, X. Lou, H.T. Soh, Integrated Microfluidic Electrochemical DNA Sensor, *Anal. Chemistry*. 81 (2009) 7341–7346.
- [51] T.Y. Ho, K. Chakrabarty, P. Pop, Digital microfluidic biochips: Recent research and emerging challenges, *Embed. Syst. Week 2011, ESWEEK 2011 - Proc. 9th IEEE/ACM/IFIP Int. Conf. Hardware/Software Codesign Syst. Synth. CODES+ISSS'11*. (2011) 335–343. <https://doi.org/10.1145/2039370.2039422>.
- [52] Z. Ye, K. Wang, M. Lou, X. Jia, F. Xu, G. Ye, Consecutive synthesis of gold nanobipyramids with controllable morphologies using a microfluidic platform, *Microfluid. Nanofluidics*. 24 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10404-020->

02345-3.

- [53] S. Calamak, K. Ulubayram, Controlled synthesis of multi-branched gold nanodendrites by dynamic microfluidic flow system, *J. Mater. Sci.* 54 (2019) 7541–7552. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03403-0>.
- [54] K. Sugano, Y. Uchida, O. Ichihashi, H. Yamada, T. Tsuchiya, O. Tabata, Mixing speed-controlled gold nanoparticle synthesis with pulsed mixing microfluidic system, *Microfluid. Nanofluidics.* 9 (2010) 1165–1174. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0637-9>.
- [55] L.P. Bressan, J. Robles-Najar, C.B. Adamo, R.F. Quero, B.M.C. Costa, D.P. de Jesus, J.A.F. da Silva, 3D-printed microfluidic device for the synthesis of silver and gold nanoparticles, *Microchem. J.* 146 (2019) 1083–1089. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.043>.
- [56] L. Uson, V. Sebastian, M. Arruebo, J. Santamaria, Continuous microfluidic synthesis and functionalization of gold nanorods, *Chem. Eng. J.* 285 (2016) 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.103>.
- [57] J. Ma, S.M.Y. Lee, C. Yi, C.W. Li, Controllable synthesis of functional nanoparticles by microfluidic platforms for biomedical applications-a review, *Lab Chip.* 17 (2017) 209–226. <https://doi.org/10.1039/C6LC01049K>.
- [58] D. Shalom, R.C.R. Wootton, R.F. Winkle, B.F. Cottam, R. Vilar, A.J. deMello, C.P. Wilde, Synthesis of thiol functionalized gold nanoparticles using a continuous flow microfluidic reactor, *Mater. Lett.* 61 (2007) 1146–1150. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.06.072>.
- [59] A. Sasidharan, N.A. Monteiro-riviere, Biomedical applications of gold nanomaterials: opportunities and challenges, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 7 (2015) 779–796. <https://doi.org/10.1002/wnan.1341>.
- [60] L.A. Bauer, N.S. Birenbaum, G.J. Meyer, Biological applications of high aspect ratio nanoparticles, *J. Mater. Chem.* (2004) 517–526. <https://doi.org/10.1039/b312655b>.

- [61] A.J. Haes, D.A. Stuart, S. Nie, R.P. Van Duyne, Using solution-phase nanoparticles, surface-confined nanoparticle arrays and single nanoparticles as biological sensing platforms, *J. Fluoresc.* 14 (2004) 355–367. <https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000031817.35049.1f>.
- [62] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 1870–1901. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.030>.
- [63] M.E. Aubin-Tam, K. Hamad-Schifferli, Structure and function of nanoparticle – protein conjugates, *Biomed. Mater.* 3 (2008) 17. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034001>.
- [64] L.L. Cai, P. Liu, X. Li, X. Huang, Y.Q. Ye, F.Y. Chen, H. Yuan, F.Q. Hu, Y.Z. Du, RGD peptide-mediated chitosan-based polymeric micelles targeting delivery for integrin-overexpressing tumor cells., *Int. J. Nanomedicine.* 6 (2011) 3499–3508.
- [65] R. Kozlowski, A. Ragupathi, R.B. Dyer, Characterizing the Surface Coverage of Protein-Gold Nanoparticle Bioconjugates, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 2691–2700. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00366>.
- [66] R. Mateu Ferrando, L. Lay, L. Polito, Gold nanoparticle-based platforms for vaccine development, *Drug Discov. Today Technol.* 38 (2020) 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.001>.
- [67] S. Sangabathuni, R. Vasudeva Murthy, P.M. Chaudhary, M. Surve, A. Banerjee, R. Kikkeri, Glyco-gold nanoparticle shapes enhance carbohydrate-protein interactions in mammalian cells, *Nanoscale.* 8 (2016) 12729–12735. <https://doi.org/10.1039/c6nr03008d>.
- [68] S. Kumar, K.S. Gandhi, R. Kumar, Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46 (2007) 3128–3136. <https://doi.org/10.1021/ie060672j>.
- [69] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951)

- 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- [70] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
- [71] H. Al-Johani, E. Abou-Hamad, A. Jedidi, C.M. Widdifield, J. Viger-Gravel, S.S. Sangaru, D. Gajan, D.H. Anjum, S. Ould-Chikh, M.N. Hedhili, A. Gurinov, M.J. Kelly, M. El Eter, L. Cavallo, L. Emsley, J.M. Basset, The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles, *Nat. Chem.* 9 (2017) 890–895. <https://doi.org/10.1038/nchem.2752>.
- [72] M. Thiele, J.Z.E. Soh, A. Knauer, D. Malsch, O. Stranik, R. Müller, A. Csáki, T. Henkel, J.M. Köhler, W. Fritzsche, Gold nanocubes - Direct comparison of synthesis approaches reveals the need for a microfluidic synthesis setup for a high reproducibility, *Chem. Eng. J.* 288 (2016) 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.020>.
- [73] B. Abécassis, F. Testard, O. Spalla, P. Barboux, Probing in situ the nucleation and growth of gold nanoparticles by small-angle X-ray scattering, *Nano Lett.* 7 (2007) 1723–1727. <https://doi.org/10.1021/nl0707149>.
- [74] J. Polte, R. Eler, A.F. Thünemann, S. Sokolov, T.T. Ahner, K. Rademann, F. Emmerling, R. Kraehnert, Nucleation and growth of gold nanoparticles studied via in situ small angle X-ray scattering at millisecond time resolution, *ACS Nano.* 4 (2010) 1076–1082. <https://doi.org/10.1021/nn901499c>.
- [75] D. Liu, S. Cito, Y. Zhang, C.F. Wang, T.M. Sikanen, H.A. Santos, A versatile and robust microfluidic platform toward high throughput synthesis of homogeneous nanoparticles with tunable properties, *Adv. Mater.* 27 (2015) 2298–2304. <https://doi.org/10.1002/adma.201405408>.
- [76] V. Sebastian Cabeza, S. Kuhn, A.A. Kulkarni, K.F. Jensen, Size-controlled flow synthesis of gold nanoparticles using a segmented flow microfluidic platform, *Langmuir.* 28 (2012) 7007–7013. <https://doi.org/10.1021/la205131e>.

- [77] C.B. Adamo, A.S. Junger, L.P. Bressan, J.A.F. da Silva, R.J. Poppi, D.P. de Jesus, Fast and straightforward in-situ synthesis of gold nanoparticles on a thread-based microfluidic device for application in surface-enhanced Raman scattering detection, *Microchem. J.* 156 (2020) 104985. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104985>.
- [78] H. Huang, H. Du Toit, S. Ben-Jaber, G. Wu, L. Panariello, N.T.K. Thanh, I.P. Parkin, A. Gavriilidis, Rapid synthesis of gold nanoparticles with carbon monoxide in a microfluidic segmented flow system, *React. Chem. Eng.* 4 (2019) 884–890. <https://doi.org/10.1039/c8re00351c>.
- [79] H. Yagyu, Y. Tanabe, S. Takano, M. Hamamoto, Continuous flow synthesis of monodisperse gold nanoparticles by liquid-phase reduction method on glass microfluidic device, *Micro Nano Lett.* 12 (2017) 536–539. <https://doi.org/10.1049/mnl.2017.0126>.
- [80] S. Abalde-Cela, P. Taladriz-Blanco, M.G. De Oliveira, C. Abell, Droplet microfluidics for the highly controlled synthesis of branched gold nanoparticles, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20754-x>.
- [81] J. Wagner, J.M. Köhler, Continuous synthesis of gold nanoparticles in a microreactor, *Nano Lett.* 5 (2005) 685–691. <https://doi.org/10.1021/nl050097t>.
- [82] H. SadAbadi, S. Badilescu, M. Packirisamy, R. Wüthrich, Integration of gold nanoparticles in PDMS microfluidics for lab-on-a-chip plasmonic biosensing of growth hormones, *Biosens. Bioelectron.* 44 (2013) 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.016>.
- [83] S. Duraiswamy, S.A. Khan, Plasmonic nanoshell synthesis in microfluidic composite foams, *Nano Lett.* 10 (2010) 3757–3763. <https://doi.org/10.1021/nl102478q>.
- [84] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S.E. Skrabalak, Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: Simple chemistry meets complex physics?, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 48 (2009) 60–103. <https://doi.org/10.1002/anie.200802248>.

- [85] Y. Niidome, K. Nishioka, H. Kawasaki, S. Yamada, Rapid synthesis of gold nanorods by the combination of chemical reduction and photoirradiation processes; morphological changes depending on the growing processes, *Chem. Commun.* 3 (2003) 2376–2377. <https://doi.org/10.1039/b307836a>.
- [86] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, M.E.C.M. Rostelato, Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction, *J. Alloys Compd.* 798 (2019) 714–740. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>.
- [87] M. Grzelczak, J. Pérez-Juste, P. Mulvaney, L.M. Liz-Marzán, Shape control in gold nanoparticle synthesis, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1783–1791. <https://doi.org/10.1039/b711490g>.
- [88] A. Vasudev, A. Kaushik, K. Jones, S. Bhansali, Prospects of low temperature co-fired ceramic (LTCC) based microfluidic systems for point-of-care biosensing and environmental sensing, *Microfluid. Nanofluidics.* 14 (2013) 683–702. <https://doi.org/10.1007/s10404-012-1087-3>.
- [89] S. Gómez-De Pedro, M. Puyol, J. Alonso-Chamarro, Continuous flow synthesis of nanoparticles using ceramic microfluidic devices, *Nanotechnology.* 21 (2010). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/41/415603>.
- [90] M.F. Shafique, I.D. Robertson, Rapid prototyping of LTCC microwave circuits using laser machining, *IEEE MTT-S Int. Microw. Symp. Dig.* (2009) 469–472. <https://doi.org/10.1109/MWSYM.2009.5165735>.
- [91] F. Paquin, J. Rivnay, A. Salleo, N. Stingelin, C. Silva-Acuña, Multi-phase microstructures drive exciton dissociation in neat semicrystalline polymeric semiconductors, *J. Mater. Chem. C.* 3 (2015) 10715–10722. <https://doi.org/10.1039/C5TC02043C>.
- [92] L. Zhang, G. Widera, S. Blecher, D.A. Zaharoff, B. Mossop, D. Rabussay, Accelerated Immune Response to DNA Vaccines, *DNA Cell Biol.* 22 (2003) 815–822. <https://doi.org/10.1089/104454903322625028>.

- [93] K. Niikura, T. Matsunaga, T. Suzuki, S. Kobayashi, H. Yamaguchi, Y. Orba, A. Kawaguchi, H. Hasegawa, K. Kajino, T. Ninomiya, K. Ijiro, H. Sawa, Gold nanoparticles as a vaccine platform: Influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo, *ACS Nano*. 7 (2013) 3926–3938. <https://doi.org/10.1021/nn3057005>.
- [94] R.M. Iost, M.V.A. Martins, F.N. Crespilho, Dendritic gold nanoparticles towards transparent and electroactive electrodes, *An. Acad. Bras. Cienc.* 91 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180817>.
- [95] L. Xu, X. Wang, W. Wang, M. Sun, W.J. Choi, J.Y. Kim, C. Hao, S. Li, A. Qu, M. Lu, X. Wu, F.M. Colombari, W.R. Gomes, A.L. Blanco, A.F. de Moura, X. Guo, H. Kuang, N.A. Kotov, C. Xu, Enantiomer-dependent immunological response to chiral nanoparticles, *Nature*. 601 (2022) 366–373. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04243-2>.
- [96] R.M. Cardoso, Nanopartículas multifuncionais dispersáveis e suas potenciais aplicações em nanomedicina, 2018.
- [97] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>.
- [98] E. Borenfreund, J.A. Puerner, Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicol. Lett.* 24 (1985) 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).
- [99] D.B. Araujo, R.R.G. Machado, D.E. Amgarten, F. de M. Malta, G.G. de Araujo, C.O. Monteiro, E.D. Candido, C.P. Soares, F.G. de Menezes, A.C.C. Pires, R.A.F. Santana, A. de O. Viana, E. Dorlass, L. Thomazelli, L.C. de S. Ferreira, V.F. Botosso, C.R.G. Carvalho, D.B.L. Oliveira, J.R.R. Pinho, E.L. Durigon, SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 115 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200342>.
- [100] S. Wendel, J.M. Kutner, R. Machado, R. Fontão-Wendel, C. Bub, R. Fachini, A.

- Yokoyama, G. Candelaria, A. Sakashita, R. Achkar, N. Hamerschlag, P. Scuracchio, M. Amaral, M. Dal Ben, D. Araujo, C. Soares, A. Camargo, E. Kallás, E. Durigon, L.F. Reis, L.V. Rizzo, Screening for SARS-CoV-2 antibodies in convalescent plasma in Brazil: Preliminary lessons from a voluntary convalescent donor program, *Transfusion*. 60 (2020) 2938–2951. <https://doi.org/10.1111/trf.16065>.
- [101] O.A. Yeshchenko, I.S. Bondarchuk, V.S. Gurin, I.M. Dmitruk, A. V. Kotko, Temperature dependence of the surface plasmon resonance in gold nanoparticles, *Surf. Sci.* 608 (2013) 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2012.10.019>.
- [102] B. Rehm, J. Schubert, A. Haghshenas, J. Hughes, A. Paknejad, Fluids, in: *Microfluid. Model. Mech. Math.*, 2017: pp. 243–263. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3141-1.50009-5>.
- [103] J. Dong, P.L. Carpinone, G. Pyrgiotakis, P. Demokritou, B.M. Moudgil, Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method, *KONA Powder Part. J.* 37 (2020) 224–232. <https://doi.org/10.14356/kona.2020011>.
- [104] S.A. Aromal, D. Philip, Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using tannic acid and its application in catalysis, *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures*. 44 (2012) 1692–1696. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2012.04.022>.
- [105] M. Wuithschick, A. Birnbaum, S. Witte, M. Sztucki, U. Vainio, N. Pinna, K. Rademann, F. Emmerling, R. Kraehnert, J. Polte, Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis, *ACS Nano*. 9 (2015) 7052–7071. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b01579>.
- [106] X. Zhang, S. Ma, A. Li, L. Chen, J. Lu, X. Geng, M. Xie, X. Liang, Y. Wan, P. Yang, Continuous high-flux synthesis of gold nanoparticles with controllable sizes: a simple microfluidic system, *Appl. Nanosci.* 10 (2020) 661–669. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01214-y>.
- [107] N.T.H. Lien, V.X. Hoa, V.T.T. Duong, N. Van Tinh, T.H. Nhung, Synthesis and

- Optical Properties of Colloidal Gold Nanoparticles for Biomedical Applications, *Commun. Phys.* 21 (2011) 63. <https://doi.org/10.15625/0868-3166/21/1/96>.
- [108] Malvern, Calculating Volume Distributions From Dynamic Light Scattering Data, *Tech. Note.* 1 (n.d.) 1–4. www.malvern.com.
- [109] M.I. Ltd., Zetasizer Nano Series User Manual: Issue 2.1, (2004). [http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer Manual.pdf](http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20Manual.pdf).
- [110] H.E. Toma, L.S. Bonifácio, F.J. Anaissi, Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cormáticos, *Quím. Nov.* 5 (2005) 897–900. <https://doi.org/10.16923/reb.v13i1.548>.
- [111] T. Ahmad, Reviewing the tannic acid mediated synthesis of metal nanoparticles, *J. Nanotechnol.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/954206>.
- [112] I. Gülçin, Z. Huyut, M. Elmastaş, H.Y. Aboul-Enein, Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid, *Arab. J. Chem.* 3 (2010) 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.008>.
- [113] S.K. Sivaraman, S. Kumar, V. Santhanam, Room-temperature synthesis of gold nanoparticles - Size-control by slow addition, *Gold Bull.* 43 (2010) 275–286. <https://doi.org/10.1007/BF03214997>.
- [114] M.A. Uppal, A. Kafizas, M.B. Ewing, I.P. Parkin, The room temperature formation of gold nanoparticles from the reaction of cyclohexanone and auric acid; A transition from dendritic particles to compact shapes and nanoplates, *J. Mater. Chem. A.* 1 (2013) 7351–7359. <https://doi.org/10.1039/c3ta11546a>.
- [115] H. Wu, X. Ji, L. Zhao, S. Yang, R. Xie, W. Yang, Shape evolution of citrate capped gold nanoparticles in seeding approach, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 415 (2012) 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.031>.
- [116] X. Bai, L. Zheng, H. Liu, M. Zhao, Synthesis of tadpole-shaped Au nanoparticles using a Langmuir monolayer of fluorocarbon surfactant, *Mater. Lett.* 63 (2009) 1156–1158. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.02.026>.

- [117] F. Li, D. Tian, H. Cui, Synthesis and characterizations of iso-luminol-functionalized, tadpole-shaped, gold nanomaterials, *Luminescence*. 28 (2013) 7–15. <https://doi.org/10.1002/bio.1380>.
- [118] J. Hu, Y. Zhang, B. Liu, J. Liu, H. Zhou, Y. Xu, Y. Jiang, Z. Yang, Z.Q. Tian, Synthesis and properties tadpole-shaped gold nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9470–9471. <https://doi.org/10.1021/ja049738x>.
- [119] P. Wang, X. Wang, L. Wang, X. Hou, W. Liu, C. Chen, Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2015) 34610. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/034610>.
- [120] J. Piella, N.G. Bastús, V. Puntès, Size-dependent protein-nanoparticle interactions in citrate-stabilized gold nanoparticles: The emergence of the protein corona, *Bioconjug. Chem.* 28 (2017) 88–97. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00575>.
- [121] M. Ghasemtarei, A. Privat-Maldonado, M. Yusupov, S. Rahnema, A. Bogaerts, M.R. Ejtehadi, Effect of Cysteine Oxidation in SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain on Its Interaction with Two Cell Receptors: Insights from Atomistic Simulations, *J. Chem. Inf. Model.* 62 (2022) 129–141. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00853>.
- [122] A.C. Gomes, M. Mohsen, M.F. Bachmann, Harnessing nanoparticles for immunomodulation and vaccines, *Vaccines*. 5 (2017). <https://doi.org/10.3390/vaccines5010006>.
- [123] M.J. Rodrigues-Jesus, M. Teixeira de Pinho Favaro, A.A. Venceslau-Carvalho, M.F. de Castro-Amarante, B. da Silva Almeida, M. de Oliveira Silva, R. Andreatta-Santos, C. Gomes Barbosa, S.C.M. Brito, L.H. Freitas-Junior, S.B. Boscardin, L.C. de Souza Ferreira, Nano-multilamellar lipid vesicles promote the induction of SARS-CoV-2 immune responses by a protein-based vaccine formulation, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 45 (2022) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102595>.
- [124] H.G. Kelly, S.J. Kent, A.K. Wheatley, Immunological basis for enhanced

- immunity of nanoparticle vaccines, *Expert Rev. Vaccines*. 18 (2019) 269–280. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1578216>.
- [125] M.F. Bachmann, G.T. Jennings, Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 787–796. <https://doi.org/10.1038/nri2868>.
- [126] B. Nguyen, N.H. Tolia, Protein-based antigen presentation platforms for nanoparticle vaccines, *Npj Vaccines*. 6 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00330-7>.
- [127] S.A. Tovstun, V.F. Razumov, Theory of size-selective precipitation, *J. Nanoparticle Res.* 19 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3706-5>.
- [128] R.A. Curtis, L. Lue, A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 907–923. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.04.007>.