



Universidade Federal
de São João del-Rei

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
Programa de pós-graduação em engenharia química

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSENSORES PARA DETERMINAÇÃO DE
LIPÍDEOS EM LEITE BOVINO**

PATRÍCIA AVELAR RIBEIRO

OURO BRANCO - MG
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
Programa de pós-graduação em engenharia química

PATRÍCIA AVELAR RIBEIRO

***DESENVOLVIMENTO DE NANOSENSORES PARA DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS
EM LEITE BOVINO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São João Del-Rei como pré-requisito para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

*Bolsista FAPEMIG

Orientador: Prof. Dr. Igor José Boggione Santos
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Renata Carolina Zanetti Lofrano

Ouro Branco

2024

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R484r Ribeiro, Patricia Avelar .
Ribeiro : Desenvolvimento de nanossensores para
determinação de lipídeos em leite bovino / Patricia
Avelar Ribeiro ; orientador Igor José Boggione
Santos; coorientadora Renata Carolina Zanetti
Lofrano. -- Ouro Branco, 2024.
131 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química) -- Universidade Federal de São
João del-Rei, 2024.

1. Nanossensores. 2. Nanopartícula de ouro. 3.
Ácido 10,12-pentacosadínico (PCDA). 4. Teor de
gordura. 5. Leite bovino. I. Santos, Igor José
Boggione, orient. II. Lofrano, Renata Carolina
Zanetti , co-orient. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA


NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA Nº 1 / 2024 - PPGEQ (13.13)

Nº do Protocolo: 23122.001368/2024-90

Ouro Branco-MG, 12 de janeiro de 2024.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **PATRICIA AVELAR RIBEIRO**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, EM 12 DE JANEIRO DE 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 **THOMAS VALENTE DE OLIVEIRA**
Data: 15/01/2024 14:36:23-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Thomás Valente de Oliveira
UFU/FEQ

(Assinado digitalmente em 12/01/2024 21:53)

EDSON ROMANO NUCCI
COORDENADOR DE CURSO
PPGEQ (13.13)
Matrícula: 1811284

(Assinado digitalmente em 14/01/2024 21:40)

IGOR JOSE BOGGIONE SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGEEnBio (13.65)
Matrícula: 2255060

Visualize o documento original em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1**, ano: **2024**, tipo: **NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA**, data de emissão: **12/01/2024** e o código de verificação: **87e2401d86**

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, por me conceder a dádiva da vida, e por sempre estar ao meu lado, me guiando para o caminho certo.

Aos meus pais e minha irmã, José Geraldo, Glaucia e Thais, por todo apoio e carinho prestado nos melhores e piores momentos, e por sempre me incentivarem a ir além do que me achava capaz, eu amo vocês!

À minha família e amigos, pelo carinho e orações, e por todo suporte na pesquisa e na vida.

Ao meu orientador e amigo, Igor Boggione, pela confiança em mim e em meu trabalho, por estar sempre à disposição com bastante paciência e competência em ensinar, e por ser um pai científico para mim.

Ao grupo de pesquisa Nanotec, em especial à Ana Luiza, George e Andersen, pela ajuda em todos os momentos e por todo conhecimento compartilhado.

A banca examinadora, pelas contribuições e aos demais professores do PPGEQ que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

Ao CNPq, CAPES, UFSJ, UFOP e principalmente a FAPEMIG, pelo auxílio financeiro e apoio no desenvolvimento da ciência.

A todos aqueles que fazem parte da minha vida e torcem pelo meu sucesso e felicidade. Sem vocês, nada disso seria possível. Muito obrigado!

RESUMO

A composição do leite, especialmente o teor de gordura, desempenha um papel essencial na qualidade final dos produtos, além de influenciar significativamente os preços para os produtores. As gorduras lácteas, compostas por ácidos graxos, são responsáveis pelas características reológicas e organolépticas do leite e seus subprodutos. Este projeto propôs dois nanossensores colorimétricos que envolve a interação de nanopartículas de ouro e 10,12-ácido pentacosadínico com soluções aquosas de ácidos graxos característicos do leite. Os testes foram conduzidos utilizando ácido palmítico, ácido oleico e ácido caprílico, empregando dois solventes distintos: álcool isopropílico e Triton X-100. A técnica foi validada por meio de espectroscopia UV-Vis e análise de cores RGB, evidenciando a capacidade de modificar a coloração das amostras à medida que a concentração de ácido graxo aumenta. Embora os ensaios com álcool isopropílico tenham apresentado uma resposta colorimétrica acentuada, as amostras ficaram turvas, prejudicando as leituras nos espectros. Já os ensaios com Triton X-100 resultaram em uma resposta menos marcante, exceto para o ácido caprílico, que exibiu uma significativa alteração de coloração, com menor turbidez. A avaliação dos valores de cores, calculados por meio do histograma RGB, confirmou as variações obtidas nos ensaios. Adicionalmente, foi conduzido um estudo cinético para analisar a evolução da coloração das amostras ao longo do tempo. Os resultados deste trabalho revelam um potencial significativo para pesquisas futuras e o desenvolvimento de nanossensores destinados à detecção do teor de gordura no leite bovino.

Palavras-chave: gordura láctea; RGB; espectroscopia; nanopartícula de ouro; 10,12-ácido pentacosadínico.

ABSTRACT

The composition of milk, especially the fat content, plays an essential role in the final quality of products, as well as significantly influencing prices for producers. Milk fats, composed of fatty acids, are responsible for the rheological and organoleptic characteristics of milk and its by-products. This project proposed two colorimetric nanosensors involving the interaction of gold nanoparticles and 10,12-pentacosadinoic acid with aqueous solutions of fatty acids characteristic of milk. The tests were conducted using palmitic acid, oleic acid and caprylic acid, using two different solvents: isopropyl alcohol and Triton X-100. The technique was validated using UV-Vis spectroscopy and RGB color analysis, showing the ability to modify the color of the samples as the concentration of fatty acid increased. Although the tests with isopropyl alcohol showed a marked colorimetric response, the samples became cloudy, impairing the spectra readings. The tests with Triton X-100 resulted in a less marked response, except for caprylic acid, which showed a significant change in color, with less turbidity. Evaluation of the color values, calculated using the RGB histogram, confirmed the variations obtained in the tests. In addition, a kinetic study was conducted to analyze the evolution of the coloration of the samples over time. The results of this work reveal significant potential for future research and the development of nanosensors for detecting the fat content of bovine milk.

Keywords: milk fat; RGB; spectroscopy; gold nanoparticle; 10,12-pentacosadinoic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de leite sob inspeção no Brasil no período de 2019 a 2022.	20
Figura 2. Ilustração dos principais fatores que influenciam a qualidade e composição do leite.	22
Figura 3. Ilustração da liberação do glóbulo de gordura láctea e composição da membrana do glóbulo de gordura láctea.	24
Figura 4. Estrutura química do ácido palmítico.	27
Figura 5. Estrutura química do ácido oleico.	28
Figura 6. Estrutura química do ácido caprílico.	28
Figura 7. Ilustração de Butirômetro para método de Gerber.	29
Figura 8. Papel da nanotecnologia na ciência de alimentos.	34
Figura 9. Nanosensores e suas diferentes categorias.	37
Figura 10. Esquema do princípio da colorimetria.	37
Figura 11. Esquema da formação de nanopartículas de ouro. (a) Método de Turkevich com redução por citrato de sódio. (b) Redução por borohidreto de sódio com cobertura de brometo de cetiltrimetil amônio.	40
Figura 12. Esquema da auto-organização de monômeros de PCDA e a formação de vesículas após a irradiação UV.	43
Figura 13. Disposição da placa de 96 poços usada no ensaio AuNP/IPA para leitura no espectrofotômetro UV-Vis.	52
Figura 14. Disposição da placa de 96 poços usada no ensaio AuNP/TX-100 para leitura no espectrofotômetro UV-Vis.	52
Figura 15. Espectro UV-Vis das nanopartículas de ouro mediada por citrato de sódio e por redução de NaBH ₄ com CTAB.	54
Figura 16. Ensaio colorimétrico da interação de nanopartículas de ouro e álcool isopropílico com ácido palmítico. (I) Ensaio padrão, com a presença de ácido palmítico em diferentes concentrações: (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (II) Ensaio controle – sem a presença de ácido palmítico, com diferentes concentrações de ácido ascórbico: (a) Amostra 1: $2,93 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $4,06 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $5,03 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (d) Amostra 4: $5,87 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (e) Amostra 5: $6,61 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (f) amostra 6: $7,25 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$	55
Figura 17. Ensaio colorimétrico da interação de nanopartículas de ouro e álcool isopropílico na presença, em diferentes concentrações, de ácido oleico: (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$	56
Figura 18. Ensaio colorimétrico da interação entre AuNPs e TX-100 na presença de ácido palmítico, em diferentes concentrações: (AP ₁ : $9,020 \cdot 10^{-3}$, AP ₂ : $11,275 \cdot 10^{-3}$, AP ₃ : $13,530 \cdot 10^{-3}$, AP ₄ : $15,785 \cdot 10^{-3}$, AP ₅ : $18,040 \cdot 10^{-3}$, AP ₆ : $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AP ₇ : $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL ⁻¹	57
Figura 19. Ensaio colorimétrico da interação entre AuNPs e TX-100 na presença de ácido oleico, em diferentes concentrações: (AO ₁ : $9,020 \cdot 10^{-3}$, AO ₂ : $11,275 \cdot 10^{-3}$, AO ₃ : $13,530 \cdot 10^{-3}$, AO ₄ : $15,785 \cdot 10^{-3}$, AO ₅ : $18,040 \cdot 10^{-3}$, AO ₆ : $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AO ₇ : $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL ⁻¹	57
Figura 20. Ensaio colorimétrico da interação entre AuNPs e TX-100 na presença de ácido caprílico, em diferentes concentrações: (AC ₁ : $9,020 \cdot 10^{-3}$, AC ₂ : $11,275 \cdot 10^{-3}$, AC ₃ : $13,530 \cdot 10^{-3}$, AC ₄ : $15,785 \cdot 10^{-3}$, AC ₅ : $18,040 \cdot 10^{-3}$, AC ₆ : $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AC ₇ : $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL ⁻¹	58
Figura 21. Ensaio colorimétrico da interação entre AuNPs e TX-100 na presença de ácido palmítico (50 %), ácido oleico (45 %) e ácido caprílico (0,05 %), com concentração total de ácido graxo: (TAG ₁ : $9,020 \cdot 10^{-3}$, TAG ₂ : $11,275 \cdot 10^{-3}$, TAG ₃ : $13,530 \cdot 10^{-3}$, TAG ₄ : $15,785 \cdot 10^{-3}$, TAG ₅ : $18,040 \cdot 10^{-3}$, TAG ₆ : $36,080 \cdot 10^{-3}$ e TAG ₇ : $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL ⁻¹	58

Figura 22. Espectros UV-Vis dos ensaios colorimétricos padrão e de controle do ensaio contendo álcool isopropílico e diferentes concentrações de ácido palmítico. (a) Interação de AuNPs com ácido palmítico e ácido ascórbico. (b) Interação entre AuNPs com ácido ascórbico.	59
Figura 23. Espectros UV-Vis da interação de AuNPs com diferentes concentrações de ácido palmítico em escalas de absorvância distintas (AuNP/IPA/AP). (a) Absorvância de -0,25 a 1. (b) Absorvância de -0,125 a 0,225.	59
Figura 24. Espectros de absorção UV-Vis da interação entre AuNPs e diferentes concentrações de ácido oleico.	60
Figura 25. Espectro de absorção UV-Vis do ensaio contendo AuNps e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (AP ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AP ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AP ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AP ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AP ₅ : 18,040·10 ⁻³ , AP ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AP ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹ . (a) Absorvância de 0,0 a 2,0. (b) Absorvância de 0,0 a 1,0.	62
Figura 26. Espectro de absorção UV-VIs do ensaio contendo AuNps e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido oleico (AO ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AO ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AO ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AO ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AO ₅ : 18,040·10 ⁻³ , AO ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AO ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	62
Figura 27. Espectro de absorção UV-Vis do ensaio contendo AuNps e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico (AC ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AC ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AC ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AC ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AC ₅ : 18,040·10 ⁻³ , AC ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AC ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹ . (a) Absorvância de 0,0 a 2,0. (b) Absorvância de 0,0 a 0,8.....	63
Figura 28. Espectro de absorção UV-Vis do ensaio contendo AuNps e TX-100 na presença de diferentes concentrações do conjunto dos ácidos graxos: ácido palmítico, ácido oleico e ácido caprílico. (TAG ₁ : 9,020·10 ⁻³ , TAG ₂ : 11,275·10 ⁻³ , TAG ₃ : 13,530·10 ⁻³ , TAG ₄ : 15,785·10 ⁻³ , TAG ₅ 18,040·10 ⁻³ , TAG ₆ : 36,080·10 ⁻³ e TAG ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	63
Figura 29. Histograma RGB do ensaio colorimétrico controle utilizando diferentes concentrações de ácido palmítico (AuNP/IPA/AP): (a) Amostra 1: 3,85 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (b) Amostra 2: 5,33 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (c) Amostra 3: 6,60 10 ⁻³ g mL ⁻¹ ; (d) Amostra 4: 7,70 10 ⁻³ g mL ⁻¹ ; (e) Amostra 5: 8,66 10 ⁻³ g mL ⁻¹ ; (f) Amostra 6: 9,51 10 ⁻³ g mL ⁻¹	64
Figura 30. Histograma RGB do ensaio colorimétrico utilizando diferentes concentrações de ácido oleico (AuNP/IPA/AO): (a) Amostra 1: 3,85 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (b) Amostra 2: 5,33 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (c) Amostra 3: 6,60 10 ⁻³ g mL ⁻¹ ; (d) Amostra 4: 7,70 10 ⁻³ g mL ⁻¹ ; (e) Amostra 5: 8,66 10 ⁻³ g mL ⁻¹ ; (f) Amostra 6: 9,51 10 ⁻³ g mL ⁻¹	65
Figura 31. Histograma RGB do ensaio colorimétrico (AuNP/TX-10/AP) entre AuNPs e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (AP ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AP ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AP ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AP ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AP ₅ : 18,040·10 ⁻³ , AP ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AP ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	66
Figura 32. Histograma RGB do ensaio colorimétrico (AuNP/TX-100/AO) entre AuNPs e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido oleico (AO ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AO ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AO ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AO ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AO ₅ : 18,040·10 ⁻³ , AO ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AO ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	67
Figura 33. Histograma RGB do ensaio colorimétrico (AuNP/TX-100/AC) entre AuNPs e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico (AC ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AC ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AC ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AC ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AC ₅ :18,040·10 ⁻³ , AC ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AC ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	68
Figura 34. Histograma RGB do ensaio colorimétrico (AuNP/TX-100/TAG) entre AuNPs e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico (TAG ₁ : 9,020·10 ⁻³ , TAG ₂ : 11,275·10 ⁻³ , TAG ₃ : 13,530·10 ⁻³ , TAG ₄ : 15,785·10 ⁻³ , TAG ₅ : 18,040·10 ⁻³ , TAG ₆ : 36,080·10 ⁻³ e TAG ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	69

Figura 35. Valor de cor (CV) do vermelho (RED) e azul (BLUE) e equações das retas para os ensaios colorimétrico utilizando AuNPs/IPA na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (a) e ácido oleico (b).	72
Figura 36. Valor de cor (CV) do vermelho (RED) e azul (BLUE) e equações das retas para os ensaios colorimétrico utilizando AuNPs/TX-100 na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico, (b) ácido oleico, (c) ácido caprílico e (d) três ácidos em conjunto.	73
Figura 37. Cinética das cores da interação entre AuNPs/TX-100 ao longo de 48 horas na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico, (b) ácido oleico, (c) ácido caprílico e (d) três ácidos em conjunto.	74
Figura 38. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre AuNPs/TX-100 na presença de ácido palmítico durante 48 horas. ((a) AP ₁ : 9,020·10 ⁻³ ; (b) AP ₂ : 11,275·10 ⁻³ ; (c) AP ₃ : 13,530·10 ⁻³ ; (d) AP ₄ : 15,785·10 ⁻³ ; (e) AP ₅ : 18,040·10 ⁻³ ; (f) AP ₆ : 36,080·10 ⁻³ ; (g) AP ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	76
Figura 39. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre AuNPs/TX-100 na presença de ácido oleico durante 48 horas. ((a) AO ₁ : 9,020·10 ⁻³ ; (b) AO ₂ : 11,275·10 ⁻³ ; (c) AO ₃ : 13,530·10 ⁻³ ; (d) AO ₄ : 15,785·10 ⁻³ ; (e) AO ₅ : 18,040·10 ⁻³ ; (f) AO ₆ : 36,080·10 ⁻³ ; (g) AO ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	77
Figura 40. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre AuNPs/TX-100 na presença de ácido oleico durante 48 horas. ((a) AC ₁ : 9,020·10 ⁻³ ; (b) AC ₂ : 11,275·10 ⁻³ ; (c) AC ₃ : 13,530·10 ⁻³ ; (d) AC ₄ : 15,785·10 ⁻³ ; (e) AC ₅ : 18,040·10 ⁻³ ; (f) AC ₆ : 36,080·10 ⁻³ ; (g) AC ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	78
Figura 41. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre AuNPs/TX-100 na presença de ácidos graxos (TAG) durante 48 horas. ((a) TAG ₁ : 9,020·10 ⁻³ ; (b) TAG ₂ : 11,275·10 ⁻³ ; (c) TAG ₃ : 13,530·10 ⁻³ ; (d) TAG ₄ : 15,785·10 ⁻³ ; (e) TAG ₅ : 18,040·10 ⁻³ ; (f) TAG ₆ : 36,080·10 ⁻³ ; (g) TAG ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	79
Figura 42. Disposição da placa de 96 poços usada no ensaio PCDA/IPA para leitura no espectrofotômetro.....	87
Figura 43. Disposição da placa de 96 poços usada no ensaio PCDA/TX-100 para leitura no espectrofotômetro.....	87
Figura 44. Perfil espectral de absorção das nanopartículas de PCDA/L64 obtida no UV-Vis.	89
Figura 45. Ensaio colorimétrico da interação entre a vesícula de PCDA com o ácido palmítico em diferentes concentrações: (a) Amostra 1: 3,85 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (b) Amostra 2: 5,33 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (c) Amostra 3: 6,60 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (d) Amostra 4: 7,70 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (e) Amostra 5: 8,66 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (f) Amostra 6: 9,51 10 ⁻³ g mL ⁻¹	90
Figura 46. Ensaio colorimétrico da interação entre a vesícula de PCDA com o ácido oleico em diferentes concentrações: (a) Amostra 1: 3,85 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (b) Amostra 2: 5,33 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (c) Amostra 3: 6,60 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (d) Amostra 4: 7,70 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (e) Amostra 5: 8,66 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (f) Amostra 6: 9,51 10 ⁻³ g mL ⁻¹	90
Figura 47. Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácido palmítico em diferentes concentrações: (AP ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AP ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AP ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AP ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AP ₅ :18,040·10 ⁻³ , AP ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AP ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	91
Figura 48. Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácido oleico em diferentes concentrações: (AO ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AO ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AO ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AO ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AO ₅ :18,040·10 ⁻³ , AO ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AO ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	91
Figura 49. Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácido caprílico em diferentes concentrações: (AC ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AC ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AC ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AC ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AC ₅ :18,040·10 ⁻³ , AC ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AC ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	92
Figura 50. Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácidos graxos em conjunto em diferentes concentrações: (TAG ₁ : 9,020·10 ⁻³ , TAG ₂ : 11,275·10 ⁻³ ,	

TAG ₃ : 13,530·10 ⁻³ , TAG ₄ : 15,785·10 ⁻³ , TAG ₅ :18,040·10 ⁻³ , TAG ₆ : 36,080·10 ⁻³ e TAG ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	92
Figura 51. Espectros de absorção UV-Vis da interação entre a vesícula de PCDA/IPA e diferentes concentrações de ácido palmítico, em escalas distintas, sendo elas: (a) W:400-700 e A:0,0-0,5; (b) W:450-600 e A:0,0-0,4; (c) W:600-100 e A:0,0-0,2.	93
Figura 52. Espectros de absorção UV-Vis da interação entre a vesícula de PCDA/IPA e o ácido oleico em diferentes concentrações.....	94
Figura 53. Espectro de absorção UV-VIs da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (AP ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AP ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AP ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AP ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AP ₅ : 18,040·10 ⁻³ , AP ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AP ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹ . (a) Absorbância de 0,0 a 1,0 e (b) Absorbância de 0,0 a 0,6.	95
Figura 54. Espectro de absorção UV-VIs da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido oleico (AO ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AO ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AO ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AO ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AO ₅ : 18,040·10 ⁻³ , AO ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AO ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹ . (a) Absorbância de 0,0 a 1,0. (b) Absorbância de 0,0 a 0,6;.....	95
Figura 55. Espectro de absorção UV-VIs da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico (AC ₁ : 9,020·10 ⁻³ , AC ₂ : 11,275·10 ⁻³ , AC ₃ : 13,530·10 ⁻³ , AC ₄ : 15,785·10 ⁻³ , AC ₅ : 18,040·10 ⁻³ , AC ₆ : 36,080·10 ⁻³ e AC ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹ . (a) Absorbância de 0,0 a 1,0. (b) Absorbância de 0,0 a 0,6;.....	96
Figura 56. Espectro de absorção UV-VIs da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações dos três ácidos em conjunto (TAG ₁ : 9,020·10 ⁻³ , TAG ₂ : 11,275·10 ⁻³ , TAG ₃ : 13,530·10 ⁻³ , TAG ₄ : 15,785·10 ⁻³ , TAG ₅ : 18,040·10 ⁻³ , TAG ₆ : 36,080·10 ⁻³ e TAG ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹ . (a) Absorbância de 0,0 a 1,0. (b) Absorbância de 0,0 a 0,6;	97
Figura 57. Histograma RGB do ensaio colorimétrico PCDA/IPA utilizando diferentes concentrações de ácido palmítico: (a) Amostra 1: 3,85 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (b) Amostra 2: 5,33 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (c) Amostra 3: 6,60 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (d) Amostra 4: 7,70 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (e) Amostra 5: 8,66 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (f) Amostra 6: 9,51 10 ⁻³ g mL ⁻¹	97
Figura 58. Histograma RGB do ensaio colorimétrico PCDA/IPA utilizando diferentes concentrações de ácido oleico: (a) Amostra 1: 3,85 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (b) Amostra 2: 5,33 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (c) Amostra 3: 6,60 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (d) Amostra 4: 7,70 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (e) Amostra 5: 8,66 10 ⁻³ g mL ⁻¹ , (f) Amostra 6: 9,51 10 ⁻³ g mL ⁻¹	98
Figura 59. Histograma RGB de PCDA pura e da interação PCDA/TX-100.	99
Figura 60. Histograma RGB do ensaio colorimétrico entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico ((a) AP ₁ : 9,020·10 ⁻³ , (b) AP ₂ : 11,275·10 ⁻³ , (c) AP ₃ :13,530·10 ⁻³ , (d) AP ₄ : 15,785·10 ⁻³ , (e) AP ₅ :18,040·10 ⁻³ , (f) AP ₆ : 36,080·10 ⁻³ e (g) AP ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	100
Figura 61. Histograma RGB do ensaio colorimétrico entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido oleico ((a) AO ₁ : 9,020·10 ⁻³ , (b) AO ₂ : 11,275·10 ⁻³ , (c) AO ₃ :13,530·10 ⁻³ , (d) AO ₄ : 15,785·10 ⁻³ , (e) AO ₅ :18,040·10 ⁻³ , (f) AO ₆ : 36,080·10 ⁻³ e (g) AO ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	100
Figura 62. Histograma RGB do ensaio colorimétrico entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico ((a) AC ₁ : 9,020·10 ⁻³ , (b) AC ₂ : 11,275·10 ⁻³ , (c) AC ₃ :13,530·10 ⁻³ , (d) AC ₄ : 15,785·10 ⁻³ , (e) AC ₅ :18,040·10 ⁻³ , (f) AC ₆ : 36,080·10 ⁻³ e (g) AC ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	101
Figura 63. Histograma RGB do ensaio colorimétrico entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácidos graxos ((a) TAG ₁ : 9,020·10 ⁻³ , (b) TAG ₂ : 11,275·10 ⁻³ , (c) TAG ₃ :13,530·10 ⁻³ , (d) TAG ₄ : 15,785·10 ⁻³ , (e) TAG ₅ :18,040·10 ⁻³ , (f) TAG ₆ : 36,080·10 ⁻³ e (g) TAG ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	102

Figura 64. Valor de cor (CV) do vermelho e azul para o ensaio colorimétrico utilizando PCDA/IPA na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico e (b) ácido oleico.	105
Figura 65. Valor de cor (CV) do vermelho e azul para o ensaio colorimétrico utilizando PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico, (b) ácido oleico, (c) ácido caprílico e (d) três ácidos graxos em conjunto.....	106
Figura 66. Cinética das cores da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico, (b) ácido oleico, (c) ácido caprílico e (d) três ácidos em conjunto.....	108
Figura 67. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácido palmítico durante 48 horas. ((a) AP ₁ : 9,020·10 ⁻³ ; (b) AP ₂ : 11,275·10 ⁻³ ; (c) AP ₃ : 13,530·10 ⁻³ ; (d) AP ₄ : 15,785·10 ⁻³ ; (e) AP ₅ 18,040·10 ⁻³ ; (f) AP ₆ : 36,080·10 ⁻³ ; (g) AP ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	110
Figura 68. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácido oleico durante 48 horas. ((a) AO ₁ : 9,020·10 ⁻³ ; (b) AO ₂ : 11,275·10 ⁻³ ; (c) AO ₃ : 13,530·10 ⁻³ ; (d) AO ₄ : 15,785·10 ⁻³ ; (e) AO ₅ 18,040·10 ⁻³ ; (f) AO ₆ : 36,080·10 ⁻³ ; (g) AO ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	111
Figura 69. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácido caprílico durante 48 horas. ((a) AC ₁ : 9,020·10 ⁻³ ; (b) AC ₂ : 11,275·10 ⁻³ ; (c) AC ₃ : 13,530·10 ⁻³ ; (d) AC ₄ : 15,785·10 ⁻³ ; (e) AC ₅ 18,040·10 ⁻³ ; (f) AO ₆ : 36,080·10 ⁻³ ; (g) AO ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	112
Figura 70. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácidos graxos durante 48 horas. ((a) TAG ₁ : 9,020·10 ⁻³ ; (b) TAG ₂ : 11,275·10 ⁻³ ; (c) TAG 3: 13,530·10 ⁻³ ; (d) TAG 4: 15,785·10 ⁻³ ; (e) TAG 5 18,040·10 ⁻³ ; (f) TAG ₆ : 36,080·10 ⁻³ ; (g) TAG ₇ : 72,160·10 ⁻³) g mL ⁻¹	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do leite bovino.....	21
Tabela 2. Composição dos principais ácidos graxos presentes no leite bovino.....	26
Tabela 3. Aplicações da nanotecnologia na indústria de laticínios.....	35
Tabela 4. Utilização de nanossensores colorimétricos na indústria de alimentos.....	39
Tabela 5. Sensores colorimétricos utilizando AuNPs a partir do método de Turkevich em diferentes aplicações.	41
Tabela 6. Nanossensores colorimétricos de vesículas de PCDA funcionalizadas em diferentes aplicações.	44
Tabela 7. Ensaio colorimétrico com álcool isopropílico.....	49
Tabela 8. Ensaio colorimétrico com Triton X-100	50
Tabela 9. Tamanho, potencial Zeta e índice de polidispersão das AuNPs sintetizadas por duas diferentes vias.	53
Tabela 10. Valores de RGB e CV para ensaio AuNP/IPA na presença de ácido palmítico (AP) e ácido oleico (AO) em diferentes concentrações.....	70
Tabela 11. Valores de RGB e CV para ensaio AuNP/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácidos graxos.	71
Tabela 12. Ensaio colorimétrico entre PCDA e diferentes concentrações de ácidos graxos na presença de álcool isopropílico.....	85
Tabela 13. Ensaio colorimétrico entre PCDA e diferentes concentrações de ácidos graxos na presença de Triton X-100.....	86
Tabela 14. Valores de RGB e CV para ensaio AuNP/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (AP) e ácido oleico (AO).	103
Tabela 15. Valores de RGB e CV para ensaio AuNP/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácidos graxos.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
AP/C:16 - Ácido palmítico
AO/C:18 - Ácido oleico
AC/C:8 - Ácido caprílico
NPM - Nanopartícula metálica
AuNP - Nanopartícula de ouro
PDA - Poliacetileno
PCDA - Ácido 10,12-pentacosadinóico
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
AGL - Ácidos graxos livres
PMC - Proteínas micelares de caseína
PMGGL - Proteínas associadas à membrana do glóbulo de gordura do leite
TAG - Triglicerídeos
AG - Ácidos graxos
sn - numeração estereoespecífica
GGL - Glóbulos de gordura láctea
MGGL - Membrana do glóbulo de gordura láctea
AGS - Ácido graxos saturados
AGMI - Ácido graxos monoinsaturados
AGPI - Ácido graxos poli-insaturados
LED - Diodos emissores de luz
CG - Cromatografia gasosa
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
MIR - Espectroscopia de infravermelho médio
NIR - Espectroscopia de infravermelho próximo
CTAB - Brometo de cetiltrimetil amônio
AuNR - Nanobastões de ouro
CuNP - Nanopartícula de cobre
AgNP - Nanopartícula de prata
MnOX - Nano-óxido de manganês
GQG - Pontos quânticos de grafeno
nHAp - Nanohidroxiapatita
STR - Estreptomicina
HAuCl₄ - Ácido tetracloroáurico
TX-100 - Triton X-100
NaNH₄ - Borohidreto de sódio
PDI - Índice de polidispersão
AuNP/IPA - Ensaio colorimétrico baseado em nanopartículas de ouro na presença de álcool isopropílico
AuNP/TX-100 - Ensaio colorimétrico baseado em nanopartículas de ouro na presença de Triton X-100
RGB - *Red, green e blue*
CV - Valor de cor
PVDF - Polifluoreto de vinilideno
RPSL - ressonância de plasmon de superfície localizada
TAG - Ensaio contendo ácido palmítico, ácido caprílico e ácido oleico.
CT- Copolímero tribloco

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	8
Lista de tabelas.....	13
Lista de abreviaturas e símbolos.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 GERAL.....	19
2.2 ESPECÍFICOS.....	19
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 LEITE BOVINO.....	19
3.2 LIPÍDEOS.....	23
3.2.1 ÁCIDO PALMÍTICO.....	26
3.2.2 ÁCIDO OLEICO.....	27
3.2.3 ÁCIDO CAPRÍLICO.....	28
3.3 TESTES PARA DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS NO LEITE.....	28
3.4 BIOSSENSORES COLORIMÉTRICOS.....	32
3.5 NANOTECNOLOGIA.....	33
3.5.1 NANOSENSOR COLORIMÉTRICO.....	36
3.5.1.1 Nanosensores de ouro.....	38
3.5.1.2 Nanosensores de Ácido 10,12-pentacosadinoico (PCDA).....	42
4. CAPÍTULO 1 - SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE OURO PARA DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE ÁCIDOS GRAXOS.....	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	45
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. EXPERIMENTAL.....	47
2.1 MATERIAIS.....	47
2.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	47
2.2.1 MÉTODO TURKEVICH – REDUÇÃO POR CITRATO DE SÓDIO.....	47
2.2.2 REDUÇÃO POR BOROHIDRETO DE SÓDIO COM BROMETO DE CETILTRIMETIL AMÔNIO (CTAB).....	48
2.3 CARACTERIZAÇÃO.....	48
2.4 PREPARO DAS AMOSTRAS DE ÁCIDOS GRAXOS (AG) E ENSAIO COLORIMÉTRICO.....	48
2.4.1 ISOPROPANOL.....	48
2.4.2 TRITON X-100.....	49

2.5	ANÁLISES DO ENSAIO COLORIMÉTRICO	50
2.6	ENSAIO CINÉTICO DA ALTERAÇÃO COLORIMÉTRICA	52
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.	CONCLUSÃO.....	81
5.	CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE ÁCIDOS GRAXOS UTILIZANDO VESÍCULA DE 10,12-ÁCIDO PENTACOSADINÓICO (PCDA).	82
	RESUMO	82
	ABSTRACT.....	82
	1. INTRODUÇÃO	83
	2. EXPERIMENTAL	84
	2.1 MATERIAIS	84
	2.2 SÍNTESE DE VESÍCULAS DE 10,12-ÁCIDO PENTACOSADINÓICO (PCDA) 84	
	2.3 CARACTERIZAÇÃO DA NANOESTRUTURA	84
	2.4 ENSAIO COLORIMÉTRICO	85
	2.5 ANÁLISES DO ENSAIO COLORIMÉTRICO	86
	2.6 ESTUDO CINÉTICO DAS CORES	88
	3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
	4. CONCLUSÃO.....	114
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

1. INTRODUÇÃO

O leite é um fluido biológico complexo produzido pelas glândulas mamárias de mamíferos, sendo fonte de diversos macro e micronutrientes, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento dos indivíduos (CIMMINO et al., 2023). Os seres humanos, quando bebês consomem o leite advindo da própria espécie, e quando adquirem uma certa idade, passam a consumir o biofluido de outras espécies, sendo que a produção mundial do leite é ofertada, principalmente, por cinco espécies animais, são elas: vacas (83 %), búfalas (13 %), cabras (2 %), ovelhas (1 %) e camelo (0,4 %) (FOROUTAN et al., 2019). De acordo com informações da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção mundial de leite atingiu 887 milhões de toneladas em 2020, registrando um aumento de 53% em comparação com o ano 2000. Nesse cenário, o Brasil se posicionou como o terceiro maior produtor global de leite (FAO, 2022).

A composição do leite bovino, influenciada por fatores como pasto, fazenda e características da vaca, determina a qualidade dos produtos lácteos (PRIYASHANTHA; LUNDH, 2021). O leite contém macronutrientes, como água, carboidratos, gorduras e proteínas, e micronutrientes, incluindo vitaminas e minerais (FOROUTAN et al., 2019). Em média, o leite bovino possui de 3,8 a 5,5% de lipídeos totais em sua composição (PACHECO-PAPPENHEIM et al., 2021). A gordura do leite da vaca é composta por ácidos graxos de diversos comprimentos de cadeia, e são responsáveis pelas características organolépticas, reológicas e físico-químicas encontradas no leite e nos produtos lácteos (ALOTHMAN et al., 2019). O ácido palmítico, um ácido graxo saturado de 16 carbonos, representa de 22% a 35% dos ácidos graxos totais. O ácido caprílico, também saturado com 8 carbonos, compõe de 1% a 3% do total. Por sua vez, o ácido oleico, um ácido graxo insaturado de 18 carbonos, contribui com cerca de 20% a 30% do conteúdo total de ácidos graxos no leite (DJORDJEVIC et al., 2019).

O método mais utilizado na indústria de laticínios para detectar o teor de gordura no leite bovino, é denominado de teste de Gerber, em que se baseia no princípio de destruição das micelas de gordura e a dissolução da caseína através do ácido sulfúrico e álcool isoamílico (DESAI; PANDYA, 2022a). Entretanto, é um método complexo, potencialmente tóxico para os manipuladores devido aos reagentes utilizados, e apresenta riscos de acidentes devido às altas temperaturas geradas. Além disso, os reagentes empregados no método podem causar impactos ambientais adversos (DESAI; PANDYA, 2022b). Outros métodos para detecção da

gordura láctea vêm sendo estudados, em que se utiliza de equipamentos modernos baseados em técnicas cromatográficas e de espectroscopia, no entanto, são métodos dispendiosos que necessitam de equipamentos especializados (BOGOMOLOV; MELENTEVA, 2013; GASTALDI et al., 2011; HAQUE; BUBLI; KHAN, 2021; MENDOZA et al., 2015).

Os sensores colorimétricos, amplamente utilizados devido à sua alta sensibilidade e seletividade na detecção de analitos de interesse, se baseiam no princípio da alteração visual da cor (LIU, Bin.; ZHUANG; WEI, 2020). Ao incorporar nanomateriais na fabricação desses sensores, conhecidos como nanosensores, observa-se um aprimoramento significativo de suas propriedades (TESSARO et al., 2023). Os nanomateriais, devido ao seu tamanho nanométrico, possuem a capacidade de aprimorar as propriedades do material, aproveitando uma ampla superfície de contato (SAINI et al., 2023).

Para a fabricação de nanosensores colorimétricos, as nanopartículas metálicas (NPMs) são as mais utilizadas, uma vez que, apresentam notáveis propriedades ópticas (AKSHAYA et al., 2020). As nanopartículas de ouro (AuNPs) vem sendo muito utilizada na pesquisa para detecção colorimétrica, uma vez que, a partir de suas características, principalmente o estado de agregação da molécula, é possível observar a mudança de coloração da nanoestrutura (ANH et al., 2022; ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; MADKOUR et al., 2023; ZHANG, Y. et al., 2018). Outra nanomolécula que apresenta uma notável propriedade óptica é a vesícula de poliacetileno (PDA), portanto, são muito utilizadas para produção de sensores colorimétricos (QIAN; STÄDLER, 2019). Principalmente o monômero de diacetileno, ácido 10,12-pentacosadínico (PCDA), por apresentar a mudança de coloração do azul para o vermelho quando expostos a um estímulo externo (VO et al., 2021).

Devido à relevância econômica e nutricional do leite, torna-se imprescindível realizar análises dos seus componentes de maneira sensível, segura e economicamente viável. Particularmente, para determinação do teor de lipídeos, dado seu impacto na qualidade dos subprodutos lácteos. A indústria de laticínios busca constantemente métodos de análise mais rápidos, acessíveis e ecologicamente sustentáveis. O objetivo deste estudo foi avaliar a interação colorimétrica entre diferentes ácidos graxos encontrados no leite bovino utilizando dois nanosensores colorimétricos desenvolvidos a partir de nanopartículas de ouro e vesículas de PCDA.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

O propósito desta pesquisa consistiu em investigar a interação e a modificação colorimétrica de nanopartículas de ouro e vesículas de ácido 10,12-pentacosadinoico (PCDA) em resposta a variadas concentrações de ácido palmítico, ácido oleico e ácido caprílico, por meio de análise espectrofotométrica UV-Vis e histograma RGB, com a finalidade de viabilizar o desenvolvimento de nanosensores colorimétricos destinados à avaliação do teor de gordura no leite bovino.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar a nanoestrutura de ouro por meio de espalhamento dinâmico de luz e espectrofotometria UV-Vis;
- Obter e caracterizar as vesículas de ácido 10,12-pentacosadinoico (PCDA) utilizando espalhamento dinâmico de luz e espectrofotometria UV-Vis;
- Analisar a interação colorimétrica entre os ácidos graxos de interesse na presença de duas diferentes nanoestruturas: nanopartículas de ouro e vesículas de PCDA, por meio de espectroscopia molecular UV-Vis e sistema RGB;
- Conduzir um estudo cinético da evolução da coloração nas amostras ao longo de um período de 48 horas.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

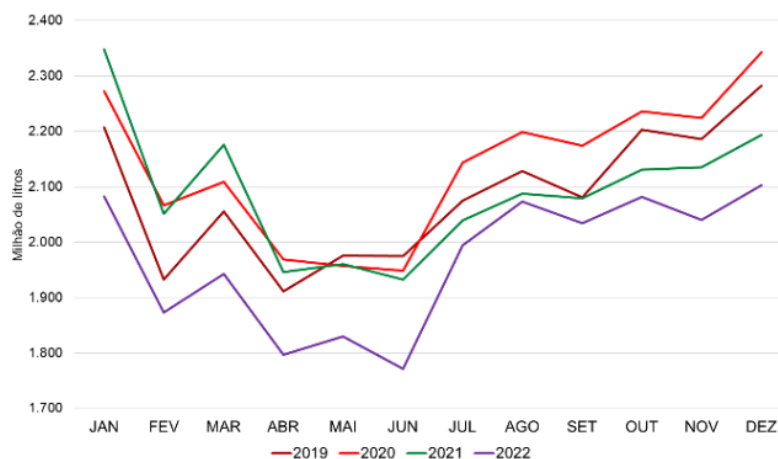
3.1 LEITE BOVINO

O leite, produzido a partir das glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos, é um alimento altamente nutritivo, fonte de carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais, que atendem as necessidades específicas dos indivíduos, tanto na função de nutrição e hidratação, como também possui um papel fundamental no estabelecimento da microflora intestinal (ALOTHMAN et al., 2019; FOROUTAN et al., 2019). Atualmente, a indústria de laticínios ocupa um importante lugar no setor agropecuário e agroindustrial, sendo o Brasil um grande protagonista em negócios agroalimentares (BEBER; LANGER; MEYER, 2021; ROZHKOVA; OLENTSOVA, 2020).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, atualmente, a produção de lácteos emprega diretamente cerca de 895 milhões de pessoas no mundo todo, representando 14% do total da população mundial (FAO, 2021). Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para o primeiro trimestre de 2022,

Figura 1, houve uma queda de 10,3% no volume de leite adquirido, quando comparado com o mesmo período de 2021, visto que os custos de produção no campo tiveram um demasiado crescimento e há um limitado investimento no setor devido à valorização do dólar e, conseqüentemente um aumento nos insumos (IBGE, 2022). Toda via, a atividade leiteira ainda representa uma das mais importantes atividades econômicas no país, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial de leite, com um volume anual de 34 bilhões de litros (MAPA, 2022).

Figura 1. Produção de leite sob inspeção no Brasil no período de 2019 a 2022.



Fonte: CONAB, 2023

O leite é composto por macronutrientes, sendo eles: água, carboidratos, gorduras e proteínas, e micronutrientes, tais como vitaminas e minerais, conforme demonstrado na Tabela 1 (FOROUTAN et al., 2019). A composição e as propriedades do leite cru são essenciais para a qualidade dos produtos lácteos que serão produzidos (PRIYASHANTHA et al., 2021). O leite cru para ser considerado de elevada qualidade deve ser livre de sabores e odores indesejáveis, não conter adulterantes, possuir baixa contagem de bactérias e células somáticas, e apresentar a composição dentro da norma (MURPHY et al., 2016). Há quatro categorias de inspeção após o recebimento do leite, são elas: i) visual, o leite deve estar em uma coloração normal e sem presença de nenhum material estranho; ii) organoléptico, envolve a aparência, sabor e cheiro; iii) químico, testes realizados em laboratório especializado para analisar as características físico-químicas do leite e, iv) microbiológica, testes para verificar a presença de microrganismos (KAILASAPATHY, 2015).

Tabela 1. Composição do leite bovino.

Componente	Concentração (%)	Referência
Macronutrientes		
Água	85 - 87	(FOROUTAN et al., 2019)
	3,8 - 5,5	(PACHECO-PAPPENHEIM et al., 2021)
Lipídio	Triglicerídeos (dos lipídeos totais)	96 - 98
	Fosfolipídios (dos lipídeos totais)	1,11
	Colesterol (dos lipídeos totais)	0,46
	1,2 Diacilglicerol (dos lipídeos totais)	2,25
	Ácidos graxos livre (AGL) (dos lipídeos totais)	0,28
	Monoacilglicerol (dos lipídeos totais)	0,08
	Éster colesterílico (dos lipídeos totais)	0,02
		2,9 - 3,5
		(FOROUTAN et al., 2019)
Proteína	Proteínas micelares de caseína (PMC) (das proteínas totais)	80 - 85
	Proteínas do soro do leite (das proteínas totais)	13 - 18
	Proteínas associadas à membrana do glóbulo de gordura do leite (PMGGL) (das proteínas totais)	1 a 2
		5
		(FOROUTAN et al., 2019)
Carboidrato	Lactose (dos carboidratos totais)	90 - 95
	Oligossacarídeo (dos carboidratos totais)	05 a 10
		(CUNHA et al., 2020)
Micronutrientes		
Vitaminas	20 - 40	(FOROUTAN et al., 2019)
Minerais	10 a 20	

Diversos fatores podem afetar a composição do leite, como a raça bovina, idade, estágio de lactação, estado de saúde, tipo de alimentação dada ao animal, estado de saúde do úbere e efeitos sazonais e regionais (Figura 2) (ALOTHMAN et al., 2019). A variação de cada

componente impacta diretamente em uma característica do leite e de seus derivados, por exemplo, a variação no teor de gordura pode afetar as propriedades organolépticas e a textura dos produtos acabados, a variação de proteína pode afetar na viscosidade e estrutura de produtos fermentados, e em alguns casos, faz-se necessário a adição de sólidos para obtenção de produtos lácteos de qualidade (KAILASAPATHY, 2015).

Figura 2. Ilustração dos principais fatores que influenciam a qualidade e composição do leite.



Adaptado de Priyashantha & Lundh, 2021

Há mais de 400 tipos diferentes de proteínas presentes no leite, e devido a suas variantes genéticas, podem assim impactar as propriedades nutricionais, bem como o caráter funcional e físico-químico do leite e de produtos lácteos. Elas estão presentes em alta concentração e podem ser agrupadas em três principais grupos: i) as proteínas de caseína micelar; ii) as proteínas de soro e leite; e iii) proteínas associadas da membrana do glóbulo de gordura do leite (BÄR et al., 2019; DANILOSKI et al., 2022).

A lactose, composta por galactose e glicose, é o principal carboidrato do leite, e é sintetizada a partir de células epiteliais mamárias sendo responsável pelo fornecimento de energia ao mamífero que o consumir. Além disso, possui grande importância tecnológica para fabricação de produtos lácteos fermentados, uma vez que a lactose serve como fonte de carbono (substrato) para as bactérias do ácido lático (GOULDING; FOX; O'MAHONY, 2019). Outro carboidrato presente no leite, além da lactose, são os oligossacarídeos, que contribuem no desenvolvimento do sistema imunológico, do cérebro e da microbiota intestinal infantil, além

de servirem como inibidores da adesão de microrganismos patogênicos nas células hospedeiras (WANG, M. et al., 2021).

O leite é responsável por fornecer de 20-40 % e 10-20 % da ingestão total de vitaminas e minerais, respectivamente, na dieta indicada pelos países ocidentais. Os principais minerais encontrados no leite são: cálcio, fósforo, potássio, zinco, magnésio e sódio, e as principais vitaminas são pertencentes à família B, C, A, D, E e K (MANONI et al., 2021).

3.2 LIPÍDEOS

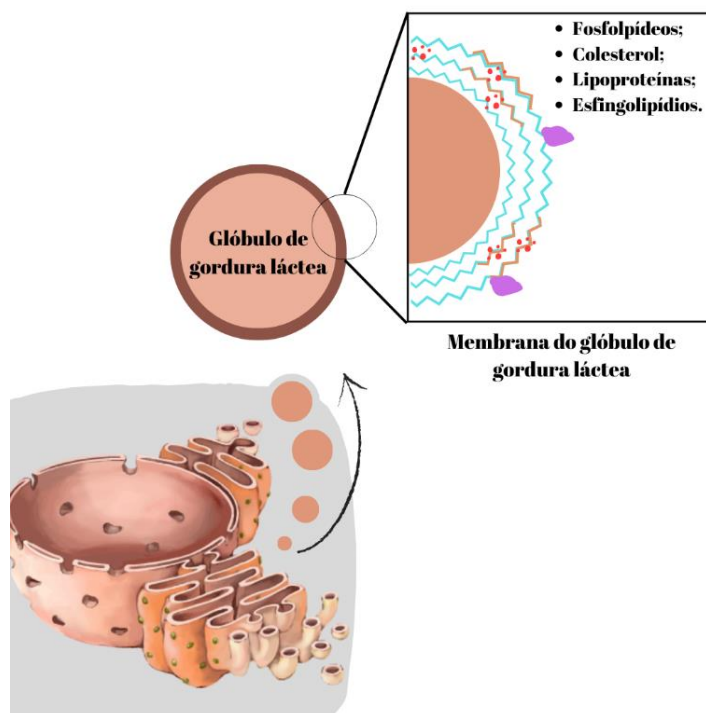
Os lipídeos totais encontrados no leite são normalmente divididos em três classe: i) lipídeos neutros; ii) lipídeos polares e iii) lipídeos diversos (GOULDING; FOX; O'MAHONY, 2019). Os triglicerídeos (TAG) representam mais de 98 % da gordura total do leite, são considerados os lipídeos neutros, possuem cerca de 400 ácidos graxos (AG) com diferentes comprimentos de cadeia e graus de saturação, fazendo com que a gordura do leite seja considerada a mais complexa de todas as gorduras naturais (PACHECO-PAPPENHEIM et al., 2021). Os lipídeos polares são compostos por uma mistura de ésteres de ácidos graxos de glicerol e possuem um importante papel no leite e nos produtos lácteos (LIU, Z. et al., 2020). Os lipídeos diversos incluem o colesterol, os carotenoides e as vitaminas lipossolúveis (GOULDING; FOX; O'MAHONY, 2019).

Os triglicerídeos são formados por três diferentes ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol localizada nas posições 1,2 ou 3 da numeração estereoespecífica (sn) e são considerados uma importante fonte de energia para os seres humanos, sua estrutura influencia diretamente as propriedades físico-químicas da gordura láctea, e conseqüentemente, a qualidade e o rendimento dos produtos lácteos (LIU, Z.; ROCHFORT; COCKS, 2018; PACHECO-PAPPENHEIM et al., 2021).

Os glóbulos de gordura láctea (GGL), possuem de 1 a 2 μm , e são formados por gotículas lipídicas compostas por um núcleo hidrofóbico, envoltos por uma membrana do glóbulo de gordura láctea (MGGL), de caráter hidrofílico, sendo essa membrana responsável por proteger, contra a aderência e a degradação enzimática (Manoni et al., 2021). A estrutura da MGGL, possui cerca de 10-20 nm de espessura, é formada por uma distinta classe de lipídeos, proteínas e enzimas, e está envolvida em diversos mecanismos interfaciais, como por exemplo a adsorção de bactérias, a capacidade de digestão dos lipídeos do leite pelas enzimas e estabilização da emulsão de gordura, evitando assim que a gordura se separe. (MACGIBBON, 2020).

Dentro da célula mamária lactante, no retículo endoplasmático, são formados glóbulos de triglicerídeos, que são liberados no citoplasma celular. Essas gotículas lipídicas se movem em direção à membrana apical, momento em que a camada interna da MGGL é obtida dentro da célula epitelial, e são secretadas das células a partir de fusão ou exocitose sobre a membrana plasmática apical, momento em que a camada externa da MGGL é obtida. Essa membrana é formada por muitos compostos bioativos diferentes, como os fosfolipídios, colesterol, lipoproteínas e esfingolipídios, como demonstrado na Figura 3 (BRINK; LÖNNERDAL, 2020; GOULDING; FOX; O'MAHONY, 2019; HAGEMAN et al., 2019). Os principais componentes da membrana do glóbulo de gordura láctea garantem a estabilidade da emulsão de óleo na água do leite, além de possuir um importante papel para a saúde humana, como: atividade anticarcinogênica e anti-inflamatória, redução do risco de doenças cardiovasculares e absorção de colesterol (MANONI et al., 2021).

Figura 3. Ilustração da liberação do glóbulo de gordura láctea e composição da membrana do glóbulo de gordura láctea.



Adaptado de Hernell et al., (2016)

A gordura é considerada um dos componentes mais importantes do leite, uma vez que é responsável por dar características de sabor desejáveis ou não ao leite e nos produtos lácteos, além de afetar significativamente as propriedades físico-químicas de seus derivados

(ALOTHMAN et al., 2019). Segundo Hageman et al., (2019), os glóbulos de gordura láctea influenciam a viscosidade do leite, bem como a estabilidade das emulsões, as propriedades reológicas e organolépticas dos produtos lácteos e a capacidade de cremação do leite. Os lipídios podem ser oxidados e, assim, tornarem o leite e os seus derivados com características organolépticas de ranço. Para desacelerar essa reação, recomenda-se reduzir a agitação excessiva (formação de espuma), mistura de leite homogeneizado com leite cru, reaquecimento do leite previamente resfriado e congelamento do leite (KAILASAPATHY, 2015).

Os produtos que utilizam gordura do leite podem ser divididos, de acordo com seu conteúdo lipídico, em diversas categorias, como por exemplo: manteiga, creme, pastas, anidra e manteiga (LEE et al., 2018). Na indústria láctea, a gordura do leite bovino é utilizada como gordura anidra do leite eliminando a água e os sólidos não gordurosos, neste processo a gordura em forma de emulsão é separada por centrifugação a fim de se obter um creme, e em seguida, é submetida à pressão para quebra dos glóbulos de gordura, por fim, a gordura passa por um secador à vácuo (VIRIATO et al., 2020). A gordura anidra do leite tem sido muito utilizada para produção de diferentes produtos alimentícios, como sorvete, chocolate, massa folhada, entre outros. (VIRIATO et al., 2020; WOODHOUSE; KELTON, 2023).

Dentro do glóbulo de gordura láctea estão presentes os ácidos graxos em diferentes comprimentos de cadeia, sendo cerca de 50 a 70 % de cadeia longa ($C \geq 16$) e 30 a 50 % de cadeia média ($10 \leq C \leq 14$) e curta ($4 \leq C \leq 8$); e grau de saturação, sendo cerca de 70 % de ácido graxos saturados (AGS), 25 % monoinsaturados (AGMI) e 5 % poli-insaturados (AGPI) (ALOTHMAN et al., 2019; TIPLADY et al., 2022). A cadeia longa de ácido graxo é normalmente derivada de fontes de alimentação animal, chegando ao leite a partir da corrente sanguínea, já a cadeia curta e a média são produzidas nas glândulas mamárias (ALOTHMAN et al., 2019).

A gordura do leite bovino possui uma grande variedade de ácido graxos, como demonstrado na Tabela 2, resultando em diversas estruturas de triglicerídeos, normalmente os ácidos graxos de cadeia curta são esterificados na posição sn-3, os AG de cadeia média são esterificados na posição sn-2, e os AG de cadeia longa nas posições: sn-1,2 e sn-1,3 (HAGEMAN et al., 2019; VIRIATO et al., 2020). Os ácidos graxos saturados representam aproximadamente 70 % do peso total de AG's totais, enquanto os monoinsaturados e os poliinsaturados, representam cerca de 25 % e 2,3 %, respectivamente (LINDMARK MÅNSSON, 2008).

Tabela 2. Composição dos principais ácidos graxos presentes no leite bovino.

Ácido graxo	Estrutura	Teor (% dos AG totais)	Classificação
Ácido butírico	C4:0	2 a 5	AGS
Ácido caproico	C6:0	1 a 5	AGS
Ácido caprílico	C8:0	1 a 3	AGS
Ácido cáprico	C10:0	2 a 4	AGS
Ácido láurico	C12:0	2 a 5	AGS
Ácido mirístico	C14:0	8 a 14	AGS
Ácido pentadecanoico	C15:0	1 a 2	AGS
Ácido palmítico	C16:0	22 a 35	AGS
Ácido palmitoleico	C16:1	1 a 3	AGMI
Ácido margárico	C17:0	0,5 a 1,5	AGS
Ácido esteárico	C18:0	9 a 14	AGS
Ácido oleico	C18:1	20 a 30	AGMI
Ácido linoleico	C18:2	1 a 3	AGPI
Ácido α -linolênico	C18:3	0,5 a 2	AGPI

(DJORDJEVIC et al., 2019; LINDMARK MÅNSSON, 2008)

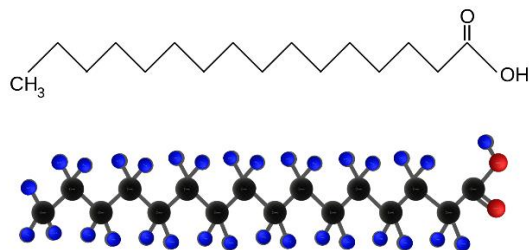
Em termos de saúde humana, diversos benefícios são promovidos pelos ácidos graxos, como sua atividade antimicrobiana, anticancerígena e anti-inflamatória. O consumo de ácidos graxos insaturados, por exemplo, é capaz de desenvolver o sistema nervoso e prevenir inflamações (ALOTHMAN et al., 2019; DJORDJEVIC et al., 2019). A concentração dos ácidos graxos também são responsáveis por manter a qualidade do leite, visto que, em concentrações maiores do que 1.2 mmol por cada 100 g de leite pode causar um sabor desagradável, ranço, baixa capacidade de formação de espuma e afetar a coagulação do queijo (WIKING et al., 2019; WOODHOUSE; KELTON, 2023). Portanto, é necessário uma quantificação precisa de ácidos graxos no leite para o controle de qualidade e segurança do leite cru, como também para estudos nutricionais.

3.2.1 ÁCIDO PALMÍTICO

O ácido palmítico (AP), Figura 4, é um ácido graxo saturado de 16 carbonos (C16:0), com um ponto de fusão de 62,8° C, pKa de 4,78 densidade de 0,853 g mL⁻¹ e insolúvel em água,

são normalmente encontrados em gordura vegetal e animal (THE MERCK INDEX, 1996; INNIS, 2016). Possui propriedades excelentes, como estabilidade química, adequado ponto de fusão e capacidade alta de armazenamento de calor latente e energia (YANG, W.; KIM, 2023). Portanto, podem ser utilizados como: material de mudança de fase, formulações cosméticas, palmitatos metálicos, produção de sabões etc. (CALVO; COLLADO; CEPEDA, 2009).

Figura 4. Estrutura química do ácido palmítico.



Adaptado de Palomer et al., (2018)

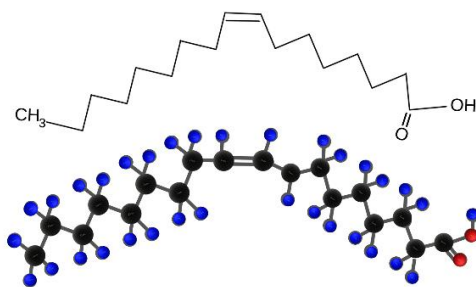
O AP possui funções essenciais na palmitoilação de proteínas e em moléculas sinalizadoras palmitoiladas, portanto, é um importante componente dos lipídios e combustível metabólico (AGOSTONI; MORENO; SHAMIR, 2016). No leite bovino, normalmente, o ácido palmítico é fornecido na posição sn-2 do triacilglicerol, o que permite uma maior estabilidade e baixo peso molecular, portanto, não sofrem dessaturação ou alongamento de cadeia e são metabolizados e absorvidos rapidamente (VIRIATO et al., 2020).

Calvo et al., (2009) analisaram a solubilidade do AP em etanol, 2-propanol, acetona, heptano, hexano e tricloroetileno, sendo este último, o solvente que apresentou mais solubilidade. Estudos exploraram a solubilização do AP em dióxido de carbono (CO₂) supercrítico e obtiveram resultados satisfatórios (BRANDT et al., 2010; GARLAPATI; MADRAS, 2010; IWAI et al., 2004).

3.2.2 ÁCIDO OLEICO

O ácido oleico (AO), Figura 5, é um ácido graxo insaturado com 18 carbonos, encontrado em maior concentração no leite bovino, possui um pK_a de 9,85, densidade de 0,85 g cm³ e um ponto de fusão a 16,3 C° (HAUG; HØSTMARK; HARSTAD, 2007; KANICKY; SHAH, 2002). Os ácido graxos insaturados tem como função no organismo de regular os lipídeos do sangue e as funções imunitárias, além de eliminar os coágulos sanguíneos, ajudando na prevenção de doenças isquêmicas do coração (HE, H. et al., 2020; KARACOR; CAM, 2015).

Figura 5. Estrutura química do ácido oleico.



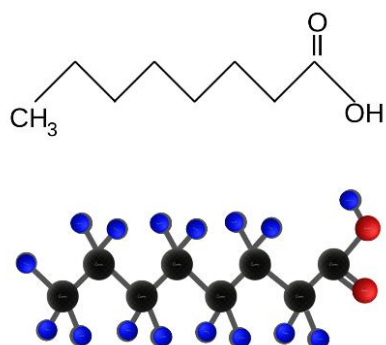
Adaptado de (FONTANA; SPOLAORE; POLVERINO DE LAURETO, 2013)

3.2.3 ÁCIDO CAPRÍLICO

O ácido caprílico (AC), Figura 6, também denominado ácido octanóico, é um tipo de ácido graxo saturado de cadeia média, composto por oito átomos de carbono, encontrado naturalmente no leite de mamíferos, no óleo de palma e no óleo de coco (JENSEN et al., 1990). É um líquido oleoso com baixa solubilidade em água (0,818 g por L a 18,8 °C), com um pKa de 4,89 e um pH baixo de 4,89 (CONSTABLE; TEGUL, 1946; VIEGAS et al., 1998).

Apresentando características físicas e metabólicas únicas em comparação com os ácidos graxos saturados de cadeia longa, esses ácidos de cadeia média destacam-se pela sua rápida quebra e absorção no trato gastrointestinal (BACH; BABAYAN, 1982). Além disso, eles podem apresentar atividades antivirais e retardar o crescimento de tumores (THORMAR et al., 1994).

Figura 6. Estrutura química do ácido caprílico



Adaptado de Altinoz et al., (2020)

3.3 TESTES PARA DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS NO LEITE

Os métodos de extração de gordura do leite que foram amplamente utilizados e posteriormente padronizados são os desenvolvidos por Gerber, Babcock e Rose-Gottlieb (STEFANOV; VLAEMINCK; FIEVEZ, 2010). O ensaio Gerber é amplamente empregado na

indústria alimentícia para quantificar o conteúdo de gordura. Sua popularidade decorre da sua abordagem descomplicada, rápida e economicamente viável. Embora tenha sido predominantemente aplicado em produtos lácteos, esse método também é passível de utilização em produtos cárneos (DESAI; PANDYA, 2022a; GURD et al., 2020). Para realizar o teste, uma pequena porção do produto é introduzida em um dispositivo conhecido como butirômetro, representado na Figura 7, que contém ácido sulfúrico. Em seguida, é adicionado álcool isoamílico e ocorre a homogeneização cuidadosa da mistura para desencadear a liberação da gordura. A separação da gordura é alcançada por meio da centrifugação, seguida pela leitura na escala volumétrica do butirômetro para determinar a porcentagem de gordura presente na amostra. (DESAI; PANDYA, 2022b; KLEYN et al., 2001).

Figura 7. Ilustração de Butirômetro para método de Gerber



Adaptado de Desai & Pandya, (2022a)

O método de Babcock, possui muita semelhança com o método de Gerber, mas apresenta menor sensibilidade, tendo como diferença a natureza da vidraria usada e na especificação do calibrador usado para medir o comprimento da coluna de gordura (BARBANO; CLARK; DUNHAM, 1988; DESAI; PANDYA, 2022b). O método de Gerber e Babcock não são considerados seguros, visto que, os operadores são expostos às altas temperaturas causadas pelo ácido sulfúrico, então é necessário pessoas treinadas e com experiência para a realização desses testes, além de também gerar danos ambientais devido aos reagentes empregados (DESAI; PANDYA, 2022b).

O método de Rose-Gottlieb é baseado na extração de gordura do leite a partir de um sistema duplo de solventes orgânicos, éter dietílico e éter de petróleo, e a adição de um álcali mineral forte com a adição do calor para a dissociação dos complexos lipídico-proteína (STEFANOV; VLAEMINCK; FIEVEZ, 2010). É um método simples, entretanto, exige uma

grande quantidade de amostra e solvente orgânico e não possui alta sensibilidade (FRAGKOULIS; SAMARTZIS; VELEGRAKIS, 2021).

Diversas técnicas analíticas foram propostas para análise de gordura do leite bovino. Kucheryavskiy et al., (2014) abordaram uma análise quantitativa simples do teor de gordura do leite cru, utilizando diodos emissores de luz (LED) como fontes de luz monocromática e imagens digitais convencionais como técnica de detecção, entretanto, o estudo apresentou resultados inferiores quando comparado com a técnica de espectroscopia. Badertscher et al., (2007) desenvolveram um método automatizado, utilizando um densitômetro preciso baseado no princípio da oscilação do tubo em U de frequência ressonante, para determinar o teor de gordura do leite e de produtos lácteos, entretanto, o custo e o tempo necessário para a aplicação da técnica se comparam com os métodos padronizados. Xin et al., (2006) se basearam na teoria de dispersão de luz a laser, a razão entre a intensidade da luz dispersa e a intensidade da luz transmitida para criação de um método que determina o teor de gordura e proteína do leite, no entanto, este método necessita de um instrumento específico e uma sensível preparação de amostras.

Alguns autores utilizaram sensores para desenvolverem técnicas de detecção dos componentes do leite. Zhu et al., (2015) utilizaram das propriedades dielétricas do leite para desenvolver um sensor rápido e portátil de gordura do leite, no entanto, a técnica apresenta limitação, visto que é necessário que a amostra esteja em uma temperatura abaixo de 37°C para a detecção esperada. Yang et al., (2020) desenvolveram um analisador de leite rápido e econômico a partir de um sensor multiespectral de 18 canais e de baixo custo para detectar o teor de gordura e proteína no leite, todavia, para a utilização da técnica é necessário que o operador tenha a tecnologia do software projetado.

Técnicas cromatográficas foram estudadas como tentativa para determinar gordura do leite. Collomb et al., (2002) determinaram a composição dos ácidos graxos da gordura do leite com o método de cromatografia gasosa (CG). Gutiérrez et al., (2009) utilizaram da CG para determinar os perfis de triacilglicerol da gordura láctea. Mendoza et al., (2015) desenvolveram um método de CG para a separação e caracterização dos diferentes ácidos graxos na gordura anidra do leite. Gastaldi et al., (2011) caracterizaram os triacilgliceróis da gordura do leite utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). No entanto, para a CG a gordura do leite é instável e pode se degradar quando aquecida para gaseificação, e a CLAE apresenta *hardware* e *software* sofisticados e reagentes dispendiosos, o que torna essa técnica economicamente inviável (XIONG et al., 2016).

Técnicas de espectroscopia também foram propostas, devido à sua rapidez, simplicidade de aplicação, caráter não destrutivo e custo operacional acessível. A espectroscopia de infravermelho médio (MIR), abrangendo a faixa de comprimento de onda de 2,5 μm a 25 μm , é um método sensível, seletivo e barato, muito utilizado por grandes laticínios e centros analíticos especializados para a detecção dos constituintes do leite, incluindo a gordura (BOGOMOLOV; MELENTEVA, 2013). Este método envolve o direcionamento e interações da luz infravermelha através da amostra de leite, gerando vibrações e alterações nas ligações moleculares, e então, resultando em absorção dos comprimentos de onda demonstrado a partir de um espectro de valores (TIPLADY et al., 2022). Diversos estudos exploram a utilização da MIR para determinar as concentrações de gordura no leite bovino (BONFATTI et al., 2016; FERRAND-CALMELS et al., 2014; LOPEZ-VILLALOBOS et al., 2014; RUTTEN et al., 2009; SOYEURT et al., 2006). Entretanto, o MIR é um método complexo, que necessita de uma intensiva preparação da amostra, limpeza e calibração do equipamento, além de uma alta tecnologia (TIPLADY et al., 2022).

A espectroscopia do infravermelho próximo (NIR), com faixa espectral de 780 a 2500 nm, é um método mais econômico que a MIR, além de apresentar maior velocidade, simplicidade e medições não destrutivas de alguns constituintes (BOGOMOLOV; MELENTEVA, 2013). Alguns estudos investigaram a utilização do NIR para detectar gordura no leite (AERNOUTS et al., 2011; CHEN et al., 2002; PEREIRA et al., 2020; ŠAŠIĆ; OZAKI, 2001; TSENKOVA et al., 1999, 2000). No entanto, este método apresenta menor sensibilidade, estabilidade e precisão, quando comparado com MIR, além de também apresentar interferência nos espectros pela dispersão da luz causadas por partículas de gordura, complicando assim a análise quantitativa do leite cru (BOGOMOLOV; MELENTEVA, 2013).

A espectroscopia Raman também é utilizada para análise de alimentos, essa técnica baseia-se na medida de um fenômeno de dispersão de luz, trata-se de um método rápido, não destrutivo e exige pouca preparação de amostra (EL-ABASSY et al., 2011). Estudos utilizaram dessa técnica para detectar o teor de gordura láctea (EL-ABASSY et al., 2011; MAZUREK et al., 2015; MCGOVERIN et al., 2010; SILVEIRA et al., 2016; YAO et al., 2016). Contudo, a espectroscopia Raman não é um método muito sensível, uma vez que as outras substâncias presentes no leite interferem no resultado (XIONG et al., 2016).

A espectroscopia ultravioleta/visível (UV-Vis) recentemente vem recebendo grande atenção na indústria de alimentos para a caracterização qualitativa e quantitativa dos compostos alimentares (HAQUE; BUBLI; KHAN, 2021). É uma técnica com menor custo, quando comparada com as outras espectroscopias, e seu princípio é baseado na quantidade de luz

absorvida pela amostra e sua correlação com a concentração do analito (YANG, B. et al., 2022). Alguns estudos utilizaram da espectroscopia UV-Vis para quantificar a gordura do leite (FORCATO et al., 2005; XIONG et al., 2016; YANG, B. et al., 2022). Entretanto, para análise do leite, a região da luz visível (360 a 780 nm) é considerada desfavorável, uma vez que a dispersão da luz domina a absorção de gordura, e conseqüentemente, a observação espectral é dificultada (BOGOMOLOV; MELENTEVA, 2013).

Os procedimentos convencionais empregados nas indústrias atualmente demandam considerável tempo e apresentam riscos significativos para os operadores. E as técnicas tradicionais de bioanálise, como por exemplo a espectroscopia e cromatografia, necessitam de equipamentos caros e operações complexas. Considerando que há uma alta frequência das análises nos laticínios, faz-se necessário um método alternativo, sensível, rápido e de baixo custo. Como por exemplo, a utilização de nanossensores colorimétricos.

3.4 BIOSSENSORES COLORIMÉTRICOS

Os sensores colorimétricos, no qual se utiliza da mudança de cor visual para a detecção do analito de interesse, têm sido amplamente aplicados em muitos campos, devido a sua fácil fabricação, rápida detecção, alta sensibilidade e seletividade (LIU, Bin.; ZHUANG; WEI, 2020). Um sensor para ser considerado ideal deve apresentar seletividade, sensibilidade, exatidão, linearidade, robustez e precisão, e podem ser classificados como sensores químicos, no qual utiliza-se de interação de moléculas químicas, e biossensores, em que se utiliza da interação de biomoléculas (PIRIYA V.S et al., 2017).

O biossensor é um dispositivo receptor-transdutor integrado, que possui um elemento biológico capaz de reconhecer a substância desejada e posteriormente, traduzir o evento com o intuito de produzir um sinal proporcional à concentração da substância que está sendo analisada e por fim, transmitir esse sinal ao detector (GIRIGOSWAMI et al., 2021). Eles são responsáveis por disponibilizar informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas seletivas utilizando biomoléculas, como enzimas, anticorpos, sondas de ácido nucleico, células etc. (KHAN et al., 2023).

A classificação dos biossensores ocorre de acordo com a natureza de detecção, como por exemplo, sensores de proteína, sensores de patógenos e sensores imunológicos (PIRIYA V.S et al., 2017). E os tipos de transdutores podem ser: colorimétricos, eletroquímicos, acústicos, ópticos, entre outros (GIRIGOSWAMI et al., 2021). O material advindo da nanotecnologia tem a capacidade de melhorar a sensibilidade dos biossensores colorimétricos

visto que os nanomateriais possuem diversas propriedades físicas, químicas e ópticas, e são capazes de serem funcionalizados com biomoléculas, esse novo conjunto de biossensores são denominados como nanobiossensores (TESSARO et al., 2023).

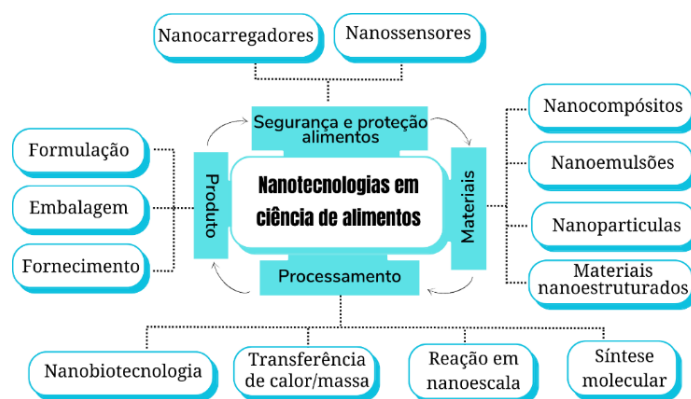
3.5 NANOTECNOLOGIA

A partir de uma revolução tecnológica do século XXI, a nanotecnologia teve seu surgimento, tendo aplicação e conhecimento público nos anos 80. Em 1974 o termo nanotecnologia foi formalmente definido pelo Dr. Norio Taniguchi. Refere-se a uma área de pesquisa em grande crescimento, tendo possível aplicação em quase todos os campos das engenharias, medicina, agricultura, ciência dos materiais, comunicações, tecnologias, e inúmeros outros campos (KUMAR, P. et al., 2020; POKRAJAC et al., 2021).

O termo nanotecnologia é utilizado para definir uma tecnologia precisa, considerada a mais promissora do século XXI, em que os fenômenos ocorrem em escala nanométrica (1-100 nm). A nanotecnologia é capaz de promover o crescimento econômico, bem como, melhorar a capacidade e qualidade dos diversos setores industriais no qual essa tecnologia vindo sendo inserida. Introduzidos neste conceito, os nanomateriais, devem possuir determinadas propriedades, como características de superfície, estado de agregação, composição química, estrutura, solubilidade, e a principal, as dimensões que devem ser nanométricas (HALEEM et al., 2023; KUMAR, R.; KUMAR; LUTHRA, 2023; SAINI et al., 2023). O mercado da nanotecnologia é altamente promissor, em 09 de junho de 2023, o site StatNano demonstra que já são comercializados 10833 produtos, produzidos por 3650 companhias em 68 países (STATNANO, 2023).

No setor alimentício essa técnica foi introduzida em 2003, momento em que o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos publicou o primeiro roteiro em 9 de setembro de 2003 (US DOA, 2003). Atualmente, o setor de alimentos está cada vez mais atraído pela nanotecnologia e os benefícios que essa técnica pode incrementar, essa tecnologia pode ser utilizada no setor alimentício em diversas aplicações, conforme demonstrado na Figura 8, como encapsulamento, embalagens, formulações, segurança, e muitos outros, sendo que o nanossensor de alimentos e aditivos alimentares nanoestruturados são os mais utilizados neste setor (HE, X.; DENG; HWANG, 2019; SAINI et al., 2023).

Figura 8. Papel da nanotecnologia na ciência de alimentos.



Adaptado de Nile et al., (2020)

No setor lácteo, a nanotecnologia é igualmente importante e vem recebendo grande destaque, como demonstrado na Tabela 3, visto que através dessa tecnologia é possível alterar muitas características, bem como controlar a qualidade dos produtos, sendo as principais áreas de foco: segurança dos produtos lácteos, aprimoramento dos atributos sensoriais, fornecimento direcionados de compostos e estabilização de nutracêuticos (SMYKOV, 2020).

De acordo com Poonia., (2019) as nanopartículas, na indústria de laticínios, podem ser divididas em quatro grupos principais no qual se diferem a partir dos mecanismos de ação utilizado e a função desempenhada, sendo eles:

- i) Nanopartículas metálicas: possuem propriedades antimicrobianas, e podem causar a quebra de paredes celulares bacterianas carregadas negativamente;
- ii) Nanopartículas poliméricas: podem ser inseridas em outros materiais para melhorar a biocompatibilidade, e, portanto, podem ser utilizados como nanocarregadores;
- iii) Compostos naturais: São biocompatíveis com o corpo humano, e podem ser utilizados para encapsular diferentes compostos devido sua biodisponibilidade;
- iv) Materiais nanoestruturados: utilizados como transportadores, para liberação direcionada, de grupos funcionais a partir do encapsulamento ou adesão superficial.

Como demonstrado a nanotecnologia vem trazendo diversas vantagens, entretanto, há uma significativa preocupação a respeito dos aspectos toxicológicos e ambientais causados pelo uso de nanomateriais, portanto, é necessário que seja criado uma regulamentação para que haja um gerenciamento de riscos associados à utilização da nanotecnologia, principalmente na indústria alimentícia e agricultura (SMYKOV, 2020).

Tabela 3. Aplicações da nanotecnologia na indústria de laticínios.

Nanotecnologia aplicada	Objetivo	Impacto	Referência
Nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados	Extrair e separar benzeno, etilbenzeno, tolueno e xileno (BTEX) de amostras de leite de vaca, leite em pó e água de fazenda.	O BTEX são poluentes que causam sérios problemas de saúde em seres humanos.	(TEIMOORI et al., 2023)
Biosensor eletroquímico de nanopartículas de ouro e nanotubo de carbono	Detecção ultrasensível de estreptomicina (STR) em amostras de leite.	STR é um antibiótico utilizado para melhorar o crescimento e peso do gado e apresenta riscos à saúde dos consumidores.	(HUI et al., 2023)
Adsorvente composto de cobre metálico, polipirrol, nanotubos de halloysite e nanopartículas de magnetita	Extrair e enriquecer sulfonamidas por extração de fase sólida magnética dispersiva	Sulfonamidas são antibióticos usados para tratar e prevenir doenças infecciosas no gado e causam efeitos adversos à saúde humana.	(JULLAKAN; BUNKOED, 2021)
Nanoencapsulamento de óleo de peixe em goma arábica	Examinar os efeitos sobre as propriedades do leite fermentado probiótico	O óleo de peixe nanoencapsulado foi capaz de fortificar o leite fermentado probiótico, tornando-o um produto funcional com baixo teor de gordura.	(MOGHADAM et al., 2019)
Grânulos compostos de tereftalato de polietileno (PET)/nano-hidroxiapatita (nHAp)	Elucidar e analisar as propriedades das garrafas compostas de PET/nHAp.	A nHAp é capaz de reduzir substancialmente a transmissão de UV, destacando seu potencial para embalagens de produtos lácteos.	(DEMIREL et al., 2021)
Cromatografia nano-líquida tubular enxertada em óxido de grafeno	Separar e determinar as variantes da proteína caseína no leite	Trata-se de uma técnica com menor consumo de produtos químicos, maior sensibilidade e faixas de vazão mais baixas.	(ŞEKER; ALHARTHI; AYDOĞAN, 2022)
Utilização de nanocurcumina para fabricação de novo produto	Formular um novo pó de creme de leite	Apresentou alta aceitabilidade sensorial e potencial como ingrediente alimentar funcional.	(VERMA, K. et al., 2022)
Tratamento com nanobolhas	Investigar as propriedades morfológicas e de manuseio em massa dos pós de concentrado de proteína do leite (MPC) fabricados a partir da incorporação de micro e nanobolhas (MNB) antes da secagem por pulverização	Representa um potencial para o processo de secagem com maior economia de energia, além de gerar melhores propriedades de fluxo de pó sem afetar as características morfológicas.	(BABU; SILIVERU; AMAMCHARLA, 2022)

3.5.1 NANOSENSOR COLORIMÉTRICO

Os nanosensores são dispositivos em nanoescala que são capazes de monitorar e transformar as quantidades físicas em sinais para serem detectados e analisados, eles possuem alta sensibilidade e alta resolução espacial em nanoescala, são utilizados para detectar corantes, antibióticos, microrganismos, pragas, toxinas etc. (Pu et al., 2020). T. Yang & Duncan (2021) demonstraram em seu estudo o significativo aumento de publicações sobre nanosensores de 2007 a 2020, e como grande partes destas pesquisas então focadas na indústria de alimentos. Esse dispositivo apresenta uma rápida detecção, alta sensibilidade, são compactos, proficientes e não necessitam de uma preparação específica da amostra, nem de instrumentos custosos (GIRIGOSWAMI et al., 2021).

As nanopartículas oferecem excelentes recursos de detecção, como forte reatividade, maior condutividade, resistência, propriedades magnéticas exclusivas e uma considerável relação volume/área. Portanto, os nanossensores exigem uma quantidade menor de analito, reduzem a complexidade e o custo dos ensaios (THAKUR; WANG; VERMA, 2022). Os principais nanomateriais usados na fabricação de sensores, devido às suas propriedades de versatilidade, síntese simples, desempenho ajustável e alta capacidade de carga de biomoléculas, incluem nanoestruturas de metais nobres, nanopartículas magnéticas, pontos quânticos de carbono e estruturas metal-orgânicas (PU et al., 2021).

Estes dispositivos podem ser divididos em quatro categorias, como demonstrado na Figura 9, os nanosensores físicos são utilizados para detecção de propriedades físicas, tais como: pressão, fluxo e temperatura (JAVAID et al., 2021). Os nanosensores químicos gera um sinal elétrico a partir da natureza química ou da concentração de uma molécula da substância que está sendo analisada (KURBANOGLU et al., 2019). Os bio-nanosensores utilizam-se de material biológico e transdutores físico-químicos para detectar um analito específico (JAFARIZADEH-MALMIRI et al., 2019). Os nanosensores ópticos geram a mudança de coloração ou fluorescência no sistema, possuem simplicidade, facilidade de operação e baixo custo (GUO, Yongming; ZHAO, 2019).

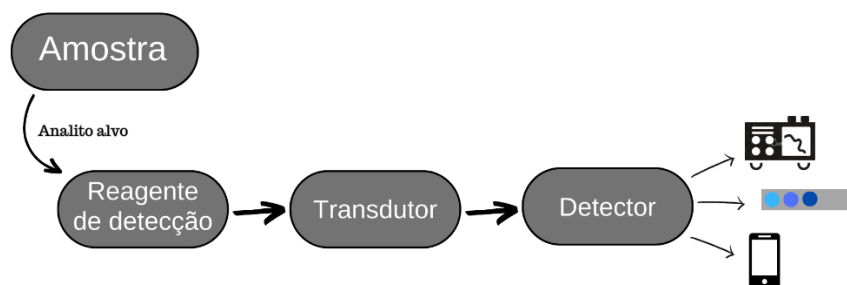
Diversas tecnologias de sensores ópticos estão sendo desenvolvidos, utilizando da colorimetria e fluorescência, tendo em vista que estas técnicas apresentam baixo custo, simplicidade na aplicação e na detecção (SINGH et al., 2021). O princípio da colorimetria, conforme demonstrado na Figura 10, é baseado nas reações de um composto com um reagente cromogênico formando um sinal colorido, esse sinal pode ser medido a partir de um

espectrofotômetro, um programa ligado a um smartphone, e ainda, a olho nu, como por exemplo à base de papel (APAK et al., 2020).

Figura 9. Nanosensores e suas diferentes categorias.



Figura 10. Esquema do princípio da colorimetria.



Adaptado de Apak et al., (2020)

Para a detecção colorimétrica, os nanomateriais, devido a sua grande área de superfície de contato, tem a capacidade de elevar o número de receptores conjugados em sua superfície, melhorando o reconhecimento e desempenho de detecção, gerando um nanosensor mais sensível (TESSARO et al., 2023). As nanopartículas metálicas (NPMs) são as mais utilizadas para a fabricação de sensores colorimétricos, uma vez que, essas são capazes de causar uma visível mudança de cor devido a sua propriedade de ressonância de plasmon de superfície localizada (RPSL) (AKSHAYA et al., 2020).

Os nanosensores à base de papel tem sido muito utilizado devido ao baixo custo, fácil manuseio, serem rápidos e acessíveis, neste modelo, as nanoestruturas, que além de melhorar o

desempenho do sensor, servem como transportadores de amostras, interfaces de detecção e agentes de orientação (GHASEMI et al., 2023).

Na indústria de alimentos, os nanossensores são utilizados para diversas finalidades, tais como: monitorar agentes patógenos e poluentes; rastrear tempo, temperatura e data de validade; detectar toxinas e microrganismos; análise de sabor, textura e qualidade. Na Tabela 4, demonstra-se diferentes pesquisas que utilizaram de nanossensores colorimétricos na indústria alimentícia com diferentes finalidades (JAGTIANI, 2022).

3.5.1.1 Nanossensores de ouro

Os elétrons livres das nanopartículas metálicas estão confinados em seu espaço de acordo com seu tamanho, e conseqüentemente, tem uma frequência de oscilação. Ao serem irradiadas a uma frequência natural de entrada das oscilações dos elétrons, ocorre então a absorção e a indução do efeito ressonância de plasmon de superfície localizada (RPSL) (AKSHAYA et al., 2020). Essa ressonância gera, em comprimentos de onda visível, a interação ressonante dos elétrons livres do metal com o campo eletromagnético oscilante da luz (XU et al., 2020). Assim, quando um feixe de ondas eletromagnéticas irradia sobre os nanomateriais metálicos, o campo elétrico oscilante faz com que os elétrons de condução oscilem em conjunto, sendo que, quanto maior a densidade da nanopartícula, maior será a frequência de RPSL (AI et al., 2021). Devido a suas propriedades físicas e químicas, os nanomateriais metálicos podem melhorar substancialmente a sensibilidade e a especificidade como aplicações em biossensores (HE, Y. et al., 2020).

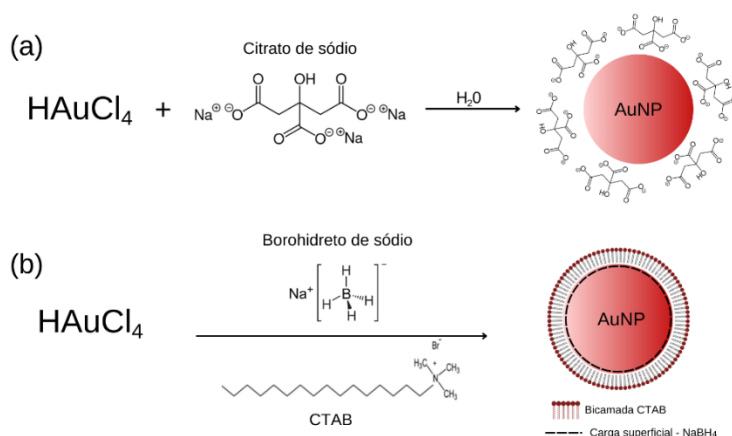
Dentre as NPMs que possuem a propriedade RPSL, as de Cu, Ag e Au são as mais utilizadas para sensores, sendo que as nanopartículas de cobre (CuNPs) apresentam menor valor, mas oxidam facilmente, as AgNPs apresentam um elevado nível de toxicidade para o ecossistema, e apesar das AuNPs serem mais caras, são as mais indicadas para detecção a partir de técnicas colorimétricas (AKSHAYA et al., 2020). Como vantagens, as AuNPs apresentam: i) síntese utilizando diversas rotas físico-químicas; ii) são inertes e estáveis contra oxidação; iii) possuem alta sensibilidade de detecção, devido a elevada relação superfície/volume; iv) possuem excelentes propriedades ópticas e eletroquímicas (PRIYADARSHINI; PRADHAN, 2017).

Tabela 4. Utilização de nanossensores colorimétricos na indústria de alimentos.

Nanocomposto	Tamanho nanoestrutura (nm)	Limite de detecção	Objetivo	Referência
Nanopartículas de ouro (AuNPs)	13	0,25 ng mL ⁻¹	Detecção seletiva de quantidades de aflatoxina B1 (AF1)	(LUAN et al., 2015)
Nanobastões de ouro (AuNRs)	13 ± 1 - 50 ± 3	9,0 nM	Detecção visual de ocratoxina A (OTA)	(TIAN et al., 2020)
Nanopartículas de cobre (CuNPs)	< 10	0,33 mM	Detecção de ácido láctico (AL) em amostras de alimentos	(RATTU; MURALI KRISHNA, 2022)
Nanopartículas de ouro	12	4,43 ± 0,019 ng mL ⁻¹	Detecção discriminativa de proteínas de glúten	(SADAT MOUSAVIZADEH; SARLAK, 2023)
Nanopartículas de prata (AgNPs)	8,6	25 nM	Detecção de íons de mercúrio (II) (Hg ²⁺)	(JEEVIKA; SHANKARAN, 2016)
Nanopartículas de ouro	15	8,73 ng µL ⁻¹	Detecção de <i>Staphylococcus aureus</i>	(SHAHBAZI et al., 2018)
Nanotubo de cério coordenado com ácido aspártico (Asp/CeNT)	8	33,2 nM	Detecção altamente sensível e seletiva de cisteína (Cys)	(LI, Y. et al., 2019)
Nanopartículas de CuO encapsuladas em polifenóis de <i>Camellia sinensis</i> (PPS-CuO NPs)	10 - 50	40,6 nM	Monitoração da deterioração dos alimentos	(KARAKUŞ et al., 2022)
Nano-óxido de manganês (nano-MnOx)	21 – 38	1,23×10 ⁻⁹ - 1,71×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	Medição indireta da capacidade de compostos antioxidantes	(CAN; ÜZER; APAK, 2020)
Nanopartículas de prata	7,5	0,10 µM	Detecção seletiva de triazofos em alimentos	(BHAMORE; GANGULY; KAILASA, 2016)
Pontos quânticos de grafeno (GQGs) e AuNPs	15,44 ± 1,64	0,422 µM	Detecção de gentamicina (GENTA) em amostras de leite e ovos	(SAJWAN; SOLANKI, 2022)

Há diversas técnicas para síntese de AuNPs, incluindo vias químicas, térmicas, eletroquímicas e sonoquímicas. O método de Turkevich, Figura 11(a), é o mais utilizado, este método se baseia na redução do ácido cloroáurico (HAuCl_4) por citrato, que atua como agente estabilizador e redutor, em água, e então, ocorre a mudança de coloração do amarelo claro para o vermelho vinho (HERIZCHI et al., 2014). O borohidreto de sódio é eficaz como agente redutor na síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs), Figura 11(b), permitindo reações em temperatura ambiente e favorecendo a rápida nucleação, resultando em AuNPs menores, frequentemente abaixo de 5 nm (AL-JOHANI et al., 2017). Semelhante ao método de Turkevich, o citrato pode ser incluído, mas quando o NaBH_4 é o agente redutor, o citrato age apenas como agente de cobertura. Como opção, o citrato pode ser substituído por agentes de cobertura hidrofóbicos, como brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), formando uma bicamada na superfície das nanopartículas (SHERIDAN; THOMPSON; SLATER, 2022).

Figura 11. Esquema da formação de nanopartículas de ouro. (a) Método de Turkevich com redução por citrato de sódio. (b) Redução por borohidreto de sódio com cobertura de brometo de cetiltrimetil amônio.



Adaptado de Priyadarshni & Chanda, (2022) e Sheridan et al., (2022).

A propriedade óptica das AuNPs estão relacionadas com sua síntese, e consequentemente, com o tamanho, forma e estado de agregação da molécula (SADAT MOUSAVIZADEH; SARLAK, 2023). Dependendo de suas características, principalmente o estado de agregação da molécula, é possível observar a mudança de coloração, durante a agregação ocorre a alteração do vermelho a roxo e durante a redispersão de azul a quase preto (ANH et al., 2022). Portanto, a utilização das AuNPs em sensores colorimétricos vem aumentando significativamente, em diversas aplicações, conforme demonstrado na Tabela 5, principalmente devido a mudança de coloração observadas a olho nu.

Tabela 5. Sensores colorimétricos utilizando AuNPs a partir do método de Turkevich em diferentes aplicações.

Nanocomposto	Tamanho (nm)	Limite de detecção	Objetivo	Referências
Nanossensor de Ouro (Au-Ns)	21	0,05 mg/L	Detecção de melamina no leite cru	(KUMAR, N.; SETH; KUMAR, 2014)
Sondas de AuNPs não modificadas	12,74	50 ng/mL	Detectar Enterotoxina Estafilocócica (SE) B em produtos alimentares	(ZHOU et al., 2016)
Aptasensor colorimétrico sem rótulo de AuNPs	14	0,37 nM	Detecção seletiva de Microcistina-LR (MC-LR) em amostras de água	(LI, X. et al., 2016)
Au-Ns	8	320 UFC/mL	Detecção da exotoxina A de <i>P. aeruginosa</i>	(AMINI et al., 2018)
Aptasensores colorimétricos com base em AuNPs	13	23.3 nM	Detecção de tobramicina (TOB) no leite e nos ovos de galinha	(MA et al., 2018)
Aptasensores sem rótulo baseados em AuNP não modificadas	13	12.5 nM	Detecção de zearalenona (ZEN) em alimentos para animais	(ZHANG, Y. et al., 2018)
Nanosensor óptico baseado em AuNPs	15	8,14 ng mL ⁻¹	Detecção de quatro espécies de <i>Shigella</i>	(ELAHI; BAGHERSAD; KAMALI, 2019)
Au-Ns	6-11	6 fg/ μL	Detecção da proteína A tifilócica em amostras clínicas e alimentares	(MADKOUR et al., 2023)

3.5.1.2 Nanosensores de Ácido 10,12-pentacosadínico (PCDA)

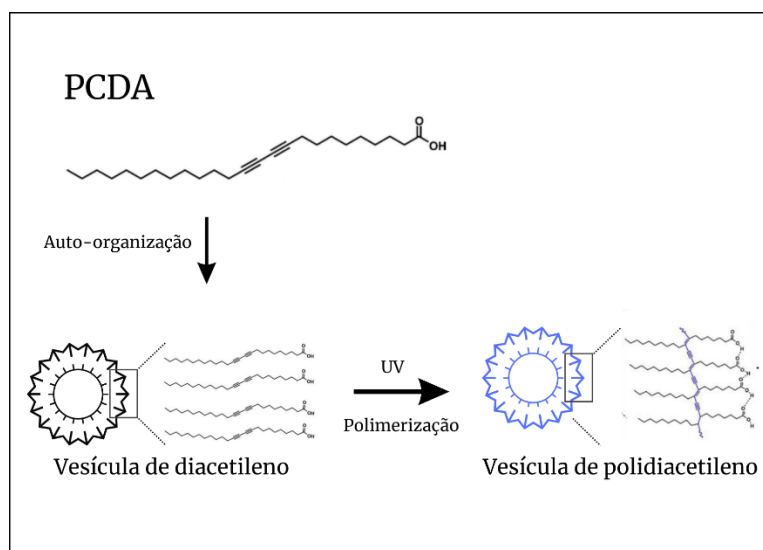
O polidiacetileno (PDA) é um polímero conjugado composto por uma cauda hidrofóbica de hidrocarboneto e uma cabeça polar anfifílica. Esses polímeros conjugados são constituídos por materiais orgânicos que apresentam ligações simples e duplas alternadas (ligações conjugadas) em sua cadeia (VALDEZ et al., 2019).

Os monômeros de diacetileno (DA) exibem uma propensão à autoorganização. A exposição à radiação UV a 254 nm induz a polimerização de 1,4-adição nos monômeros de diacetilenos (DA), resultando na formação do PDA com uma alternância de ligações duplas e triplas na cadeia, conforme ilustrado na Figura 12. Essas estruturas manifestam uma resposta colorimétrica a vários estímulos químicos e físicos (HALL et al., 2020). Durante o processo de polimerização, os monômeros têm a capacidade de adotar vários arranjos, geometrias e disposições distintas, como micelas, nanotubos, filmes, nanocompósitos e vesículas (DE SOUZA et al., 2016).

As vesículas de PDA são denominadas vesículas unilamelares nanométricas, são compostas por uma bicamada esférica mista, e possui uma relação proporcional entre o grau de polimerização e sua estabilidade (LEBÈGUE et al., 2018). Essas vesículas apresentam algumas limitações devido à sua baixa estabilidade à agregação, portanto, é de grande importância para a pesquisa, trabalhar essas limitações sem modificar a estrutura do diacetileno (FERREIRA et al., 2018). Gou et al., (2010) analisaram a capacidade de interação do PDA com moléculas anfifílicas, como os copolímeros tribloco (CTs), e apresentaram resultados satisfatórios, como maior sensibilidade e estabilidade, para orientação de monômeros de diacetileno em núcleo hidrofóbico dos agregados.

Os PDAs são muito utilizados para produção de sensores, devido a sua importante e mutável propriedade ótica, gerada a partir do sistema eletrônico π -conjugado que confere a transição cromática em determinados estímulos a este material, sendo o monômero de diacetileno, ácido 10,12-pentacosadínico (PCDA), o mais utilizado, devido a sua elevada reatividade do grupo carboxílico que permite a sua modificação, gerando sistemas mais robustos e sensíveis (QIAN; STÄDLER, 2019; VO et al., 2021). A estrutura cristalina de raio-x, bem como os parâmetros topoquímicos da molécula de PCDA foram analisadas e relatadas por Hall et al., (2020).

Figura 12. Esquema da auto-organização de monômeros de PCDA e a formação de vesículas após a irradiação UV.



Adaptado de (JANNAH; KIM, 2019)

Estudos apontam que os agregados não perturbados de vesículas de PCDA apresentam a coloração azul (absorbância a 640 nm) e quando expostos a um estímulo externo, tais como: alteração de pH e temperatura, estresse mecânico e ligação molecular, ocorre a transição para o vermelho (absorbância a 540 nm) (DE SOUZA et al., 2016; DOLAI et al., 2017; GUO, C. et al., 2007; JUNG; PARK; KIM, 2006; KEW; HALL, 2006).

Oliveira et al., (2012) analisaram o comportamento da vesícula de PCDA na presença de componentes químicos do leite em diferentes condições e avaliaram sua aplicação como sensor na indústria alimentícia. Já Ferreira et al., (2018) avaliaram a versatilidade e o potencial de vesículas de PCDA, funcionalizados com copolímeros tribloco, como sensores para aplicação em diversos pontos da cadeia alimentar. Os copolímeros tribloco, como o L64, são formados por dois grupos hidrofílicos e um grupo lipofílico, e quando sintetizados com vesículas de PCDA para utilização como nanossensores, apresentam maior estabilidade termodinâmica, facilidade em sua modulação e não há necessidade de uso de solventes orgânicos para síntese (GE et al., 2021; REZENDE et al., 2019). Diferentes trabalhos estão apresentados na Tabela 6, em que foi utilizado vesículas de PCDA com diversos agentes funcionalizantes para aplicação colorimétrica.

Tabela 6. Nanosensores colorimétricos de vesículas de PCDA funcionalizadas em diferentes aplicações.

Agente Funcionalizante	Tamanho sensor (nm)	MLD	Objetivo	Ref
Peptídeos	47.7 ± 2.2	10 ⁵ UFP	Deteccção do vírus pandémico H1N1	(SONG et al., 2016)
Copolímero tribloco - L64	52	1,0 µg/µL	Deteccção de caseína micelar	(DE SOUZA et al., 2016)
Copolímero tribloco - L64	280	0,05 mM	Deteccção da albumina do soro bovino	(REZENDE et al., 2017)
Clorofórmio	280	1,0 mM	Deteccção da concentração de glucose	(KIM et al., 2018)
Copolímero tribloco - L64	80.9 ± 4.1	0,054 µM	Deteccção de enrofloxacina (ENRO) em meio aquoso	(REZENDE et al., 2019)

4. CAPÍTULO 1 - SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE OURO PARA DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE ÁCIDOS GRAXOS

RESUMO

A composição do leite, principalmente o teor de gordura, determina a qualidade e seu valor de mercado, portanto a quantificação de lipídeos é fundamental para a indústria de laticínios. Além da porcentagem total de gordura, a composição dos ácidos graxos livres pode ser utilizada como indicador de qualidade do leite. Atualmente na indústria, os métodos utilizados para medir o teor de gordura são trabalhosos e utilizam-se de reagentes não sustentáveis. Portanto, investigações com foco no desenvolvimento de um novo sistema de monitoramento para teor de gordura em leite são relevantes para a agroindústria de lácteos. Este estudo explorou a interação entre nanopartículas de ouro (AuNPs), com tamanho de $1,2 \pm 0,2$ nm, e ácidos graxos (ácido palmítico, ácido oleico e ácido caprílico) visando o desenvolvimento de sensores colorimétricos para a detecção de teores de ácidos graxos em amostras. Nos ensaios, notou-se que o ácido caprílico apresentou uma resposta colorimétrica mais intensa, possivelmente devido à sua menor cadeia carbônica, favorecendo a interação eficiente com as AuNPs. A turbidez observada nos ensaios, especialmente com ácido palmítico e ácido oleico, indicou desafios potenciais para as análises espectrofotométricas. Apesar disso, os resultados confirmaram a interação esperada e destacaram a necessidade de otimizar as condições experimentais para avançar na aplicação prática desses sensores colorimétricos na detecção de teores de ácidos graxos em amostras.

Palavras-chave: ácido palmítico; ácido oleico; ácido caprílico; RGB; gordura láctea.

ABSTRACT

The composition of milk, especially the fat content, determines its quality and market value, so the quantification of lipids is essential for the dairy industry. In addition to the total percentage of fat, the composition of free fatty acids can be used as an indicator of milk quality. Currently in the industry, the methods used to measure fat content are laborious and use unsustainable reagents. Therefore, research focusing on the development of a new monitoring system for fat content in milk is relevant to the dairy agro-industry. This study explored the interaction between gold nanoparticles (AuNPs), with a size of 1.2 ± 0.2 nm, and fatty acids (palmitic acid, oleic acid and caprylic acid) with a view to developing colorimetric sensors for detecting fatty acid content in samples. In the tests, it was noted that caprylic acid showed a more intense colorimetric response, possibly due to its shorter carbon chain, favoring efficient interaction with the AuNPs. The turbidity observed in the tests, especially with palmitic acid and oleic acid, indicated potential challenges for spectrophotometric analysis. Despite this, the results confirmed the expected interaction and highlighted the need to optimize the experimental conditions in order to advance the practical application of these colorimetric sensors in the detection of fatty acid content in samples.

Keywords: palmitic acid; oleic acid; caprylic acid; RGB; milk fat.

1. INTRODUÇÃO

O leite bovino é um fluido biológico que atende às necessidades específicas das pessoas, sendo um alimento altamente nutritivo oferecem uma variedade de carboidratos, gorduras, minerais e vitaminas (CIMMINO et al., 2023). Atualmente, a indústria de laticínios desempenha um papel significativo no âmbito agrícola, destacando-se o Brasil como um dos competidores mais proeminentes nos mercados globais (BEBER; LANGER; MEYER, 2021). O país é o terceiro maior produtor mundial de leite bovino, alcançando um volume anual de 34 bilhões de litros. Assim, o Brasil emerge como um protagonista nos negócios agroalimentares (MAPA, 2022).

A qualidade dos produtos lácteos é diretamente influenciada pela composição do leite, a qual é afetada por diversos fatores, como raça, idade, estágio de lactação, estado de saúde, tipo de alimentação fornecida ao animal e efeitos sazonais e regionais. Isso ocorre porque as propriedades do leite estão intrinsecamente ligadas aos compostos presentes no fluido (ALOTHMAN et al., 2019; PRIYASHANTHA; LUNDH, 2021). Os lipídeos compõem o leite em concentrações que variam de 2,9% a 3,5%, desempenhando um papel crucial como um dos componentes mais significativos (KAILASAPATHY, 2015). Os ácidos graxos (AGs) estão contidos nos glóbulos de gordura láctea, apresentando diversos comprimentos de cadeia. Eles desempenham um papel fundamental nas propriedades reológicas e organolépticas dos produtos lácteos, além de contribuir para as características sensoriais e a estabilidade em emulsões (HAGEMAN et al., 2019).

O método predominante na indústria de alimentos para determinar o teor de gordura no leite é o teste de Gerber, que envolve a destruição das micelas de gordura e dissolução da caseína. Contudo, é complexo, potencialmente perigoso para os operadores devido aos reagentes utilizados e apresenta riscos de acidentes devido às altas temperaturas geradas. Adicionalmente, os reagentes utilizados no método podem causar impactos ambientais desfavoráveis (DESAI; PANDYA, 2022a).

A detecção colorimétrica é baseada no princípio de mudança na coloração visual para detectar diferentes analitos (LIU, Bin.; ZHUANG; WEI, 2020). A ascensão da nanociência vem ocorrendo na última década, gerando materiais com dimensões nanométricas que oferecem desenvolvimento tecnológico e científico em diversas áreas (CIAMBELLI; LA GUARDIA; VITALE, 2020). Isso ocorre devido as excelentes propriedades geradas a partir do aumento da

área de superfície da molécula quando se encontra em escala nanométrica (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018).

Dentre os diversos tipos de nanomateriais, as nanopartículas metálicas, especialmente as nanopartículas de ouro (AuNP), tem atraído um grande interesse para ciência, principalmente para técnicas colorimétricas. As AuNPs possuem características únicas, como propriedades ópticas e eletrônicas, elevada condutividade, além de possuir uma manipulação sintética facilitada (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018).

Neste contexto, o presente capítulo aborda a síntese e caracterização de nanoestruturas de ouro por meio de duas vias distintas: redução utilizando citrato de sódio e redução utilizando borohidreto de sódio na presença de brometo de cetrimônio (CTAB). Além disso, foi examinada a interação colorimétrica das nanopartículas de ouro na presença de três ácidos graxos distintos: ácido palmítico (C:16), ácido oleico (C:18) e ácido caprílico (C:8), utilizando dois diferentes solventes, álcool isopropílico e triton x-100.

2. EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAIS

O ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) foi adquirido da Cennabras (Lote: 5588-09). O álcool isopropílico foi obtido da FMaia, o citrato de sódio, ácido caprílico e ácido ascórbico foram adquiridos da Synth. O ácido palmítico e o cetiltrimetil amônio (CTAB) foram fornecidos pela Êxodo, enquanto o ácido oleico e o borohidreto de sódio foram obtidos da Merk. O Triton X-100 foi fornecido pela Neon e todos os reagentes foram utilizados sem purificação analítica. Todos os experimentos foram conduzidos em água destilada. Os

2.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

2.2.1 MÉTODO TURKEVICH – REDUÇÃO POR CITRATO DE SÓDIO

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas através da redução de ácido cloroáurico (HAuCl_4) mediada por citrato, de acordo com procedimentos previamente publicados (GRABAR et al., 1995). Desta forma, 100 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 na concentração de 1 mmol L^{-1} foi preparada e aquecida em um agitador magnético C-MAG HS10 (IKA, Poland) com agitação constante e vigorosa. Após ebulição, foram adicionados 10 mL de uma solução de citrato de sódio a $38,8 \text{ mmol L}^{-1}$, momento em que houve a mudança de coloração de amarelo pálido para vermelho escuro. O aquecimento da solução foi mantido por mais 10 minutos e a agitação permaneceu até à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução

foi armazenada a 4 °C. Para as análises, as AuNPs foram diluídas em água destilada na concentração de 1:10 (v/v).

2.2.2 REDUÇÃO POR BOROHIURETO DE SÓDIO COM BROMETO DE CETILTRIMETIL AMÔNIO (CTAB)

Nanopartículas de ouro estabilizadas com brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), denominadas CTAB@AuNPs, foram sintetizadas através de uma abordagem química úmida padrão, realizada em temperatura ambiente, seguindo (PANNICO et al., 2023) com modificações. Desta forma, 1,0 mL de H₂AuCl₄ (0,1 mol L⁻¹) foi adicionado em 100,0 mL de água destilada, sendo posteriormente reduzido com uma solução de 5,0 mL à 0,2 mol L⁻¹, recém-preparada de borohidreto de sódio (NaBH₄) na presença de CTAB (2,0 mL, 0,2 mol L⁻¹) como agente estabilizador. A solução, que imediatamente adquiriu uma coloração vermelha intensa, foi mantida sob agitação constante por cerca de 24 horas para completa reação. Após esse período, a solução foi refrigerada a 4 °C. Para as análises, as AuNPs foram diluídas em água destilada na proporção de 1:10 (v/v).

2.3 CARACTERIZAÇÃO

O tamanho hidrodinâmico das nanopartículas, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta foram determinados no Zetasizer PN3702 (Malvern Instruments, UK) via espalhamento de dinâmico de luz. As medidas foram realizadas utilizando um detector de fotodiodo de avalanche e um correlacionador sem qualquer purificação adicional. A fonte de luz foi um laser HeNe de 35 mW e potência de $\lambda = 632,8$ nm, linearmente polarizada. Para o controle de intensidade foi empregado um sistema de polarizadores cruzados. O ângulo de detecção foi fixo em 173° e as medidas correlacionadas pelo algoritmo CONTIN.

A caracterização dos espectros de absorção molecular UV-Vis da nanoestrutura de ouro foi registrada na gama de 700-300 nm no leitor de microplaca Synergy HT (Biotek, EUA).

2.4 PREPARO DAS AMOSTRAS DE ÁCIDOS GRAXOS (AG) E ENSAIO COLORIMÉTRICO

2.4.1 ISOPROPANOL

Baseado em estudos previamente publicados, foi possível desenvolver e aplicar o método descrito a seguir para a produção da solução de ácido palmítico (AP) (CALVO; COLLADO; CEPEDA, 2009; MORIBE et al., 2011; TORRES et al., 2008). Uma amostra de solução padrão e uma amostra de controle, denominada de branco, foram produzidas, de forma que a solução

padrão obteve em um volume de isopropanol de 10 mL, uma concentração de ácido palmítico e de ácido ascórbico, de 0,0231 g mL⁻¹ e 0,001762 g mL⁻¹, respectivamente. Já na amostra controle (branco), utilizou-se do mesmo volume de isopropanol (10 mL) e da mesma concentração de ácido ascórbico (0,001762 g mL⁻¹), no entanto, não foi adicionado o analito de interesse, o ácido palmítico. Para o preparo da solução de ácido oleico (AO) não se fez necessário a utilização de ácido ascórbico, portanto, utilizou-se da mesma concentração de ácido graxo (0,0231 g mL⁻¹) em 10 mL de isopropanol. Posteriormente, foi realizado o ensaio colorimétrico, utilizando as nanopartículas de ouro previamente preparadas.

Diferentes concentrações de ácido palmítico e oleico foram adicionadas nas AuNPs em frascos de vidro. Para auxiliar a solubilização da solução do ácido palmítico nas nanopartículas de ouro, foram utilizados, em cada ensaio, 500 µL do surfactante Dodecil Sulfonato de Sódio a 10% (v/v). Foram produzidas 6 amostras contendo 2000 µL de AuNP + surfactante e diferentes volumes de solução de ácidos graxos, Tabela 7, a fim de obter amostras em diferentes concentrações. Um ensaio controle foi realizado, em que se utilizou da solução branco previamente preparada, substituindo a solução de ácido graxo. Para o ensaio do ácido oleico a mesma metodologia foi aplicada com a substituição da solução de surfactante por água destilada, uma vez que, a solução obteve uma melhor solubilização, quando comparado com o ácido palmítico.

Tabela 7. Ensaio colorimétrico com álcool isopropílico.

Amostra	Volume AuNP (µL)	Volume de solução de Ácido graxo / Branco (µL)	Volume de solução de surfactante/ Água destilada (µL)	Concentração final de ácido graxo (g mL ⁻¹)
AP ₁ /AO ₁	1500	400	500	3,85 10 ⁻³
AP ₂ /AO ₂		600		5,33 10 ⁻³
AP ₃ /AO ₃		800		6,60 10 ⁻³
AP ₄ /AO ₄		1000		7,70 10 ⁻³
AP ₅ /AO ₅		1200		8,66 10 ⁻³
AP ₆ /AO ₆		1400		9,51 10 ⁻³

2.4.2 TRITON X-100

Com base em Rharbi et al., (1999), visando aprimorar a solubilização dos ácidos graxos em soluções aquosas para intensificar a interação com as nanoestruturas, foi desenvolvida e aplicada a seguinte metodologia. As soluções dos ácidos graxos foram preparadas utilizando o

surfactante Triton X-100 (TX-100) como solvente. Foram criadas amostras contendo ácidos graxos puros (ácido palmítico (AP), ácido oleico (AO) e ácido caprílico (AC)) e amostras com a mistura dos três ácidos (TAG). No processo de preparação, os ácidos graxos foram adicionados ao Triton X-100 na concentração de $2,8864 \text{ g mL}^{-1}$. No ensaio que envolveu os três ácidos graxos em conjunto, optou-se pela seguinte proporção, considerando os teores individuais de cada ácido no leite: 50 % (m/v) de ácido palmítico, 45 % (m/v) de ácido oleico e 5 % (m/v) de ácido caprílico. Além disso, uma amostra de controle contendo apenas Triton X-100 foi produzida. Em seguida, as amostras foram submetidas a um banho-maria a 100°C por 20 minutos para facilitar a solubilização. Posteriormente, as amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:10 (v/v) e armazenadas em tubos Falcon à temperatura ambiente.

Volumes variados das soluções dos ácidos graxos e da solução de Triton X-100 foram incorporados a $1000 \mu\text{L}$ de nanopartículas de ouro (AuNPs) em frascos de vidro para o ensaio colorimétrico dos AG individuais, conforme indicado na Tabela 8.

Tabela 8. Ensaio colorimétrico com Triton X-100

Amostra	Volume AuNP (μL)	Volume de solução de Ácido graxo (μL)	Volume de solução de Triton X-100 (μL)	Concentração final de ácido graxo (g mL^{-1})
1		46,875	453,125	$9,020 \cdot 10^{-3}$
2		58,594	441,406	$11,275 \cdot 10^{-3}$
3		70,312	429,688	$13,530 \cdot 10^{-3}$
4	1000	82,031	417,969	$15,785 \cdot 10^{-3}$
5		93,750	406,250	$18,040 \cdot 10^{-3}$
6		187,5	312,500	$36,080 \cdot 10^{-3}$
7		375,00	125,000	$72,160 \cdot 10^{-3}$

2.5 ANÁLISES DO ENSAIO COLORIMÉTRICO

Dois ensaios foram preparados para analisar a interação das nanopartículas de ouro na presença dos ácidos graxos, sendo um ensaio utilizando álcool isopropílico como solvente (AuNP/IPA) e outro utilizando Triton X-100 (AuNP/TX-100). No ensaio AuNP/IPA, os testes foram realizados para o ácido palmítico (AuNP/IPA/AP) e ácido oleico (AuNP/IPA/AO). No ensaio AuNP/TX-100, os testes foram realizados para o ácido palmítico (AuNP/TX-100/AP), ácido oleico (AuNP/TX-100/AO), ácido caprílico (AuNP/TX-100/AC) e o conjunto dos três ácidos (AuNP/TX-100/TAG).

Fotos de cada amostra, para ambos os ensaios, foram capturadas utilizando um smartphone iPhone 13. Em seguida, uma fração de 236 x 354 pixels foi extraída de cada imagem original para a criação de um histograma RGB (*Red, Green, Blue*) usando o software OriginPro 8.5. Esse procedimento permite a observação dos níveis das cores RGB em cada amostra.

Com o intuito de completar a análise de mudança de coloração via método RGB, foi realizado a quantificação a partir do histograma obtido no software PhotoDirector 8, em que foi analisado as diferentes combinações das cores vermelho, verde e azul e a reprodução de um largo espectro cromático. Para isso, utilizou-se das Equações 1 e 2, nas quais avaliou-se a intensidade do componente vermelho e azul, respectivamente, em comparação com a intensidade total dos componentes vermelho, verde e azul (ZHENG et al., 2021).

$$CV_{RED} (dB) = 10\log \left[\frac{R}{(R+G+B)} \right] \quad (1)$$

$$CV_{BLUE} (dB) = 10\log \left[\frac{B}{(R+G+B)} \right] \quad (2)$$

Em que, R, G e B representam a intensidade óptica do vermelho, verde e azul, respectivamente.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à leitura no espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, na faixa de 700 a 300 nm, utilizando o leitor de microplacas Synergy HT (Biotek, EUA). No caso das amostras obtidas no ensaio AuNP/IPA, foi necessário realizar a filtração das amostras de ácido palmítico, utilizando um filtro de polifluoreto de vinilideno (PVDF) de 0,45 µm, antes da leitura. Esse procedimento não foi necessário para o ácido oleico, assim como para as amostras obtidas no ensaio AuNP/TX-100, visto que essas amostras apresentam uma menor turbidez. A disposição das microplacas de 96 poços nos ensaios AuNP/IPA e AuNP/TX-100 está representada nas Figuras 13 e 14, respectivamente. No experimento AuNP/IPA/AP, como demonstrado na Figura 13, foram adicionados 150,0 µL de cada amostra em poços individuais. As amostras contendo ácido ascórbico foram posicionadas nas linhas A e B, enquanto aquelas sem ácido ascórbico foram dispostas nas linhas C e D. Já o ensaio AuNP/IPA/AO foi realizado nas linhas E e F. No ensaio com AuNP/TX-100, foram adicionados 200,0 µL de cada amostra em cada poço da microplaca, conforme ilustrado na Figura 14.

Figura 13. Disposição da placa de 96 poços usada no ensaio AuNP/IPA para leitura no espectrofotômetro UV-Vis.

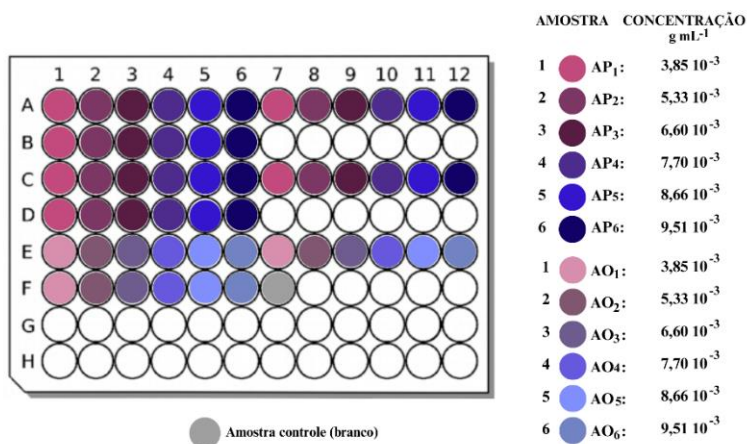
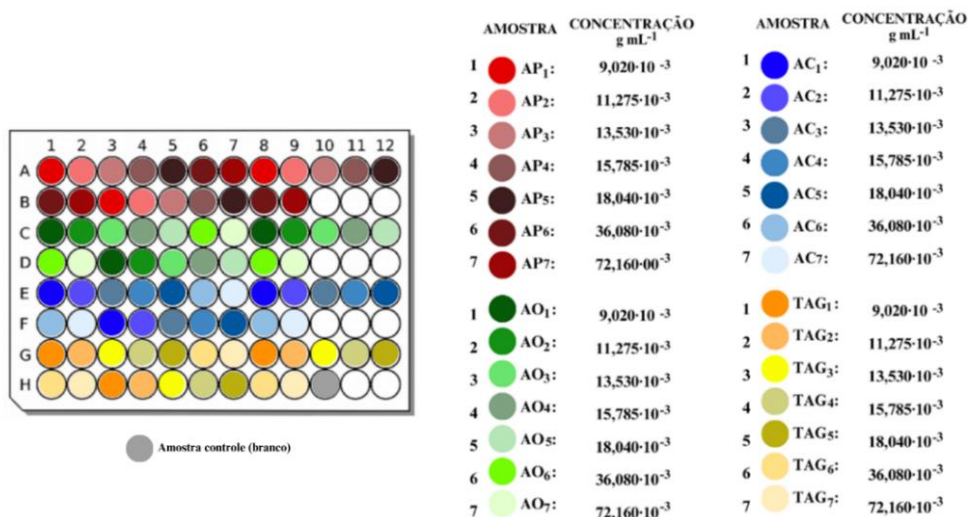


Figura 14. Disposição da placa de 96 poços usada no ensaio AuNP/TX-100 para leitura no espectrofotômetro UV-Vis.



2.6 ENSAIO CINÉTICO DA ALTERAÇÃO COLORIMÉTRICA

O estudo cinético foi conduzido no contexto do ensaio AuNP/TX-100. Durante um período de 48 h, em 11 tempos distintos (0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 3, 5, 7, 9, 24 e 48 h), foram capturadas imagens das amostras. O objetivo era examinar a dinâmica temporal da mudança de cor conforme a reação progredia. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise no espectrofotômetro UV-Vis, seguindo a mesma disposição apresentada na Figura 14. Foi adicionado 100 µL de AuNPS, seguido por uma variação de 40 a 100 µL da solução de ácido graxo, em incrementos de 10 µL para cada amostra. Posteriormente, completou-se o volume de cada poço com a solução de TX-100 até atingir 200 µL. As varreduras espectrais foram

realizadas no intervalo de 400 a 700 nm, com um passo de 1,0 nm para cada ponto de medição. Este procedimento permitiu uma análise das alterações espectrais ao longo do tempo, proporcionando uma compreensão mais detalhada da cinética associada às reações em estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As AuNPs sintetizadas com redução de citrato de sódio e de NaBH₄ na presença de CTAB apresentaram uma coloração vermelho vivo, os tamanhos obtidos bem como o potencial Zeta e o PDI seguem representados na Tabela 9.

Tabela 9. Tamanho, potencial Zeta e índice de polidispersão das AuNPs sintetizadas por duas diferentes vias.

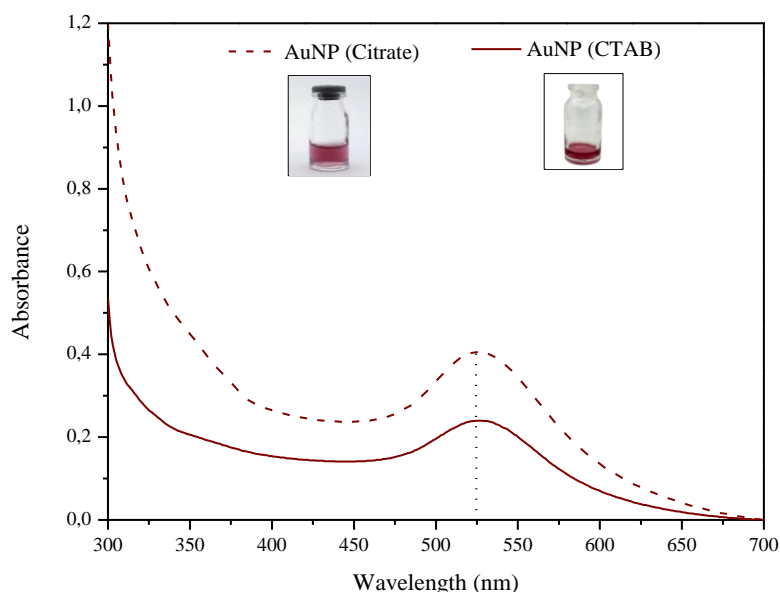
Síntese de AuNPs	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersão (PDI)
Citrato de Sódio	1,20 ± 0,20	-10,3 ± 3,74	0,35 ± 0,18
NaBH₄ + CTAB	1,38 ± 0,34	19,20 ± 3,98	0,70 ± 0,02

Templeton et al., (2000) mostra que a adição rápida do agente redutor gera nanopartículas menores e mais monodispersas. Já Verma et al., (2014), avaliaram que o tamanho e a distribuição das nanopartículas de ouro são afetados pela velocidade da mistura de reagentes, sendo que, quanto maior a velocidade de agitação, menor será a nanoestrutura. A variação no potencial Zeta durante a síntese da AuNP com CTAB pode ser explicada pelo mecanismo proposto por (LIM et al., 2014). Eles sugerem uma abordagem de estabilização de nanopartículas utilizando uma camada de citrato, onde as moléculas de CTAB desempenham um papel importante. Nesse contexto, propõem a formação de uma bicamada na superfície das nanopartículas. Essa bicamada não apenas evita a agregação por meio dos efeitos repulsivos entre as cabeças carregadas externamente, mas também confere uma carga superficial positiva às nanopartículas, como evidenciado pelo potencial Zeta de 19,20 ± 3,98 mV na presença de CTAB. Esses resultados indicam que as AuNPs com CTAB demonstraram maior estabilidade em comparação com as AuNPs reduzidas por citrato sem CTAB, onde foi observado um potencial zeta de -10,3 ± 3,74 mV. No entanto, é importante observar que ambas as condições ainda se encontram na faixa de instabilidade (-30 mV a +30 mV) (DUFFY; LARSSON; HILL, 2012). Apesar da intenção inicial de modificar a camada externa das AuNPs com CTAB para facilitar a solubilização dos ácidos graxos, essa finalidade não foi alcançada. Diante desse

resultado, o projeto prosseguiu com os experimentos utilizando a nanoestrutura produzida pela redução de citrato de sódio.

O gráfico de varredura das nanopartículas, conduzido por citrato de sódio e por NaBH_4 , e diluído na proporção de 1:10 (v/v), é mostrado nas Figuras 15. A absorção máxima em torno de 525 nm, evidenciada em ambas as sínteses, reflete a coloração vermelha presente nas amostras. Esses resultados assemelham-se aos encontrados em estudos anteriores (NARBAND et al., 2009; SANGWAN; SETH, 2022). Contudo, é notável que a síntese utilizando borohidreto de sódio apresenta um pico de absorção ligeiramente inferior, corroborando com resultados previamente encontrados e descritos (CREIGHTON; EADON, 1991; HAIDER; SHABEEB; TH MOHAMMED, 2016). O borohidreto de sódio (NaBH_4) foi incorporado ao método de Turkevich, a fim de simplificar a síntese, eliminando a necessidade de aquecimento (DARUICH DE SOUZA; RIBEIRO NOGUEIRA; ROSTELATO, 2019). As nanopartículas metálicas, principalmente as AuNPs, são exploradas na literatura para determinação colorimétrica óptica de diferentes tipos de substâncias, baseado na mudança de coloração destas nanopartículas quando em contato com um analito específico (AMINI et al., 2018; KUMAR, N.; SETH; KUMAR, 2014; LI, X. et al., 2016; MA et al., 2018; MADKOUR et al., 2023; ZHANG, Y. et al., 2018; ZHOU et al., 2016).

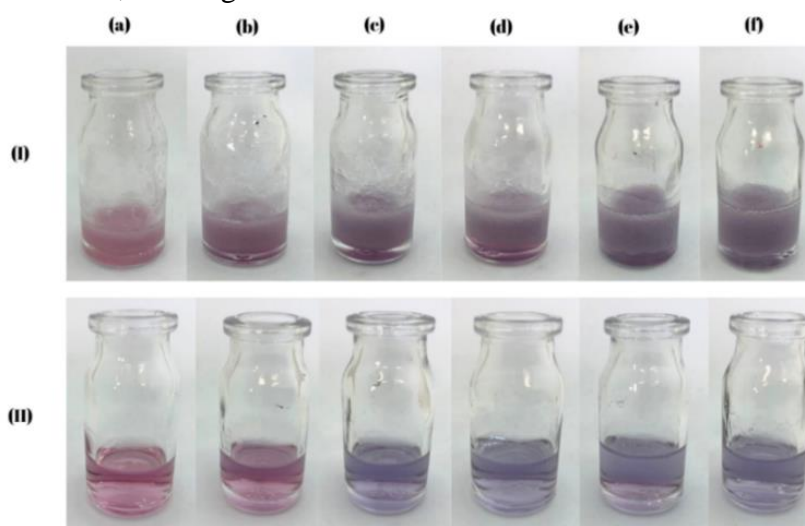
Figura 15. Espectro UV-Vis das nanopartículas de ouro mediada por citrato de sódio e por redução de NaBH_4 com CTAB.



As Figuras 16 e 17 mostram os ensaios colorimétricos, utilizando o álcool isopropílico como solvente, da interação entre AuNP/IPA/AP e AuNP/IPA/AO, respectivamente. É evidente que, com o aumento das concentrações de ácidos graxos, houve uma transição na coloração,

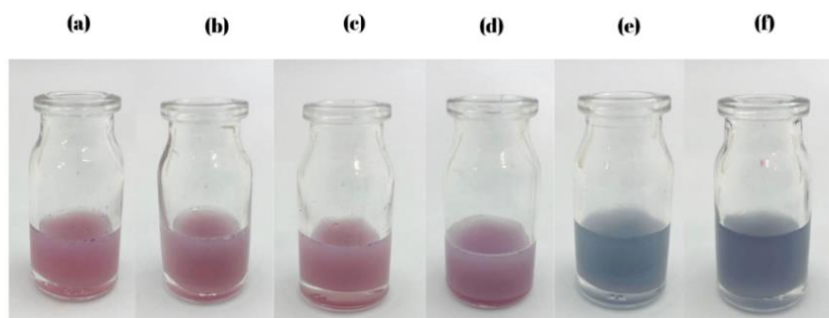
passando de vermelho para azul. Esse fenômeno foi analisado tanto por espectrofotometria UV-Vis quanto por análises de imagem RGB. No entanto, Observa-se na Figura 16-I que as amostras contendo o ácido palmítico (ensaio padrão) apresentaram uma emulsão, e só foi possível a solubilização da solução do ácido graxo com a nanopartícula de ouro quando se adicionou o ácido ascórbico e o surfactante (Dodecil Sulfonato de Sódio). Já no ensaio controle, representado na Figura 16-II, observa-se que as soluções não apresentaram o aspecto de emulsão, visto que não foi adicionado, neste ensaio, o ácido palmítico.

Figura 16. Ensaio colorimétrico da interação de nanopartículas de ouro e álcool isopropílico com ácido palmítico. (I) Ensaio padrão, com a presença de ácido palmítico em diferentes concentrações: (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (II) Ensaio controle – sem a presença de ácido palmítico, com diferentes concentrações de ácido ascórbico: (a) Amostra 1: $2,93 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $4,06 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $5,03 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (d) Amostra 4: $5,87 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (e) Amostra 5: $6,61 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$, (f) amostra 6: $7,25 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$.



Na Figura 17, também é possível observar uma turbidez nas amostras com ácido oleico, entretanto, para este ensaio não foi necessário a utilização do ácido ascórbico e do surfactante (Dodecil Sulfonato de Sódio), uma vez que ocorreu a solubilização do ácido oleico. A maior solubilização do ácido oleico (C:18) em comparação com o ácido palmítico (C:16) pode ser atribuída à natureza da cadeia desses ácidos graxos. O ácido palmítico possui uma cadeia saturada, ao contrário do ácido oleico, o que resulta em uma menor capacidade de dissolução em meios aquosos (SCHAUENSTEIN, 1967).

Figura 17. Ensaio colorimétrico da interação de nanopartículas de ouro e álcool isopropílico na presença, em diferentes concentrações, de ácido oleico: (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$.



A capacidade de solubilização de uma substância orgânica está intrinsecamente relacionada à polaridade de suas ligações. Os ácidos graxos são considerados moléculas anfipáticas, apresentando uma região polar (grupo carboxila) e uma região apolar (cadeia hidrocarbônica). No entanto, devido, geralmente, ao longo comprimento de suas cadeias carbônicas, como observado no ácido palmítico e ácido oleico, pode-se classificar os ácidos graxos como compostos apolares ou com baixa polaridade. Assim, para sua solubilização, são necessários solventes apolares ou de baixa polaridade (NELSON; COX, 2004). As nanopartículas de ouro são sintetizadas em meio aquoso, tornando-as polares. Essa característica dificulta a interação eficiente com os ácidos graxos, resultando em uma solução turva e, conseqüentemente, dificultando as análises no espectrofotômetro. Como alternativa para superar esse desafio, optou-se por utilizar o surfactante Triton X-100, um composto anfifílico não iônico capaz de interagir tanto com substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas (ABU-GHUNMI; BADAWI; FAYYAD, 2014).

Com base nessas informações e na abordagem de Mirgorodskaya et al., (2010), que empregou diversos surfactantes, incluindo o TX-100, para investigar a solubilização de ácidos graxos, ensaios colorimétricos foram conduzidos para analisar a interação das nanopartículas de ouro (AuNPs) na presença de ácido palmítico, ácido oleico e ácido caprílico, além de um ensaio envolvendo a combinação dos três ácidos. O ensaio com TX-100 utilizou concentrações dos ácidos graxos encontradas no leite.

As Figuras 18 e 19 ilustram os ensaios colorimétricos que empregam o TX-100 como solvente para investigar a interação entre as nanopartículas de ouro na presença do ácido palmítico (AuNp/TX-100/AP) e do ácido oleico (AuNP/TX-100/AO), respectivamente.

É perceptível, semelhante ao ensaio com álcool isopropílico, a dificuldade de solubilização do ácido palmítico, uma vez que ainda é evidente um aspecto de emulsão nas

amostras. A alteração de coloração neste ensaio (Figura 18) foi mais sutil em comparação com o ensaio anterior (Figura 16), entretanto, as concentrações de ácido palmítico para o ensaio com Triton X-100 foram mais elevadas. No ensaio com ácido oleico (Figura 19), é notável a redução do aspecto emulsionado das amostras com o uso do Triton X-100. No entanto, assim como no ensaio com ácido palmítico, a mudança de coloração foi mais discreta em comparação com o ensaio anterior (Figura 15).

Figura 18. Ensaio colorimétrico da interação entre AuNPs e TX-100 na presença de ácido palmítico, em diferentes concentrações: (AP₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AP₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AP₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AP₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AP₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AP₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AP₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

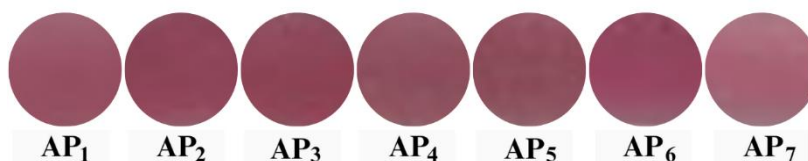
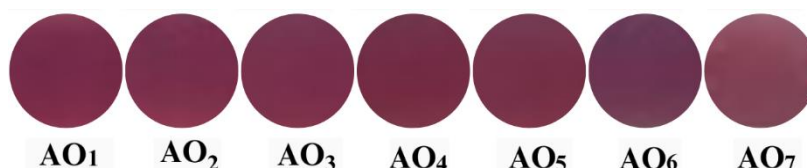


Figura 19. Ensaio colorimétrico da interação entre AuNPs e TX-100 na presença de ácido oleico, em diferentes concentrações: (AO₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AO₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AO₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AO₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AO₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AO₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AO₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



As Figuras 20 e 21 detalham o ensaio colorimétrico que investiga a interação entre as nanopartículas de ouro na presença de Triton X-100 com ácido caprílico e a combinação dos três ácidos graxos (palmítico, oleico e caprílico), respectivamente. No ensaio com ácido caprílico (Figura 20), observou-se uma significativa mudança colorimétrica, sendo este o ensaio que, entre os realizados, apresentou menor aspecto de emulsão. Essa eficácia pode ser justificada, como mencionado anteriormente, pela menor cadeia carbônica do ácido caprílico, composta por apenas 8 carbonos, conferindo-lhe maior solubilidade. Já o ensaio contendo os três ácidos graxos mostrou uma mudança colorimétrica mais pronunciada, especialmente em sua maior concentração (TAG₇). No entanto, ainda é possível observar que a amostra se encontra emulsionada, o que era esperado, considerando a presença de ácidos graxos de cadeias carbônicas mais extensas, como o oleico e o palmítico, na amostra.

Figura 20. Ensaio colorimétrico da interação entre AuNPs e TX-100 na presença de ácido caprílico, em diferentes concentrações: (AC₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AC₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AC₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AC₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AC₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AC₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AC₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

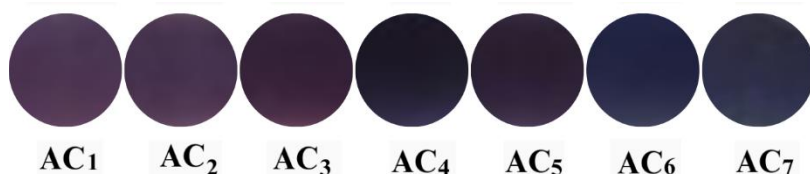


Figura 21. Ensaio colorimétrico da interação entre AuNPs e TX-100 na presença de ácido palmítico (50 %), ácido oleico (45 %) e ácido caprílico (0,05 %), com concentração total de ácido graxo: (TAG₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, TAG₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, TAG₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, TAG₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, TAG₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, TAG₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e TAG₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



Os elétrons livres das nanopartículas de ouro estão confinados em seu espaço de acordo com seu tamanho, e, conseqüentemente, possui uma frequência de oscilação, quando um feixe de ondas eletromagnéticas irradia sobre a nanopartícula, o campo elétrico oscilante faz com que os elétrons de condução oscilem em conjunto, processo esse denominado de ressonância de plasmon de superfície localizada (RPSL) (AI et al., 2021; AKSHAYA et al., 2020). A RPSL é capaz de gerar a interação ressonante dos elétrons livres da nanoestrutura com o campo eletromagnético oscilante da luz em comprimentos de onda visível através de um efeito combinado resultante da absorção ou de espalhamento (XU et al., 2020). Há uma correlação forte entre o pico de ressonância de plasmon de superfície localizada e a estrutura da nanopartícula, uma vez que a RPSL é sensível a alterações no ambiente dielétrico local, ou seja, à medida que a forma ou tamanho da nanopartícula se altera, ocorre também a mudança da geometria da superfície, causando assim uma alteração na densidade do campo elétrico na superfície (LI, C. H. et al., 2023). Assim, leituras no espectro UV-Vis foram realizadas com o intuito de analisar as mudanças colorimétricas que estão ocorrendo nos ensaios.

A Figura 22(a) mostra os espectros de absorção da nanopartícula de ouro pura e após a adição de diferentes concentrações de ácido palmítico em conjunto com o ácido ascórbico e álcool isopropílico, onde observa-se que com o aumento da concentração da amostra, ocorreu uma diminuição na absorbância no pico do comprimento de onda, até o momento em que se observou a ausência desse pico nas maiores concentrações (amostras 5 e 6). Para possível análise da influência da AuNP com o ácido palmítico puro, foi realizado o ensaio controle, onde os espectros estão na Figura 22(b), é possível analisar a interação entre a nanopartícula de ouro

e o ácido ascórbico. Percebe-se além da diminuição da absorvância, a ocorrência de um desvio no pico de comprimento de onda para a direita, chegando a um comprimento de onda de 600 nm na maior concentração (amostra 6). A partir da diferença entre os dados obtidos no espectrofotômetro do ensaio padrão e do ensaio controle (AP/AA-AA), foi possível determinar os espectros do ácido palmítico puro, mostrado na Figura 23.

Figura 22. Espectros UV-Vis dos ensaios colorimétricos padrão e de controle do ensaio contendo álcool isopropílico e diferentes concentrações de ácido palmítico. (a) Interação de AuNPs com ácido palmítico e ácido ascórbico. (b) Interação entre AuNPs com ácido ascórbico.

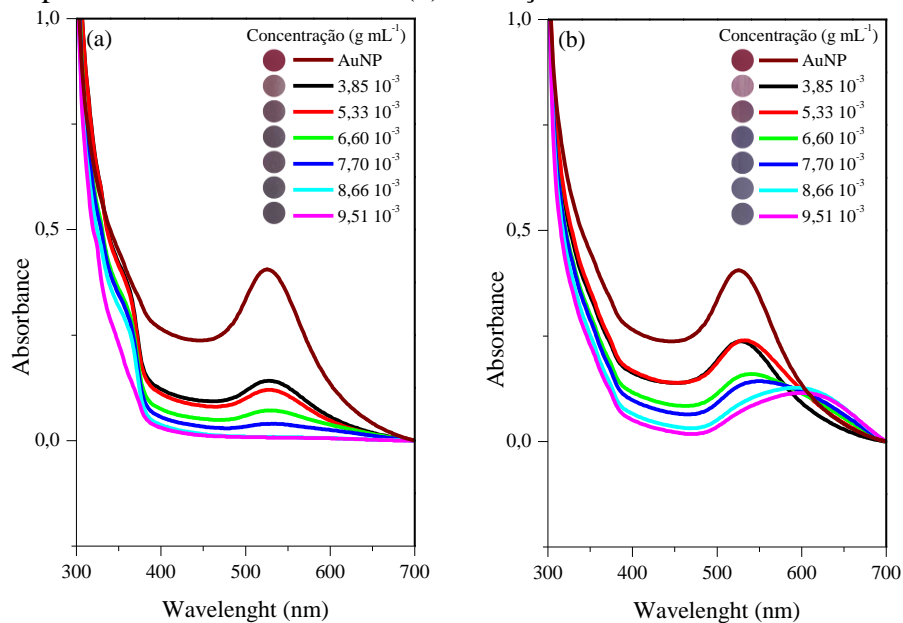
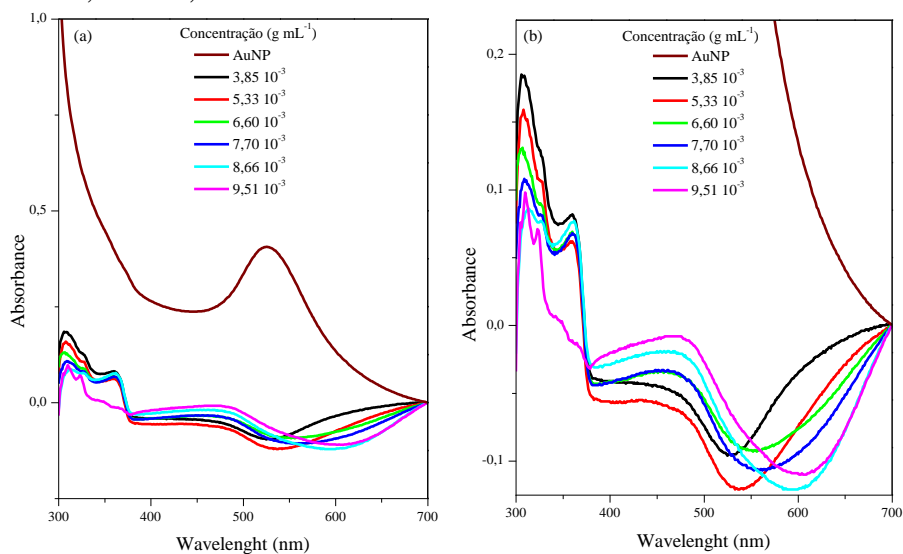


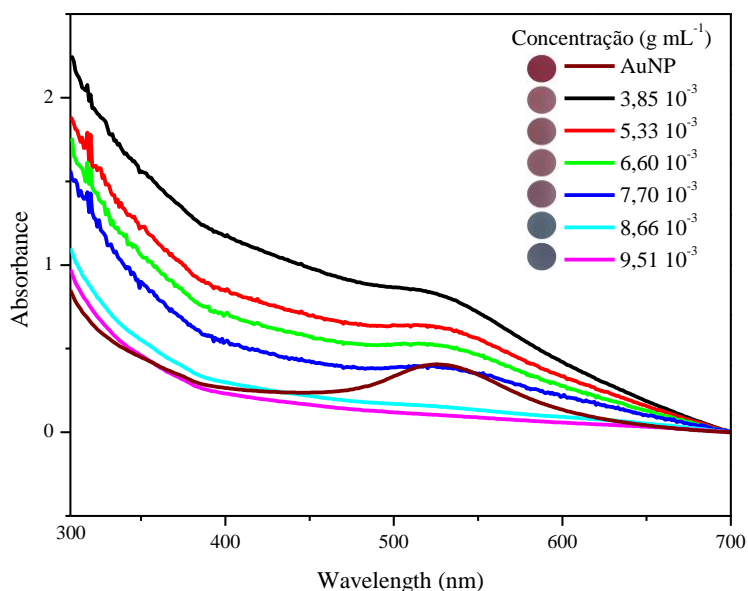
Figura 23. Espectros UV-Vis da interação de AuNPs com diferentes concentrações de ácido palmítico em escalas de absorvância distintas (AuNP/IPA/AP). (a) Absorvância de -0,25 a 1,0. (b) Absorvância de -0,125 a 0,225.



Observa-se que houve uma redução não proporcional da absorbância no pico da AuNP pura, e um deslocamento no comprimento de onda para esquerda, em aproximadamente 450 nm, indicando que as amostras estão absorvendo a cor azul e as amostras deveriam apresentar a coloração amarela o que não condiz com as fotos obtidas no ensaio colorimétrico (Figura 16). Essa disparidade pode indicar uma interação mais significativa da nanopartícula de ouro com o ácido ascórbico em comparação ao ácido palmítico. Alternativamente, a presença de uma emulsão nas amostras pode ter influenciado a leitura no espectro, destacando a complexidade da interpretação desses resultados.

A Figura 24 mostra os espectros de absorção da nanopartícula de ouro pura e após a adição de diferentes concentrações de ácido oleico na presença de álcool isopropílico, onde é possível observar uma correlação entre a diminuição da absorbância à medida que a concentração do ácido graxo aumenta. Esperava-se um deslocamento do pico de comprimento de onda para a esquerda, de forma a comprovar o que está visível no ensaio demonstrado na Figura 17, no entanto, acredita-se que a formação de emulsão nas amostras pode ter influenciado a leitura dos espectros, como pode ter ocorrido com os ensaios utilizando o ácido palmítico.

Figura 24. Espectros de absorção UV-Vis da interação entre AuNPs e diferentes concentrações de ácido oleico.



O ácido ascórbico é um agente redutor com excelentes propriedades de solubilização, capaz de reduzir as nanopartículas de ouro, bem como auxiliar na estabilidade da molécula (NIKOBAKHT; EL-SAYED, 2003; SELVA SHARMA; SASIKUMAR; ILANCHELIAN, 2018; SUN, Xiaojun et al., 2017). O ácido palmítico com o auxílio do ácido ascórbico, quando

em contato com as AuNPs na presença de álcool isopropílico, podem ter induzido a mudança estrutural na nanopartícula, e conseqüentemente, afetado a coloração da amostra. No entanto, observando o espectro da interação da AuNP apenas com o ácido ascórbico, percebe-se que há um deslocamento do comprimento de onda para a direita, enquanto o espectro da interação da AuNP apenas com o ácido palmítico, há um deslocamento para esquerda. Quando se analisa a interação de ambos não ocorre esse deslocamento, apenas a diminuição do pico até que se forme uma reta, mostrando que a alteração colorimétrica ocorreu a partir da utilização das duas substâncias, sendo que o ácido ascórbico pode ter auxiliado a interação do ácido palmítico com a AuNP, devido à grande dificuldade de solubilização desse ácido graxo.

Os espectros de absorção da interação do ensaio AuNP/IPA/AO demonstraram que as amostras em maior concentração (Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ e Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$) apresentaram um pico mais largo e com maior valor de absorbância se comparado com a nanopartícula de ouro puro. Além disso, houve uma diminuição no pico de absorção à medida que a concentração do ácido graxo aumentou, e a linha de absorbância continua aumentando, provavelmente devido à emulsão formada.

As Figuras 25 e 26 exibem os espectros de absorção UV-Vis resultantes da interação entre as nanopartículas de ouro na presença de ácido palmítico (AuNP/TX-100/AP) e ácido oleico (AuNP/TX-100/AO), respectivamente, em diferentes concentrações. Observa-se que, apesar das mudanças visuais notadas na colorimetria durante os ensaios, essa variação não foi refletida nos espectros de absorção. Como evidenciado nas Figuras 25 e 26, os picos de absorção nos ensaios foram superiores à amostra de controle (AuNP) em 525 nm, mas não apresentaram variações proporcionais à concentração de ácido palmítico.

Como anteriormente mencionado, o pico em 525 nm está associado à coloração vermelha, e a análise colorimétrica do ensaio com ácido palmítico e com o ácido oleico revelou uma alteração visível na tonalidade do vermelho entre as diferentes concentrações. Assim, era esperado observar alguma alteração nos picos de absorção nos comprimentos de onda correspondentes à cor vermelha (490-570 nm) ou, pelo menos, que a variação na absorbância em 525 nm ocorresse de maneira proporcional ao aumento da concentração de ácido graxo. Entretanto, tal expectativa não ocorreu. A justificativa empregada no ensaio anterior pode ser estendida a este experimento, uma vez que as amostras exibem turbidez, o que implica em desafios para a leitura precisa do espectro. Nesse contexto, o feixe de luz encontra obstáculos significativos ao atravessar a amostra, impactando a qualidade e a confiabilidade da medição espectroscópica (PICOLLO; ACETO; VITORINO, 2019).

Figura 25. Espectro de absorção UV-Vis do ensaio contendo AuNps e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (AP₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AP₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AP₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AP₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AP₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AP₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AP₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹. (a) Absorbância de 0,0 a 2,0. (b) Absorbância de 0,0 a 1,0.

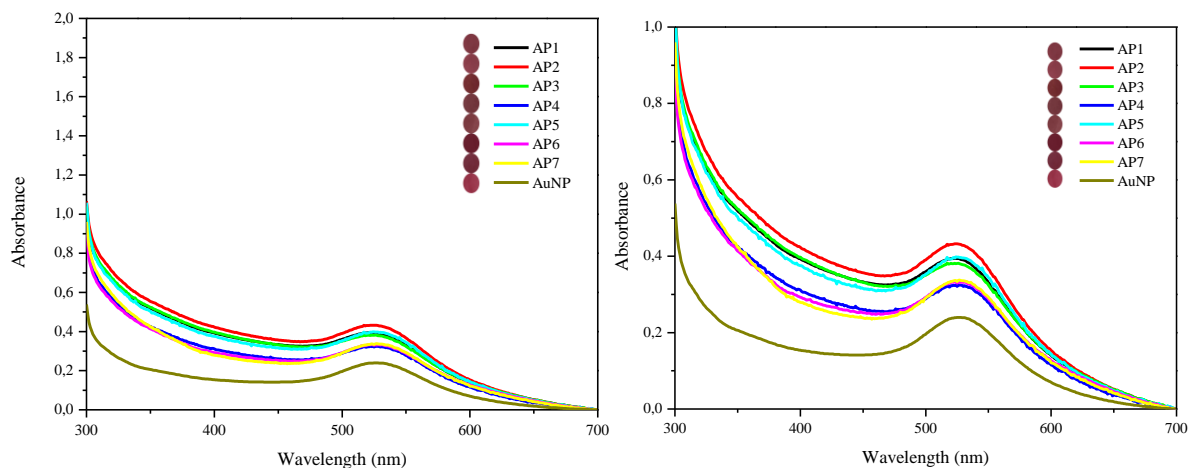
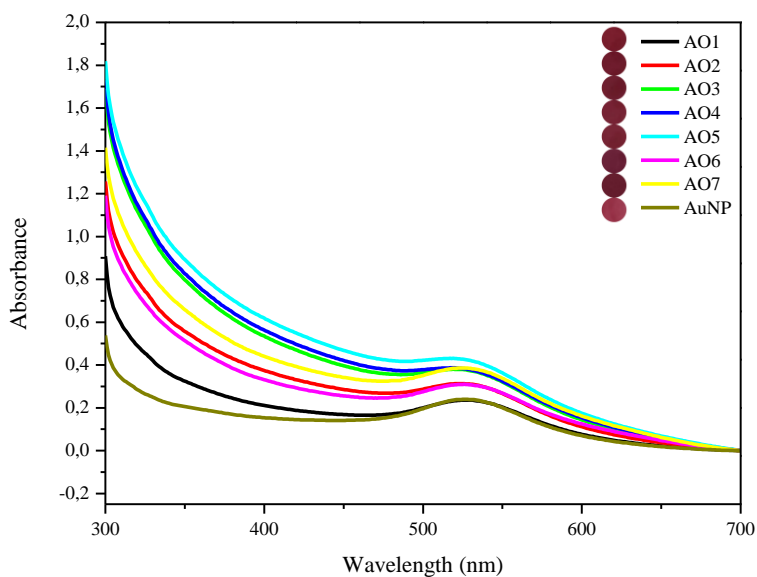


Figura 26. Espectro de absorção UV-VIs do ensaio contendo AuNps e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido oleico (AO₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AO₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AO₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AO₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AO₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AO₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AO₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



As Figuras 27 e 28 exibem os espectros de absorção UV-Vis resultantes da interação entre as nanopartículas de ouro e o Triton X-100 na presença do ácido caprílico (AC) e dos três ácidos combinados (TAG), respectivamente, em diferentes concentrações. É notável que, o ensaio com ácido caprílico destacou-se ao apresentar uma mudança colorimétrica mais marcante em comparação com os demais ensaios. Essa alteração é evidenciada no espectro de absorção da Figura 27, onde é possível observar um deslocamento do pico de absorção de ~525 nm

(vermelho) para ~650 nm (azul). Essa transição está de acordo com as mudanças visuais observadas nos ensaios, onde a coloração evolui do vermelho para o azul à medida que a concentração de ácido caprílico aumenta. Dentre os ácidos graxos analisados, o ácido caprílico, de menor cadeia carbônica, demonstrou maior eficácia em termos de solubilização. Conseqüentemente, a amostra exibiu menor turbidez, permitindo uma clara detecção da mudança colorimétrica no espectro UV-Vis.

Figura 27. Espectro de absorção UV-Vis do ensaio contendo AuNps e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico (AC₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AC₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AC₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AC₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AC₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AC₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AC₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹. (a) Absorbância de 0,0 a 2,0. (b) Absorbância de 0,0 a 0,8.

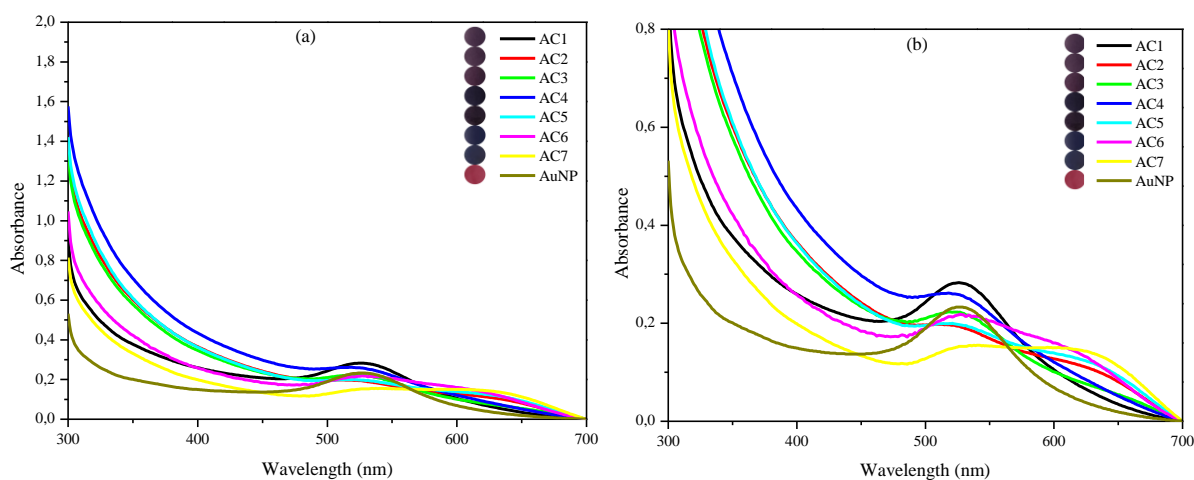
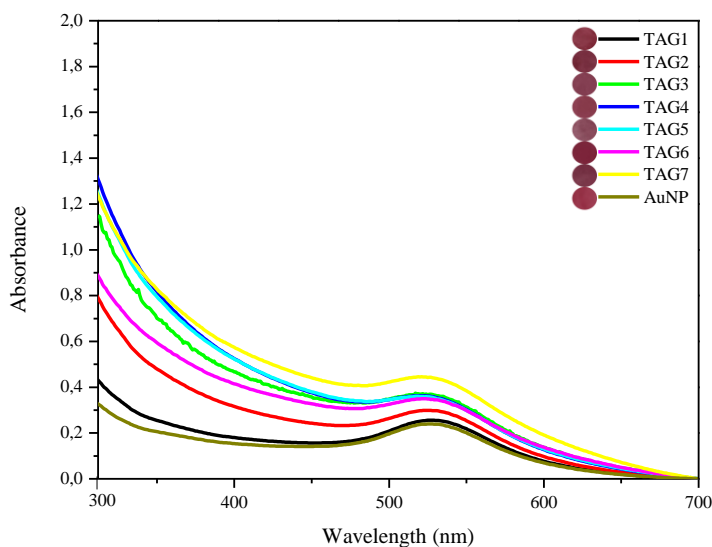


Figura 28. Espectro de absorção UV-Vis do ensaio contendo AuNps e TX-100 na presença de diferentes concentrações do conjunto dos ácidos graxos: ácido palmítico, ácido oleico e ácido caprílico. (TAG₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, TAG₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, TAG₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, TAG₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, TAG₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, TAG₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e TAG₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



Em contrapartida, os espectros de absorção dos ensaios colorimétricos que incluem os três ácidos graxos em conjunto, conforme Figura 28, exibiram o mesmo comportamento observado nos ensaios com ácido palmítico e ácido oleico. Tal resultado era previsível, considerando que a maior parte da amostra é composta por esses ácidos graxos. No entanto, é notável que a variação na absorbância no pico de ~ 525 nm, embora seja superior à do pico das nanopartículas de ouro puras, demonstrou um aumento proporcional à concentração crescente dos ácidos graxos totais.

As Figura 29 e 30 mostram os histogramas gerados para a interação entre AuNps e álcool isopropílico na presença do ácido palmítico e ácido oleico, respectivamente. Onde as linhas sólidas representam o histograma RGB de cada amostra e as linhas pontilhadas representam o histograma RGB das nanopartículas de ouro pura.

Figura 29. Histograma RGB do ensaio colorimétrico controle utilizando diferentes concentrações de ácido palmítico (AuNP/IPA/AP): (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$.

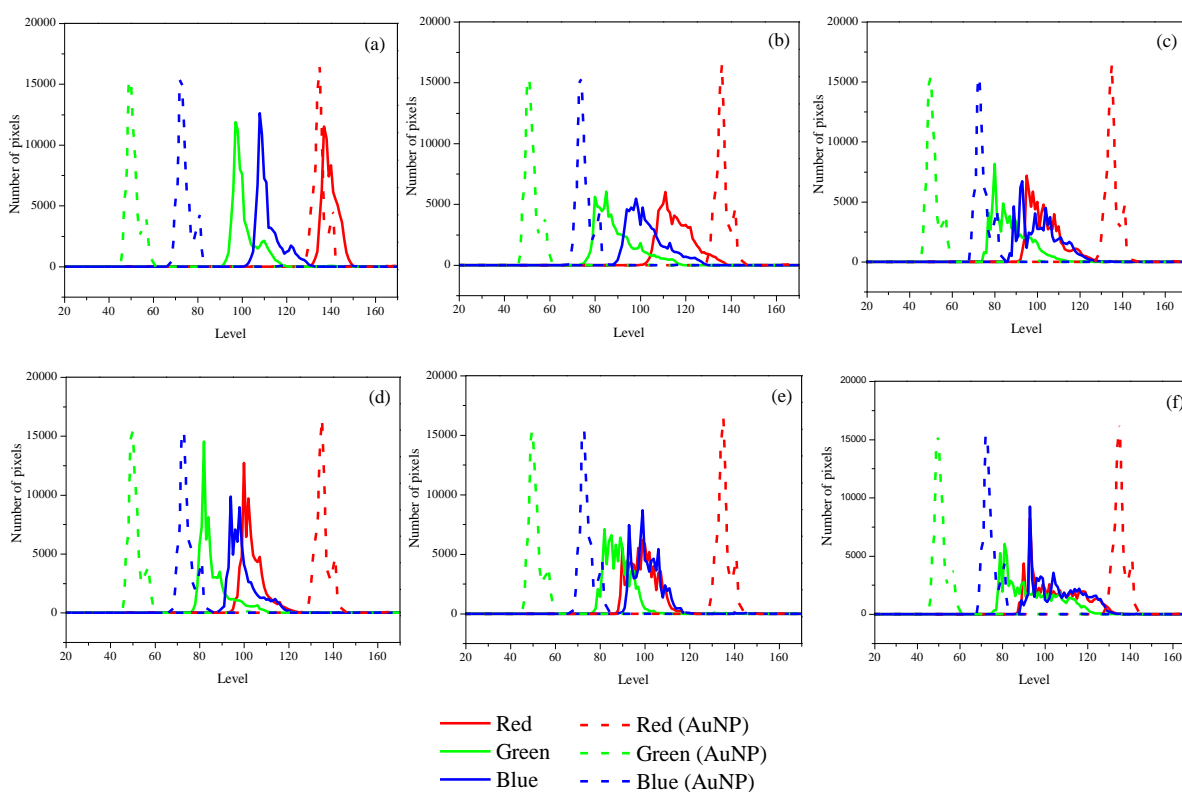
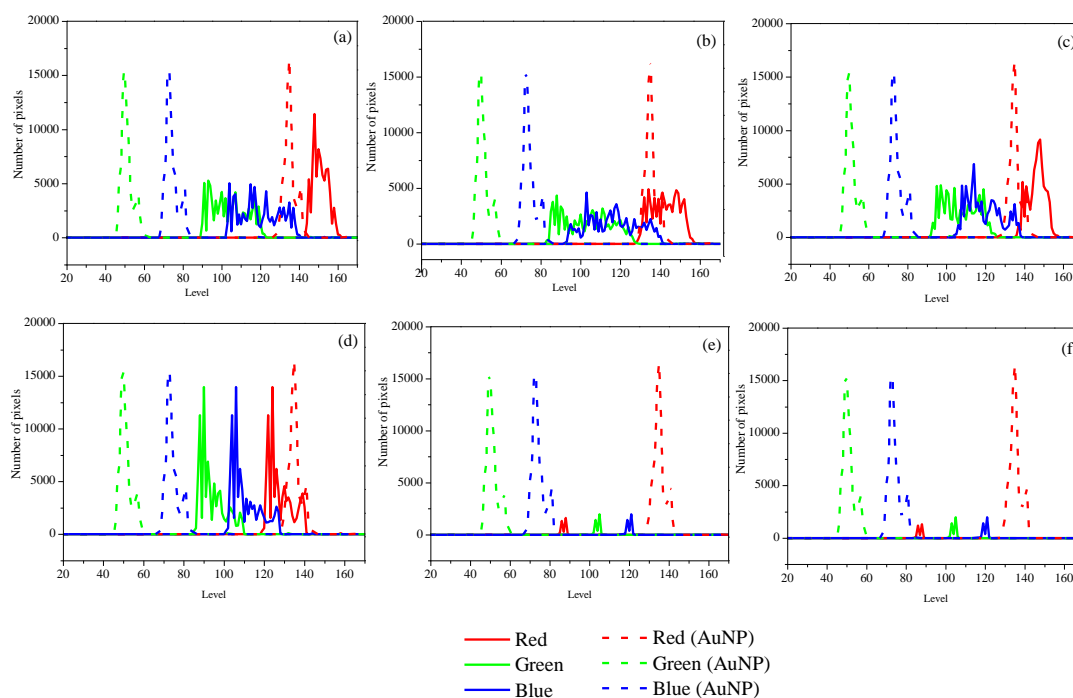


Figura 30. Histograma RGB do ensaio colorimétrico utilizando diferentes concentrações de ácido oleico (AuNP/IPA/AO): (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$; (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$.



Na amostra 1, com uma concentração mais baixa de ácido graxo, observa-se que o pico na região vermelha é proeminente, indicando que a coloração vermelha possui maior destaque em comparação com o verde e o azul. Com o aumento da concentração dos ácidos graxos, ocorre uma diminuição do nível de vermelho e um aumento do nível de azul. No histograma correspondente ao ácido oleico (Figura 30), essa transição é completa, evidenciada pelo azul atingindo um nível mais alto e o vermelho, um nível mais baixo, conforme já observado na amostra 5. Por outro lado, no ensaio com ácido palmítico (Figura 29), nota-se uma redução no nível de vermelho; contudo, o azul permanece praticamente constante. A partir da amostra 3, as bandas de azul e vermelho se igualam. Acredita-se que, ao aumentar ainda mais a concentração, o vermelho continuará a deslocar-se para a esquerda até que ocorra a completa inversão das cores.

As Figuras 31 e 32 apresentam os histogramas RGB da interação entre as nanopartículas de ouro e o Triton X-100, na presença de ácido palmítico e ácido oleico, respectivamente. Observa-se que a interação das AuNPs com ácido palmítico, Figura 31, resulta em pequenos deslocamentos nos níveis de vermelho e azul, de maneira não linear, à medida que a concentração do ácido graxo aumenta. O nível de vermelho permanece praticamente constante, mantendo-se em torno de ~ 120 na maioria das concentrações de ácido palmítico, com uma leve

diminuição para ~100 apenas na amostra AP₆ ($36,080 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$). No entanto, nota-se que o nível de vermelho nas amostras resultantes da interação entre as AuNPs e o ácido palmítico é inferior quando comparado ao nível de vermelho das nanopartículas de ouro puras (~140 a 160). De maneira semelhante, como ilustrado na Figura 32 para o ácido oleico, apesar de as amostras manterem o nível de vermelho em ~120 a 140 em todas as concentrações, quando comparado com o vermelho das AuNPs puras, é possível observar uma diminuição desse nível.

Quanto ao nível de azul, no ensaio com ácido palmítico, observa-se que permanece entre ~40 e 60 na maioria das concentrações, com um pequeno aumento apenas na amostra AP₂ ($11,275 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), atingindo ~80. Por outro lado, no ensaio com ácido oleico, nota-se um deslocamento do nível de azul para a direita, indicando um aumento do nível de azul a medida em que a concentração de AO aumenta. Na amostra de menor concentração AO₁ ($9,020 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), o nível de azul situa-se entre ~60 e 80, enquanto na maior concentração AO₇ ($72,160 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), o nível de azul varia entre ~80 e 100.

Figura 31. Histograma RGB do ensaio colorimétrico (AuNP/TX-10/AP) entre AuNPs e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (AP₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AP₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AP₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AP₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AP₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AP₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AP₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL^{-1} .

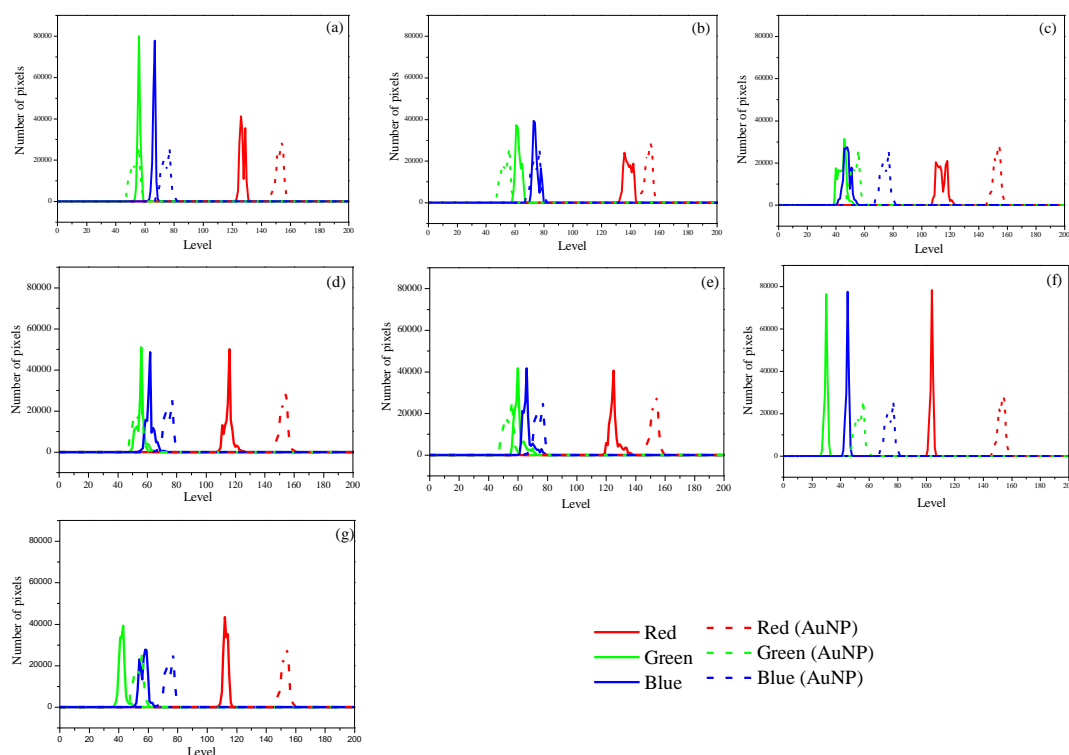
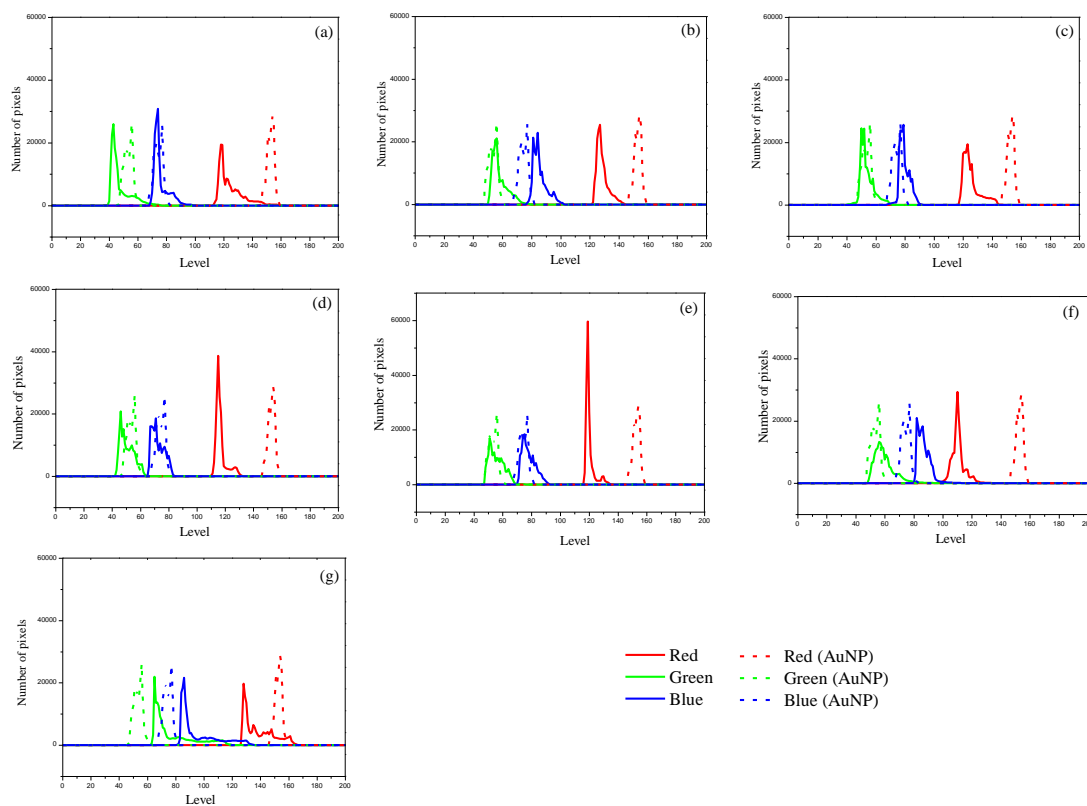


Figura 32. Histograma RGB do ensaio colorimétrico (AuNP/TX-100/AO) entre AuNPs e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido oleico (AO₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AO₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AO₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AO₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AO₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AO₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AO₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

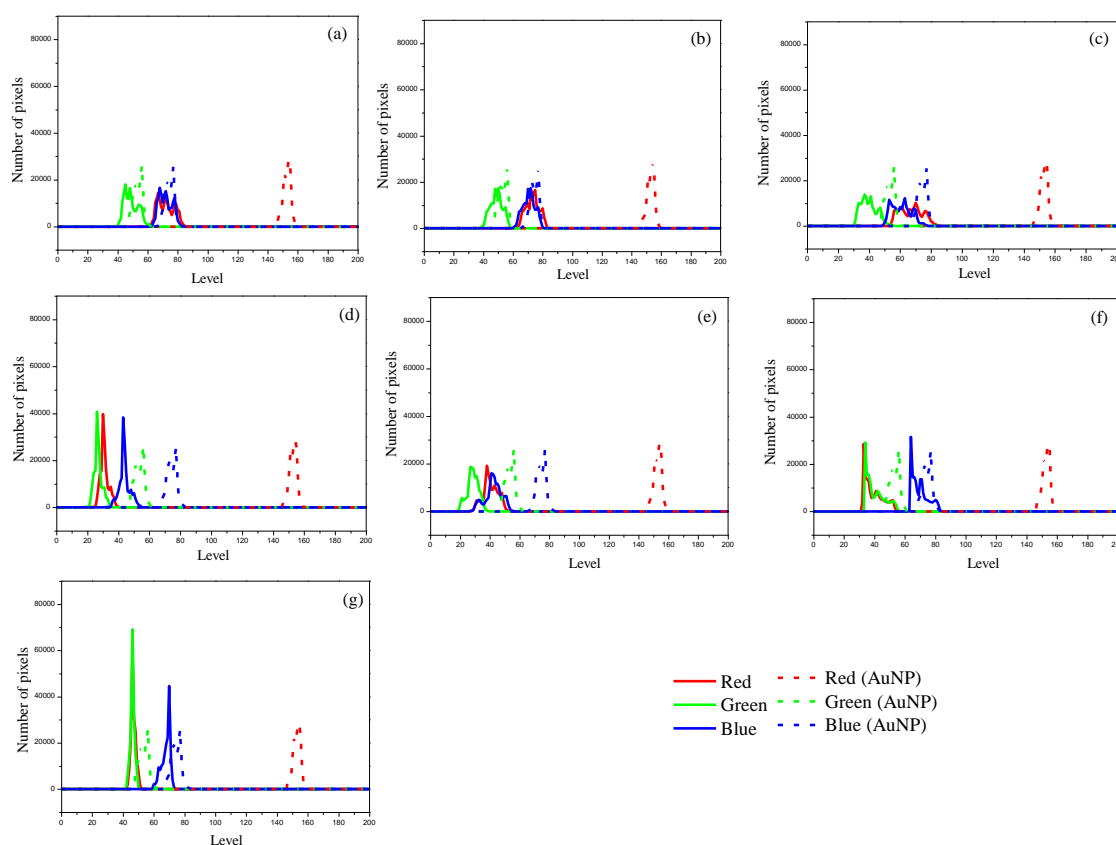


Os histogramas RGB referentes aos ensaios com ácido caprílico e os três ácidos graxos em conjunto estão apresentados nas Figuras 33 e 34, respectivamente. Como observado anteriormente, o ensaio com ácido caprílico destacou-se pela expressiva alteração visual na coloração. Analisando o histograma da Figura 33, nota-se que o nível de vermelho é mais elevado (~150-160) do que o azul (~60-80) nas nanopartículas de ouro puras. Entretanto, no ensaio da interação entre as AuNPs e o ácido caprílico, ocorre a inversão desses níveis a partir da amostra AP₆ ($36,080 \cdot 10^{-3}$ g mL⁻¹). Neste ensaio, ocorre uma redução nos níveis de vermelho, previamente situados em aproximadamente 60-80 para 40 à medida que a concentração do ácido graxo aumenta. Essa diminuição faz com que o nível da tonalidade azul supere o vermelho, estando em concordância com as observações visuais do ensaio, que exibem uma coloração mais intensamente azulada.

No ensaio que envolve os três ácidos graxos em conjunto, é possível observar uma certa similaridade no histograma, Figura 34, quando comparado com os histogramas obtidos nos ensaios com ácido oleico e palmítico. O nível da tonalidade vermelha mantém-se praticamente constante em todas as concentrações, variando entre ~120 e 140, o que é inferior ao nível de

vermelho registrado para as AuNPs puras ($\sim 150 - 160$). Em relação à cor azul, observa-se um padrão semelhante, com o nível de azul permanecendo estável em ~ 60 e 80 na maioria das amostras. Uma exceção ocorre na amostra TAG₅ ($18,040 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), onde se nota um discreto deslocamento para a direita ($\sim 80 - 100$). Nesse ponto, o nível de azul ultrapassa o da AuNP pura ($\sim 60 - 80$).

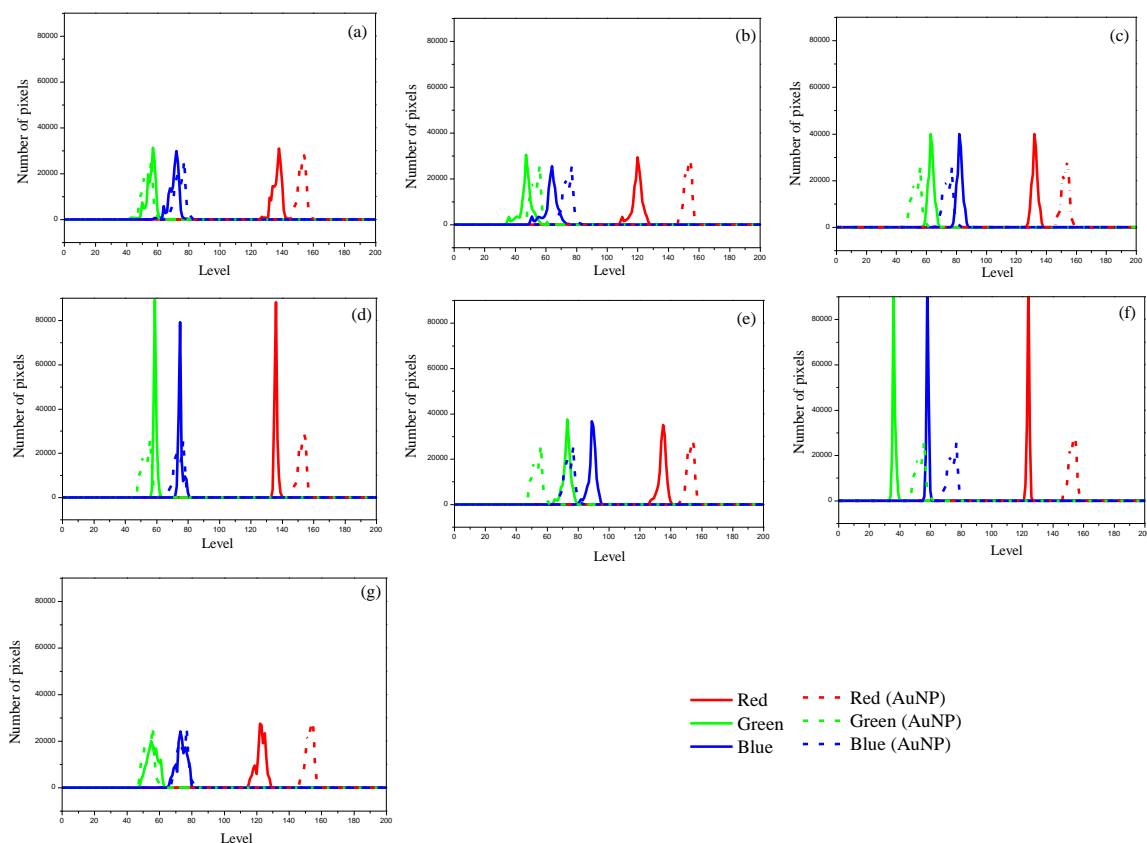
Figura 33. Histograma RGB do ensaio colorimétrico (AuNP/TX-100/AC) entre AuNPs e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico (AC₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AC₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AC₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AC₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AC₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AC₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AC₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



No ensaio que envolve os três ácidos graxos em conjunto, é possível observar uma certa similaridade no histograma, Figura 34, quando comparado com os histogramas obtidos nos ensaios com ácido oleico e palmítico. O nível da tonalidade vermelha mantém-se praticamente constante em todas as concentrações, variando entre ~ 120 e 140 , o que é inferior ao nível de vermelho registrado para as AuNPs puras ($\sim 150 - 160$). Em relação à cor azul, observa-se um padrão semelhante, com o nível de azul permanecendo estável em ~ 60 e 80 na maioria das amostras. Uma exceção ocorre na amostra TAG₅ ($18,040 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), onde se nota um discreto

deslocamento para a direita ($\sim 80 - 100$). Nesse ponto, o nível de azul ultrapassa o da AuNP pura ($\sim 60 - 80$).

Figura 34. Histograma RGB do ensaio colorimétrico (AuNP/TX-100/TAG) entre AuNPs e TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico (TAG₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, TAG₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, TAG₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, TAG₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, TAG₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, TAG₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e TAG₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



Na Tabela 10, são apresentados os valores médios de RGB, bem como os valores de CV (valor de cor) para as intensidades de vermelho e azul, calculados pela equação 1 e 2, em cada ensaio da interação entre as AuNPs e o álcool isopropílico na presença de ácido palmítico e ácido oleico. Enquanto na Tabela 11, esses dados estão representados para o ensaio contendo AuNPs e Triton X-100 na presença de ácido palmítico, ácido oleico, ácido caprílico e no conjunto dos ácidos. O termo CV (red) denota a intensidade do componente vermelho, enquanto CV (blue) representa a intensidade do componente azul, ambos em relação à intensidade total dos outros componentes (vermelho, verde e azul). A escala padrão RGB utiliza números inteiros de 0 a 255 para cada uma das três cores, onde (0,0,0) representa preto e (255,255,255) corresponde à cor branca (RAJAMANIKANDAN; ILANCHELIAN, 2022)

Tabela 10. Valores de RGB e CV para ensaio AuNP/IPA na presença de ácido palmítico (AP) e ácido oleico (AO) em diferentes concentrações.

AG	Concentração (g/mL)	R	G	B	CV (RED)	CV (BLUE)
AP	$3,85 \cdot 10^{-3}$	$111,67 \pm 1,53$	$88,67 \pm 1,53$	$100,67 \pm 1,53$	-0,431 ^{Aa}	-0,476 ^{Bb}
	$5,33 \cdot 10^{-3}$	$103,67 \pm 4,16$	$83,67 \pm 4,93$	$97,67 \pm 4,16$	-0,439 ^{Aa}	-0,465 ^{Bb}
	$6,60 \cdot 10^{-3}$	$87,33 \pm 5,13$	$70,67 \pm 6,66$	$89,67 \pm 2,52$	-0,453 ^{Aa}	-0,441 ^{Bb}
	$7,70 \cdot 10^{-3}$	$98,33 \pm 4,72$	$85,67 \pm 2,52$	$103,33 \pm 4,04$	-0,466 ^{Aa}	-0,444 ^{Bb}
	$8,66 \cdot 10^{-3}$	$85,67 \pm 2,52$	$77,33 \pm 3,05$	$92,67 \pm 3,51$	-0,475 ^{Aa}	-0,441 ^{Bb}
	$9,51 \cdot 10^{-3}$	$92,67 \pm 4,51$	$88,33 \pm 5,03$	$104,33 \pm 5,03$	-0,488 ^{Aa}	-0,437 ^{Bb}
AO	$3,85 \cdot 10^{-3}$	$112,67 \pm 2,01$	$89,33 \pm 6,03$	$85,33 \pm 1,53$	-0,406 ^{Aa}	-0,527 ^{Bb}
	$5,33 \cdot 10^{-3}$	$101,33 \pm 4,04$	$80,67 \pm 6,43$	$78,67 \pm 3,05$	-0,410 ^{Aa}	-0,520 ^{Bb}
	$6,60 \cdot 10^{-3}$	$105,33 \pm 3,78$	$85,33 \pm 2,52$	$89,67 \pm 4,73$	-0,425 ^{Aa}	-0,495 ^{Bb}
	$7,70 \cdot 10^{-3}$	$95,67 \pm 2,31$	$84,67 \pm 4,04$	$87,33 \pm 1,52$	-0,447 ^{Aa}	-0,486 ^{Bb}
	$8,66 \cdot 10^{-3}$	$80,33 \pm 1,53$	$97,67 \pm 4,16$	$90,67 \pm 1,53$	-0,524 ^{Aa}	-0,472 ^{Bb}
	$9,51 \cdot 10^{-3}$	$76,67 \pm 2,08$	$81,33 \pm 5,51$	$100,33 \pm 4,51$	-0,527 ^{Aa}	-0,411 ^{Bb}

Resultados expressos como médias \pm desvio padrão. Teste tukey determinando diferenças significativas entre os valores encontrados de RGB ($p < 0,05$). Subscrito A-B: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por concentração. Subscrito a-b: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por ácido graxo.

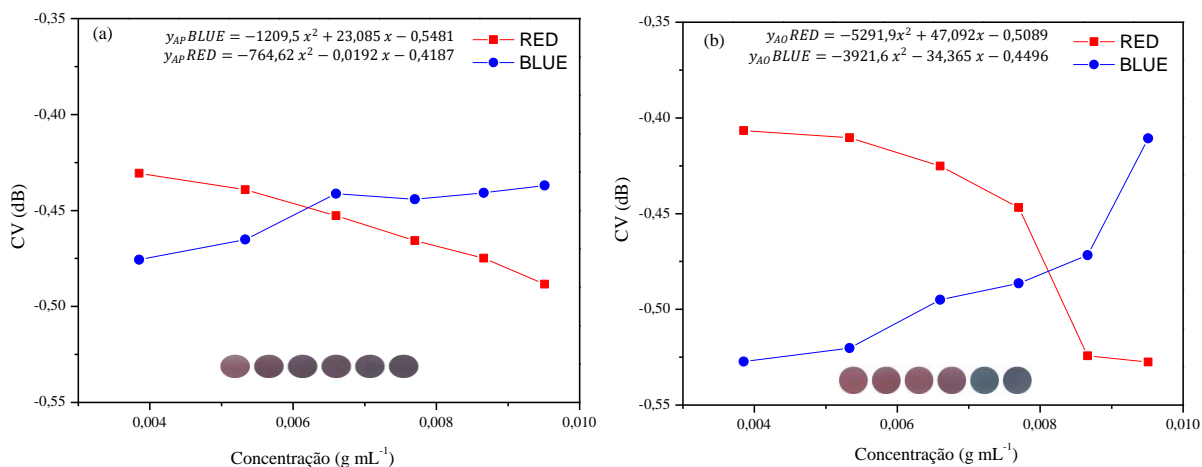
Gráficos ilustrando os parâmetros de CV vermelho e azul em relação à concentração de ácido graxo nos ensaios colorimétricos (AuNps/IPA) utilizando ácido palmítico e ácido oleico estão representados nas Figuras 35, bem como as respectivas equações das retas. Observa-se que à medida que a concentração dos ácidos graxos aumenta, os parâmetros CV da cor vermelha diminuem, indicando que mais componentes vermelhos foram absorvidos devido à agregação das nanopartículas de ouro. Essa agregação resulta na alteração da cor para o azul, corroborando com o aumento dos parâmetros CV da cor azul. Os resultados obtidos pelos parâmetros CV estão em conformidade com as mudanças visuais na coloração encontradas nos ensaios. Para o ácido palmítico foi estabelecida uma correlação linear de $R^2=0,9972$ para o vermelho e $R^2 = 0,9241$ para o azul. Já para o ácido oleico $R^2=0,9330$ (vermelho) e $R^2= 0,9304$ (azul).

Tabela 11. Valores de RGB e CV para ensaio AuNP/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácidos graxos.

Ácido graxo	Concentração (g/mL)	R	G	B	CV (RED)	CV (BLUE)
Ácido palmítico	9,020 10 ⁻³	73,8 ± 1,48	43,2 ± 1,30	44,6 ± 1,52	-0,337 ± 0,005 ^{Aa}	-0,565 ± 0,008 ^{Bd}
	11,275 10 ⁻³	76,4 ± 2,51	46,8 ± 2,17	49,2 ± 2,59	-0,344 ± 0,010 ^{Aa}	-0,561 ± 0,018 ^{Bd}
	13,530 10 ⁻³	68,8 ± 3,70	41,8 ± 3,27	44,4 ± 3,29	-0,343 ± 0,009 ^{Aa}	-0,561 ± 0,019 ^{Bd}
	15,785 10 ⁻³	82,0 ± 1,87	51,2 ± 1,79	54,8 ± 1,92	-0,362 ± 0,004 ^{Aa}	-0,538 ± 0,004 ^{Bd}
	18,044 10 ⁻³	76,2 ± 1,48	47,2 ± 1,30	48,4 ± 1,82	-0,357 ± 0,005 ^{Aa}	-0,542 ± 0,009 ^{Bd}
	36,080 10 ⁻³	64,6 ± 1,14	39,2 ± 1,30	46,6 ± 1,52	-0,349 ± 0,019 ^{Aa}	-0,530 ± 0,022 ^{Bd}
	72,160 10 ⁻³	93,0 ± 1,87	65,4 ± 2,41	72,8 ± 1,64	-0,367 ± 0,029 ^{Aa}	-0,527 ± 0,027 ^{Bd}
Ácido oleico	9,020 10 ⁻³	76,0 ± 1,41	39,2 ± 1,09	36,8 ± 1,30	-0,282 ± 0,038 ^{Ac}	-0,615 ± 0,031 ^{Be}
	11,275 10 ⁻³	73,8 ± 0,84	38,2 ± 0,45	37,4 ± 0,89	-0,302 ± 0,005 ^{Ac}	-0,605 ± 0,007 ^{Be}
	13,530 10 ⁻³	69,0 ± 2,34	35,0 ± 1,73	34,8 ± 1,92	-0,303 ± 0,005 ^{Ac}	-0,599 ± 0,007 ^{Be}
	15,785 10 ⁻³	72,6 ± 2,07	38,4 ± 1,67	38,6 ± 2,07	-0,313 ± 0,003 ^{Ac}	-0,587 ± 0,005 ^{Be}
	18,044 10 ⁻³	71,4 ± 1,52	37,4 ± 1,52	37,2 ± 1,30	-0,311 ± 0,005 ^{Ac}	-0,591 ± 0,009 ^{Be}
	36,080 10 ⁻³	64,6 ± 1,41	33,0 ± 0,70	34,4 ± 1,52	-0,322 ± 0,013 ^{Ac}	-0,561 ± 0,025 ^{Be}
	72,160 10 ⁻³	64,8 ± 0,84	35,6 ± 0,89	38,8 ± 0,84	-0,324 ± 0,008 ^{Ac}	-0,564 ± 0,010 ^{Be}
Ácido caprílico	9,020 10 ⁻³	31,8 ± 1,64	22,8 ± 1,64	35,0 ± 1,22	-0,457 ± 0,007 ^{Ab}	-0,406 ± 0,006 ^{Bf}
	11,275 10 ⁻³	18,8 ± 0,44	13,8 ± 0,44	25,6 ± 0,54	-0,508 ± 0,020 ^{Ab}	-0,359 ± 0,010 ^{Bf}
	13,530 10 ⁻³	20,2 ± 1,09	16,0 ± 1,00	27,8 ± 1,30	-0,526 ± 0,028 ^{Ab}	-0,349 ± 0,014 ^{Bf}
	15,785 10 ⁻³	24,2 ± 1,30	18,8 ± 0,83	33,0 ± 1,00	-0,525 ± 0,030 ^{Ab}	-0,367 ± 0,007 ^{Bf}
	18,044 10 ⁻³	34,8 ± 5,89	35,4 ± 5,94	51,0 ± 6,55	-0,538 ± 0,008 ^{Ab}	-0,383 ± 0,012 ^{Bf}
	36,080 10 ⁻³	34,3 ± 1,82	27,6 ± 1,52	46,0 ± 2,23	-0,510 ± 0,014 ^{Ab}	-0,362 ± 0,009 ^{Bf}
	72,160 10 ⁻³	32,4 ± 1,52	28,8 ± 1,64	46,0 ± 2,54	-0,520 ± 0,004 ^{Ab}	-0,361 ± 0,007 ^{Bf}
Ácido palmítico / Ácido oleico / Ácido caprílico	9,020 10 ⁻³	79,0 ± 1,22	41,8 ± 0,84	43,0 ± 1,58	-0,326 ± 0,010 ^{Aa}	-0,571 ± 0,011 ^{Bd}
	11,275 10 ⁻³	80,6 ± 2,51	44,2 ± 1,64	44,8 ± 2,17	-0,347 ± 0,026 ^{Aa}	-0,548 ± 0,031 ^{Bd}
	13,530 10 ⁻³	80,2 ± 3,49	45,8 ± 3,42	47,6 ± 3,51	-0,367 ± 0,035 ^{Aa}	-0,531 ± 0,033 ^{Bd}
	15,785 10 ⁻³	70,8 ± 2,68	41,4 ± 2,71	45,8 ± 2,68	-0,353 ± 0,006 ^{Aa}	-0,532 ± 0,006 ^{Bd}
	18,044 10 ⁻³	102,8 ± 2,59	76,2 ± 1,64	83,6 ± 1,95	-0,400 ± 0,007 ^{Aa}	-0,499 ± 0,003 ^{Bd}
	36,080 10 ⁻³	56,0 ± 0,71	33,6 ± 1,14	45,2 ± 1,09	-0,364 ± 0,019 ^{Aa}	-0,495 ± 0,022 ^{Bd}
	72,160 10 ⁻³	49,6 ± 2,51	34,8 ± 2,16	46,6 ± 2,51	-0,433 ± 0,012 ^{Aa}	-0,443 ± 0,006 ^{Bd}

Resultados expressos como médias ± desvio padrão. Teste tukey determinando diferenças significativas entre os valores encontrados de RGB ($p < 0,05$). Subscrito A-B: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por concentração. Subscritos a-f: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por ácido graxo.

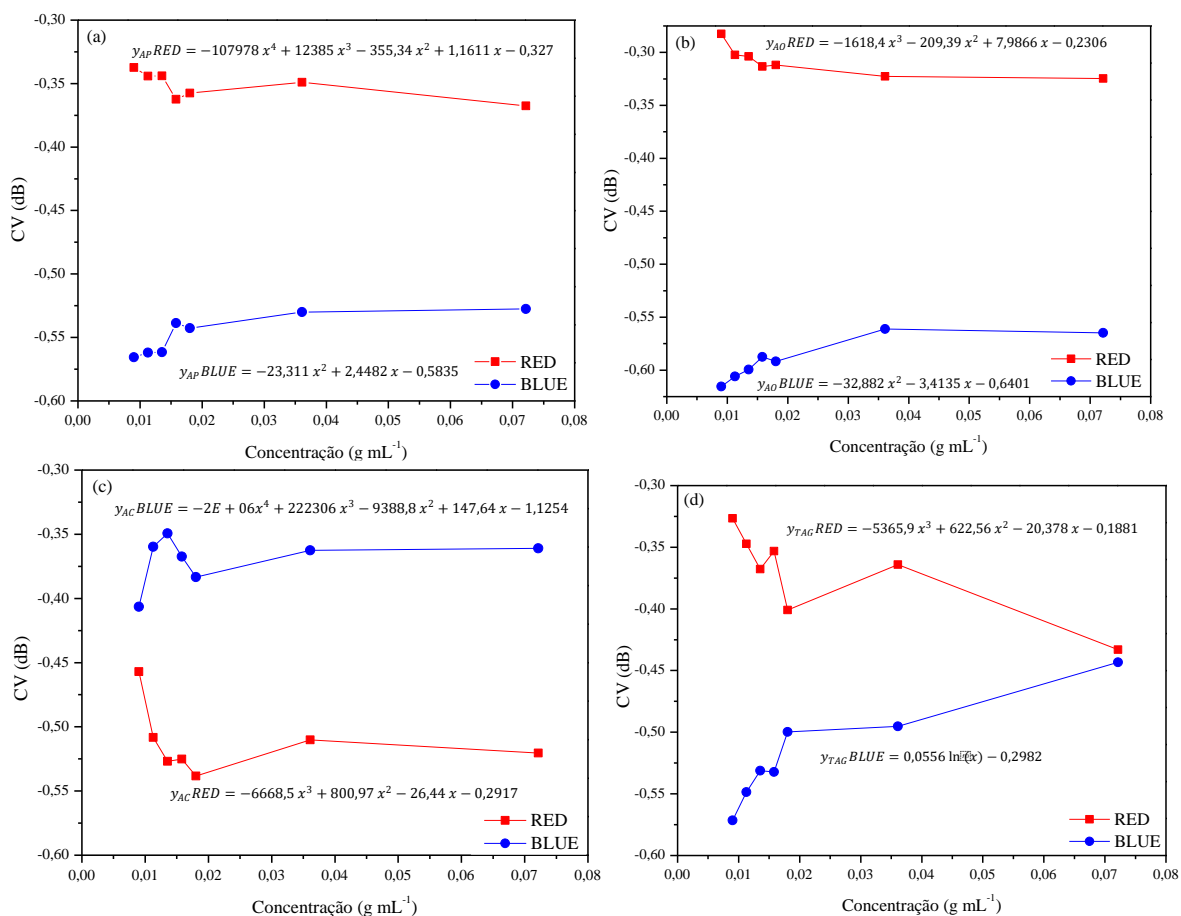
Figura 35. Valor de cor (CV) do vermelho (*RED*) e azul (*BLUE*) e equações das retas para os ensaios colorimétrico utilizando AuNPs/IPA na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (a) e ácido oleico (b).



Os gráficos de CV, representando a interação das nanopartículas de ouro com diferentes ácidos graxos em Triton X-100, foram plotados e estão demonstrados na Figura 36, bem como as respectivas equações das retas obtidas. Na interação com o ácido palmítico, conforme Figura 36(a), observamos uma diminuição na intensidade da cor vermelha e um aumento na intensidade de azul à medida que a concentração do ácido aumenta. Entretanto, essa alteração ocorre de forma linear apenas a partir da amostra AP₆ ($36,080 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$). No caso do ácido oleico, Figura 36(b), também é possível observar um aumento na intensidade do vermelho e uma diminuição na intensidade do azul, sendo essa alteração mais expressiva entre as amostras AO₅ ($18,040 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$) e AO₆ ($36,080 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$). A partir da amostra AO₆, o parâmetro CV para ambas as cores permanece constante. Para o ácido palmítico foi estabelecida uma correlação linear de $R^2 = 0,8767$ para o vermelho e $R^2 = 0,8398$ para o azul. Já para o ácido oleico $R^2 = 0,9369$ (vermelho) e $R^2 = 0,9717$ (azul).

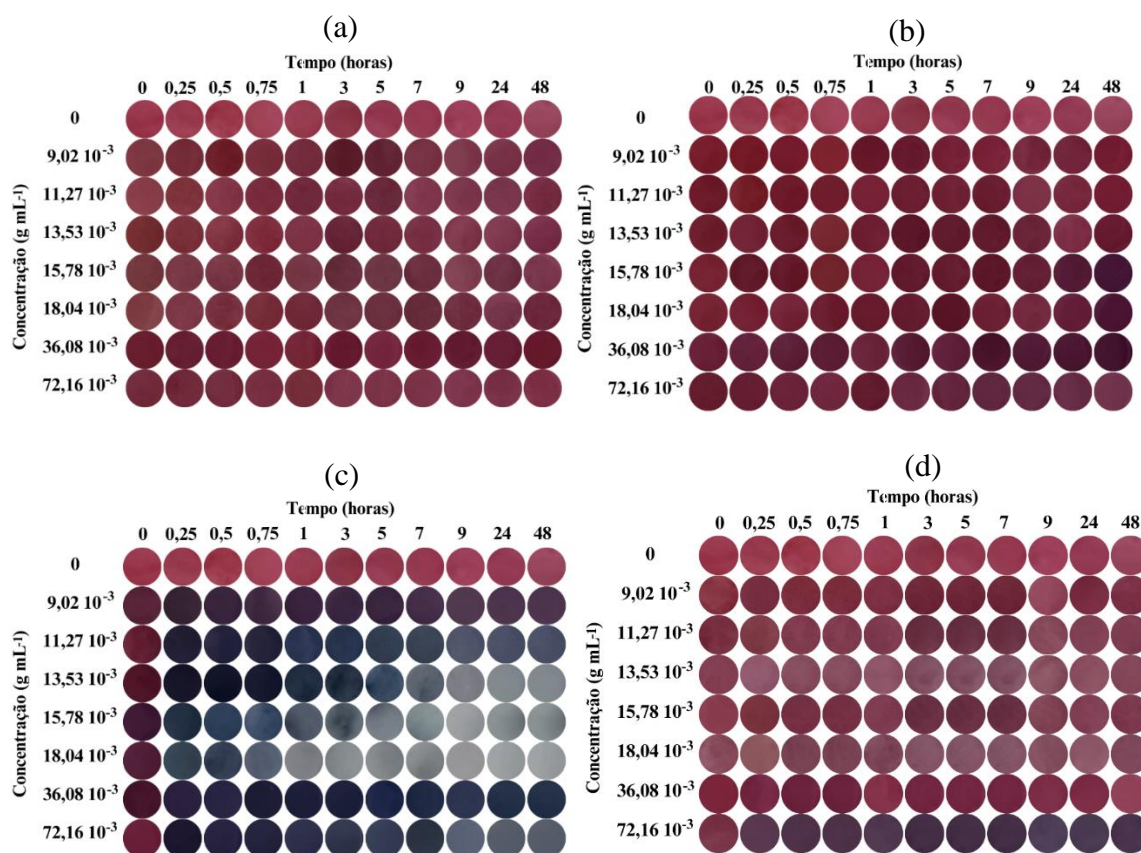
No ensaio contendo ácido caprílico, Figura 36(c), nota-se que a cor azul apresenta um CV maior do que o vermelho, ao contrário dos ensaios com ácido palmítico e ácido oleico. Essa diferença está em concordância com as imagens dos ensaios, onde a cor azul predomina sobre a vermelha. Já na Figura 36(d), onde segue representado o ensaio contendo a combinação dos três ácidos, destaca-se um expressivo aumento na intensidade do vermelho e uma diminuição na intensidade do azul à medida que a concentração de ácido graxo aumenta. Para o ácido caprílico foi estabelecida uma correlação linear de $R^2 = 0,8868$ para o vermelho e $R^2 = 0,9779$ para o azul. Já para o ensaio contendo os três ácidos foi obtido $R^2 = 0,8953$ (vermelho) e $R^2 = 0,9236$ (azul).

Figura 36. Valor de cor (CV) do vermelho (RED) e azul (BLUE) e equações das retas para os ensaios colorimétrico utilizando AuNPs/TX-100 na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico, (b) ácido oleico, (c) ácido caprílico e (d) três ácidos em conjunto.



Foi conduzido um estudo cinético das cores para cada concentração de ácido graxo individualmente, bem como para os ácidos graxos em conjunto, quando em contato com nanopartículas de ouro na presença de TX-100. O objetivo era investigar as alterações na coloração das amostras ao longo do tempo. Observa-se que, no ensaio com ácido palmítico, Figura 37(a), embora não tenha ocorrido a esperada mudança de cor do vermelho para o azul, houve uma modificação na tonalidade do vermelho. Essa variação é evidente ao comparar com as amostras das nanopartículas pura. No ensaio com o ácido oleico, Figura 37(b), destaca-se não apenas a variação na tonalidade do vermelho com diferentes concentrações, mas também a percepção de uma leve transição para o azul nas amostras de concentrações mais elevadas, como AO₁ ($36,080 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$) e AO₂ ($72,160 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$). Essa alteração na coloração resulta em uma tonalidade mais próxima do roxo.

Figura 37. Cinética das cores da interação entre AuNps/TX-100 ao longo de 48 horas na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico, (b) ácido oleico, (c) ácido caprílico e (d) três ácidos em conjunto.



Com base nos resultados anteriormente analisados no ensaio com ácido caprílico, torna-se evidente que este ácido graxo apresentou a mais destacada transição colorimétrica. Esta constatação é corroborada pelo ensaio cinético das cores, Figura 37(c). Mesmo na menor concentração ($AC_1 - 9,02 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), as amostras exibem uma tonalidade roxa, e à medida que a concentração aumenta, a coloração transita para o azul. Nas amostras AC_3 ($13,530 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), AC_4 ($15,785 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$) e AC_5 ($18,040 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), a partir do terceiro intervalo de tempo, as amostras assumem uma coloração mais voltada para o cinza. No ensaio que engloba os ácidos graxos em conjunto (TAG), conforme Figura 37(d), nota-se que a transição do vermelho para o roxo ocorre na maior concentração ($TAG_6 - 72,160 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), com a cor tornando-se mais pronunciada à medida que o tempo avança.

A partir do ensaio cinético colorimétrico, foram gerados espectros de absorvância para cada amostra dos ácidos graxos ao longo de 48 horas. As linhas sólidas representam a absorvância ao longo do tempo, enquanto a linha pontilhada representa o espectro obtido para nanopartículas de ouro puras. Na Figura 38, estão apresentados os espectros referentes ao ácido palmítico. Nota-se que, com o aumento da concentração, as linhas dos espectros convergem, e o pico em

525 nm aumenta progressivamente com o aumento da concentração do ácido. No espectro da amostra AP₁ ($9,020 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), as linhas permanecem mais separadas, mantendo o pico de absorvância em 525 nm (vermelho) acima da AuNP pura até as 3 horas. Após esse ponto, os espectros se mantêm abaixo desse pico. Por outro lado, na amostra AP₇ ($72,160 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), as linhas aparecem mais próximas, e em todos os momentos, os picos estão acima da linha de referência (AuNP pura). Esses resultados corroboram com as descobertas no estudo cinético das cores, conforme Figura 37(a), onde a mudança de tonalidade para o vermelho é observada, mas não ocorre a transição para outra cor.

Na Figura 39, os espectros do ácido oleico estão retratados. Nota-se que o pico de absorvância em 525 nm aumenta à medida que a concentração do ácido aumenta, ultrapassando completamente a linha padrão (referente à AuNP pura) a partir da amostra AO₃. Ao longo do tempo, o pico em 525 nm diminui de forma proporcional. Além disso, observa-se o surgimento de um leve pico entre 300 e 350 nm, representando a região do ultravioleta próximo.

Na Figura 40, encontra-se representado o espectro do ensaio utilizando o ácido caprílico ao longo de 48 horas. Observa-se um deslocamento do pico de absorvância para a direita, alcançando cerca de ~650 nm, que corresponde à absorção da cor vermelha. Esse padrão está em consonância com os resultados obtidos no ensaio cinético colorimétrico, conforme ilustrado na Figura 37(c), onde ocorre um deslocamento da cor vermelha para o azul. Na Figura 41, estão apresentados os espectros para o ensaio que envolve a combinação dos três ácidos graxos. Observa-se um aumento na absorvância à medida que a concentração da solução de ácido aumenta, ultrapassando a linha de absorvância das nanopartículas de ouro puras. O pico em 525 nm diminui à medida que o tempo avança, chegando a praticamente desaparecer a partir de 24 h (TAG₇), transformando-se em uma linha quase reta nesse comprimento de onda.

Figura 38. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre AuNPs/TX-100 na presença de ácido palmítico durante 48 horas. ((a) AP₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$; (b) AP₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$; (c) AP₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$; (d) AP₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$; (e) AP₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$; (f) AP₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$; (g) AP₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

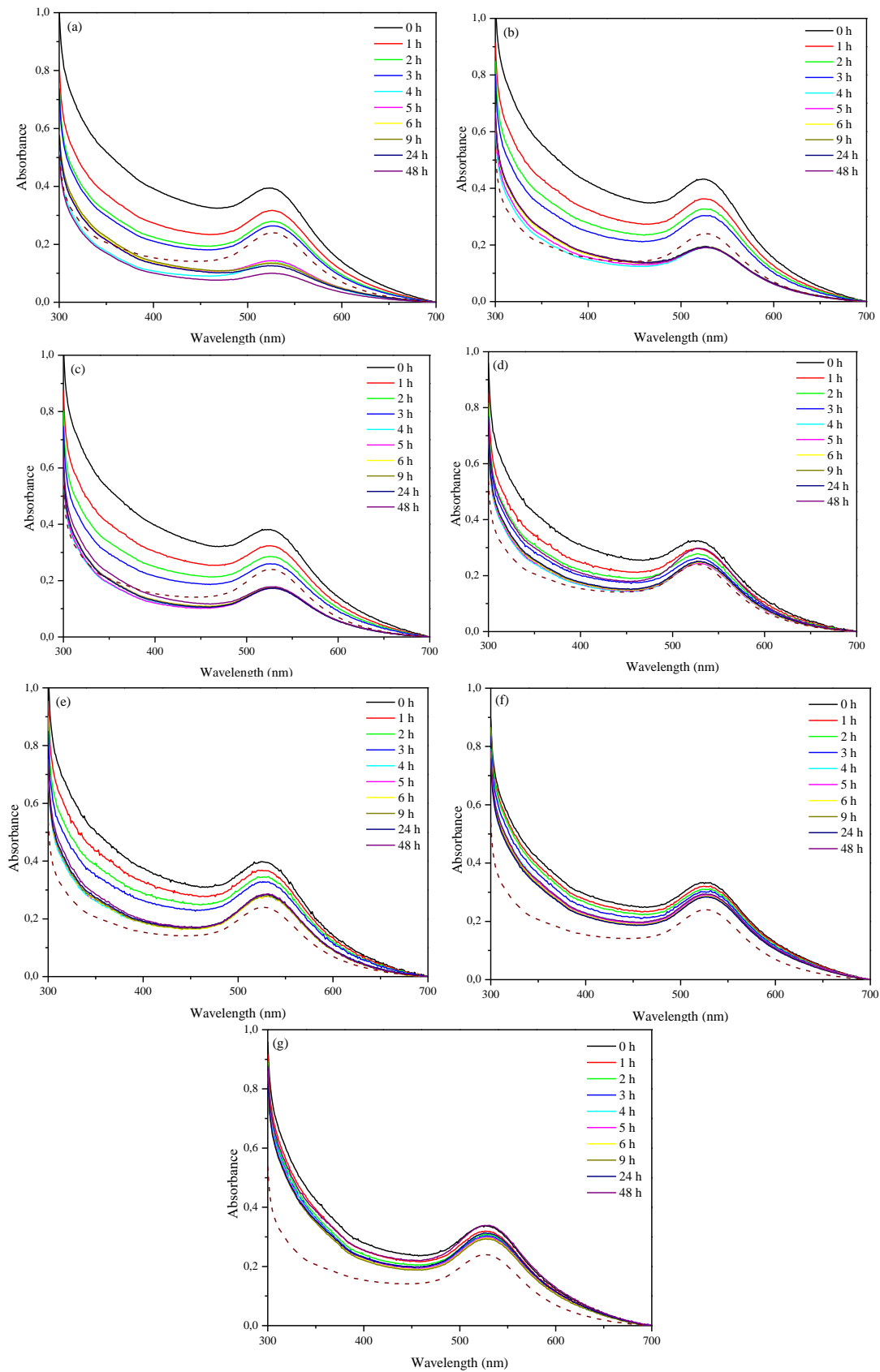


Figura 39. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre AuNPs/TX-100 na presença de ácido oleico durante 48 horas. ((a) $AO_1: 9,020 \cdot 10^{-3}$; (b) $AO_2: 11,275 \cdot 10^{-3}$; (c) $AO_3: 13,530 \cdot 10^{-3}$; (d) $AO_4: 15,785 \cdot 10^{-3}$; (e) $AO_5: 18,040 \cdot 10^{-3}$; (f) $AO_6: 36,080 \cdot 10^{-3}$; (g) $AO_7: 72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

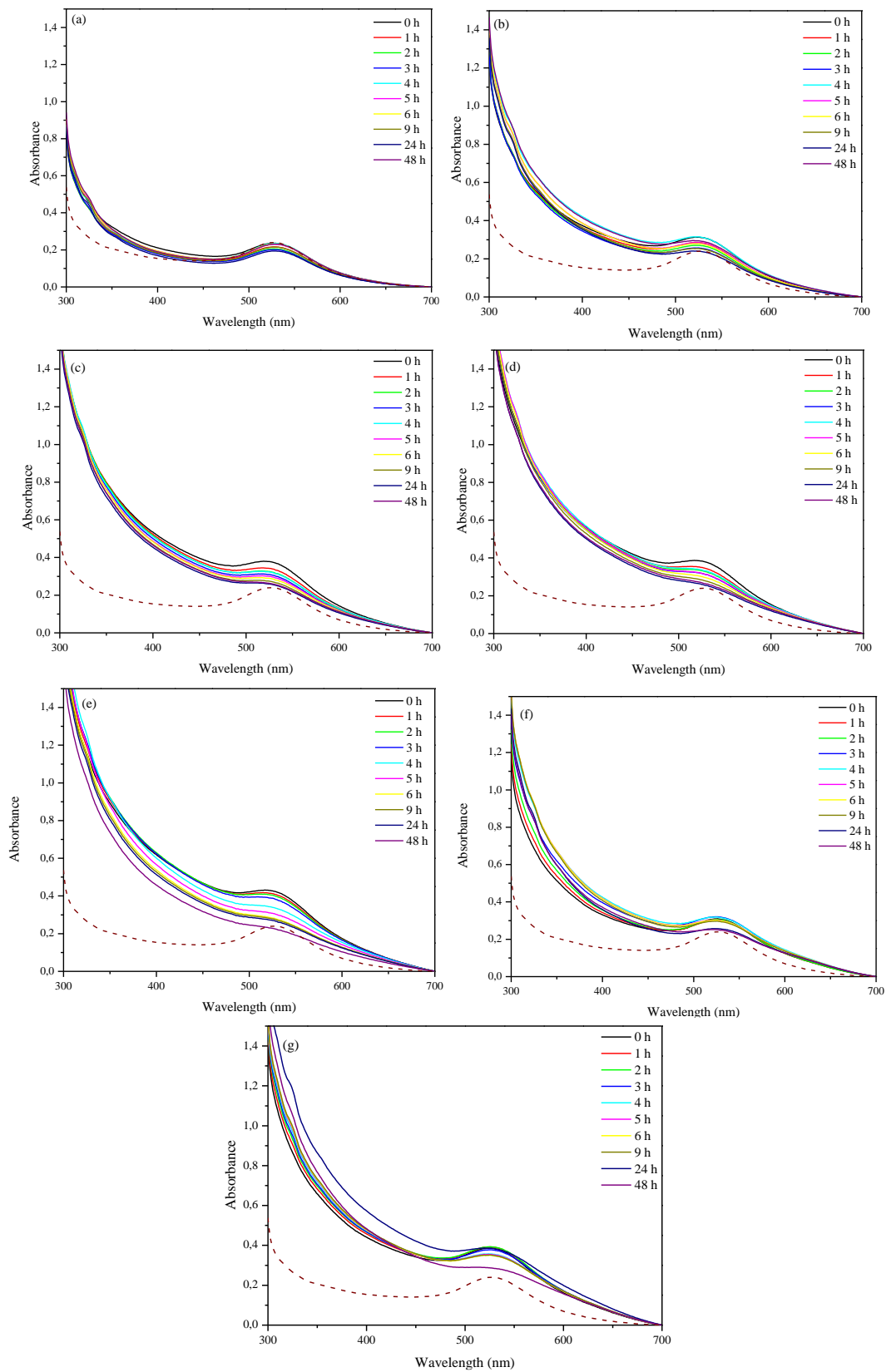


Figura 40. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre AuNPs/TX-100 na presença de ácido oleico durante 48 horas. ((a) $AC_1: 9,020 \cdot 10^{-3}$; (b) $AC_2: 11,275 \cdot 10^{-3}$; (c) $AC_3: 13,530 \cdot 10^{-3}$; (d) $AC_4: 15,785 \cdot 10^{-3}$; (e) $AC_5: 18,040 \cdot 10^{-3}$; (f) $AC_6: 36,080 \cdot 10^{-3}$; (g) $AC_7: 72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

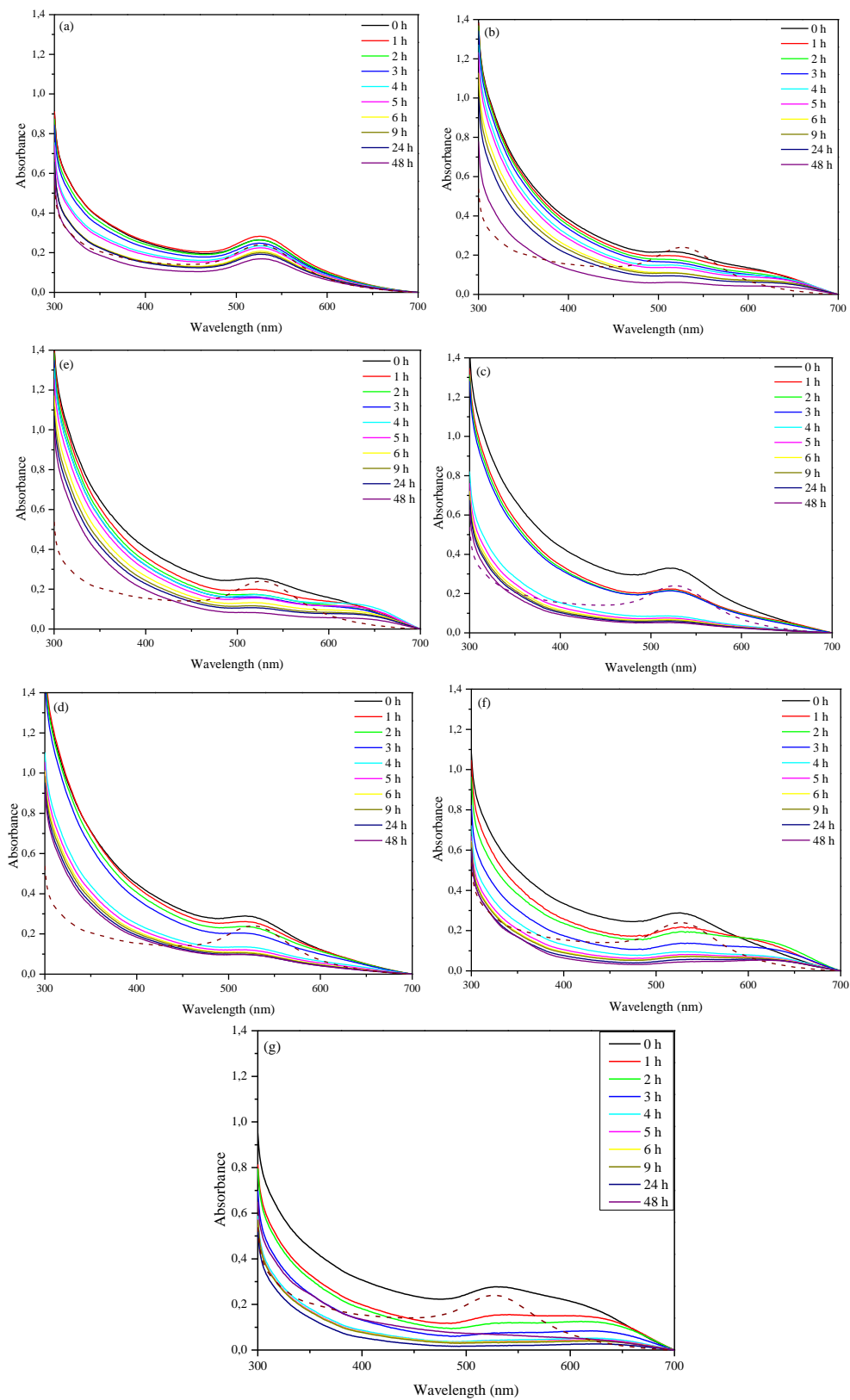
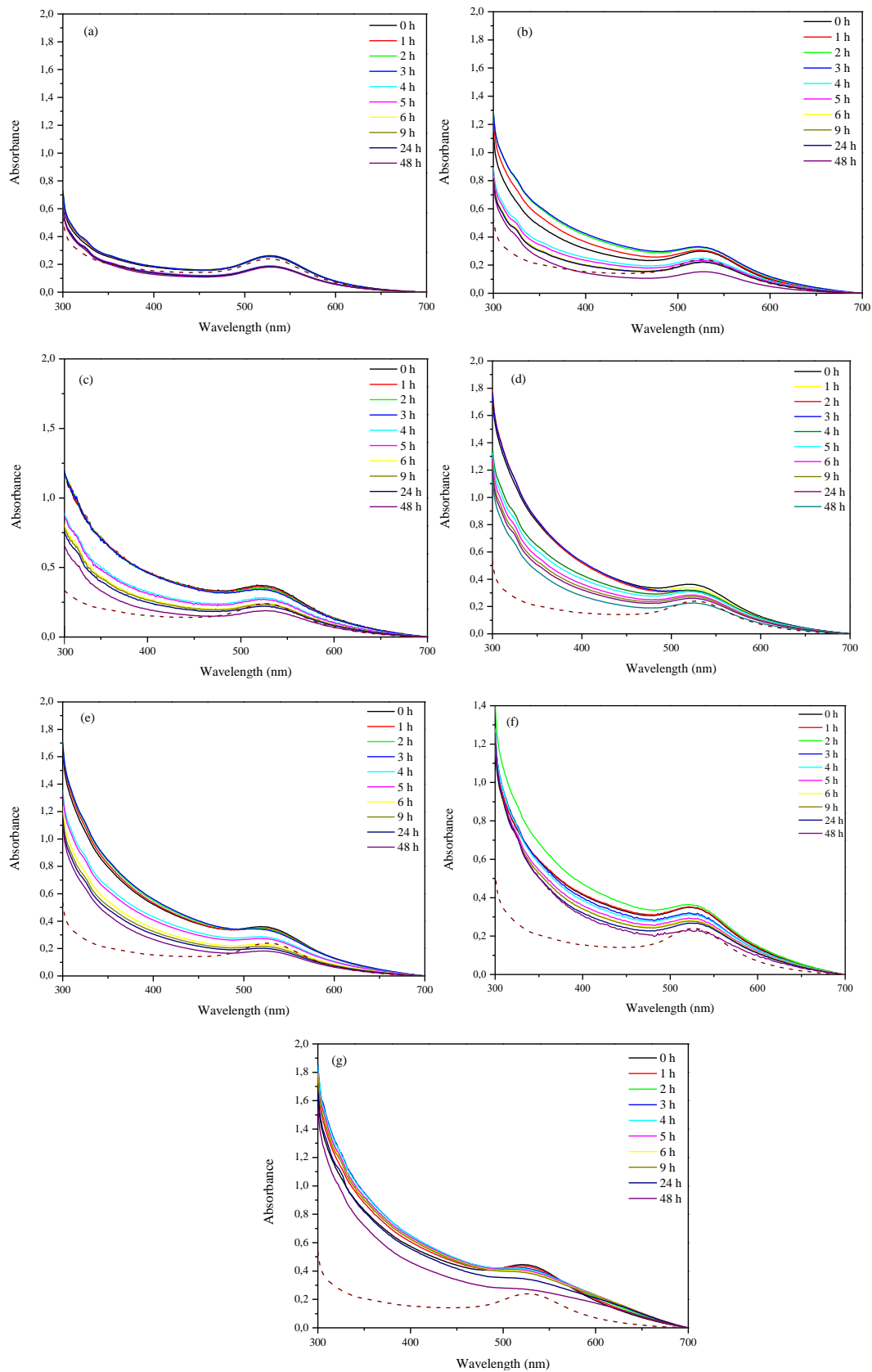


Figura 41. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre AuNPs/TX-100 na presença de ácidos graxos (TAG) durante 48 horas. ((a) TAG₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$; (b) TAG₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$; (c) TAG₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$; (d) TAG₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$; (e) TAG₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$; (f) TAG₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$; (g) TAG₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



Sabe-se que as cores em que é possível enxergar os objetos correspondem às cores da luz refletida por eles, sendo que a nossa percepção das cores se baseia na fonte e reflexão da luz e a sensibilidade dos nossos olhos, que são capazes de identificar fótons com comprimentos de onda entre 400 e 700 nm (DE CARVALHO OLIVEIRA et al., 2022). O sistema RGB é baseado na percepção fisiológica das cores presentes no olho humano e se baseia na correlação das cores de luzes espectrais a partir de misturas das três cores primárias, vermelho, verde e azul (BROADBENT, 2004). As nanopartículas de ouro têm sido amplamente empregadas na fabricação de biossensores, devido às suas propriedades ópticas singulares. As AuNPs exibem uma mudança de cor ajustável em resposta a alterações na morfologia, como forma e tamanho, à distância entre as partículas e ao índice de refração do meio circundante, influenciada pela absorção da ressonância plasmônica de superfície (SPR) localizada (SUN, J. et al., 2020).

No ensaio AuNP/IPA, foi observada uma alteração na coloração proporcional ao aumento das concentrações de ácido palmítico e ácido oleico, conforme evidenciado nas análises RGB. No entanto, notou-se uma maior turbidez nas amostras, o que dificultou as análises no espectrofotômetro (WANG, C. et al., 2020). Já no ensaio AuNP/TX-100, a turbidez foi menor, embora as mudanças colorimétricas para ácido palmítico e ácido oleico tenham sido mais sutis em comparação com o ácido caprílico. Isso pode ser justificado pela menor cadeia carbônica do ácido caprílico, proporcionando melhor acessibilidade e cobertura das superfícies das AuNPs, resultando em uma interação mais eficaz. O ensaio com ácido caprílico também apresentou menor turbidez, possivelmente devido à sua melhor solubilização no meio devido à sua cadeia menor. Contudo, assim como no ensaio anterior, os espectros, para todos os ensaios enfrentaram dificuldades em refletir as mudanças de coloração devido à turbidez. A mudança colorimétrica mais perceptível em todos os ácidos (TAG) ocorreu em suas concentrações mais elevadas.

F. Zhang et al., (2019) propuseram um nanosensor multicanal de nanopartículas de ouro, com tamanho de 13 nm, visando o reconhecimento de cinco ácidos graxos: ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico e ácido elaídico. O estudo empregou Tween 20 para a solubilização dos ácidos, resultando em um desempenho satisfatório. O sensor demonstrou habilidade para reconhecer seletivamente os ácidos graxos. Já (GUO, Yujun et al., 2019) sintetizaram nanopartículas de ouro, com tamanho aproximado de 20 nm, utilizando a redução de citrato e dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). Eles exploraram a aplicação desse composto para determinar o teor total de ácidos graxos livres em óleos vegetais. No ensaio, os ácidos graxos foram solubilizados em metanol. Os pesquisadores descobriram que os comprimentos de cadeia impactam a capacidade antiagregação das AUNPs, observando uma

resposta colorimétrica mais pronunciada para ácidos de cadeia carbônica menor (C4 e C6) em comparação com ácidos de cadeia mais longa (C10 – C18). Esses resultados estão alinhados com os encontrados neste estudo, onde foi observada uma resposta colorimétrica mais eficaz com o ácido caprílico, que possui uma cadeia carbônica mais curta, quando comparado com o ácido oleico e o palmítico.

Em suma, a interação entre as nanopartículas de ouro e os ácidos graxos foi confirmada, abrindo caminho para o potencial desenvolvimento de um sensor colorimétrico para detectar teores de ácidos graxos. Entretanto, é evidente que melhorias na turbidez e na resposta colorimétrica são necessárias para atingir esse objetivo.

4. CONCLUSÃO

Este estudo reforça o potencial das nanopartículas de ouro na detecção colorimétrica de ácidos graxos. Os resultados obtidos via espectroscopia UV-Vis foram complementados pelo método RGB, proporcionando uma análise mais abrangente da mudança de coloração nas amostras. Os resultados obtidos por meio da espectroscopia UV-Vis foram complementados pela análise RGB, proporcionando uma avaliação mais abrangente da mudança de coloração nas amostras. Observou-se uma resposta colorimétrica mais pronunciada no caso do ácido caprílico, em comparação com o ácido oleico e ácido palmítico. Notou-se uma clara alteração da coloração da amostra, passando de vermelho para roxo/azul. Apesar de sutis, tanto o ácido oleico quanto o ácido palmítico também exibiram uma resposta colorimétrica em suas maiores concentrações. Embora os espectros de absorvância não revelem essas alterações colorimétricas, devido à elevada turbidez das amostras, os histogramas RGB destacam de forma mais clara essas alterações.

Para aplicação em indústria de laticínios, há necessidade de estudos adicionais, envolvendo diferentes ácidos graxos e a análise em amostras reais para validar a aplicabilidade da tecnologia. A pesquisa, embora promissora, indica a importância de ajustes e otimizações nos ensaios para garantir melhores resultados. Além disso, a futura exploração de diferentes condições experimentais pode ser fundamental para aprimorar a sensibilidade e especificidade do nanosensor proposto.

5. CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE ÁCIDOS GRAXOS UTILIZANDO VESÍCULA DE 10,12-ÁCIDO PENTACOSADINÓICO (PCDA).

RESUMO

Os ácidos graxos, componentes essenciais presentes no glóbulo de gordura láctea, desempenham papéis cruciais na saúde humana e na qualidade dos produtos lácteos. A quantificação precisa desses ácidos graxos é de grande importância para a indústria de laticínios. Diante da necessidade de uma metodologia sensível e acessível para essa quantificação, este estudo explorou a interação colorimétrica de vesículas de 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA) de tamanho médio de $45,38 \pm 9,63$ nm com ácidos graxos característicos do leite bovino em amostras aquosas sintéticas. A metodologia desenvolvida foi avaliada por espectroscopia e pela análise RGB. Os resultados indicaram que o ensaio com álcool isopropílico exibiu uma maior turbidez, com as amostras transitando de tons azuis para rosados. Em contraste, o ensaio com Triton X-100 apresentou menor turbidez, e a resposta colorimétrica foi imediata, modificando as amostras entre tons de roxo e azul, sendo que após 5 minutos as amostras assumiram uma tonalidade rosada e permaneceram assim. Esses resultados destacam a sensibilidade colorimétrica da metodologia utilizada e nas interações entre PCDA e ácidos graxos.

Palavras-chave: ácido palmítico, ácido oleico, ácido caprílico, triton x-100, álcool isopropílico

ABSTRACT

Fatty acids, essential components present in the milk fat globule, play crucial roles in human health and the quality of dairy products. Accurate quantification of these fatty acids is of great importance to the dairy industry. Given the need for a sensitive and accessible methodology for this quantification, this study explored the colorimetric interaction of 10,12-pentacosadinoic acid (PCDA) vesicles with an average size of 45.38 ± 9.63 nm with characteristic fatty acids from bovine milk in synthetic aqueous samples. The methodology developed was evaluated by spectroscopy and RGB analysis. The results showed that the isopropyl alcohol test exhibited greater turbidity, with the samples shifting from blue to pink tones. In contrast, the Triton X-100 test showed lower turbidity, and the colorimetric response was immediate, changing the samples between shades of purple and blue, and after 5 minutes the samples took on a pinkish hue and remained that way. These results highlight the colorimetric sensitivity of the methodology used and the interactions between PCDA and fatty acids.

Key words: palmitic acid, oleic acid, caprylic acid, triton x-100, isopropyl alcohol

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos (AGs) desempenham um papel crucial no glóbulo de gordura láctea, apresentando-se em diferentes comprimentos de cadeia. Esses componentes não apenas são considerados essenciais para a saúde humana, mas também desempenham um papel vital na qualidade do leite bovino e de seus subprodutos (ALOTHMAN et al., 2019). Os AGs exibem propriedades antimicrobianas, anticancerígenas e anti-inflamatórias, ao mesmo tempo em que, em concentrações elevadas, podem conferir um sabor indesejado aos produtos lácteos (DJORDJEVIC et al., 2019; WOODHOUSE; KELTON, 2023). Dessa forma, torna-se imprescindível realizar uma quantificação precisa dos ácidos graxos presentes no leite bovino. Além de influenciar diretamente a qualidade organoléptica dos produtos lácteos, essa quantificação é essencial para avaliar a composição nutricional e os potenciais benefícios à saúde associados ao consumo desses produtos (HAGEMAN et al., 2019).

Atualmente na indústria de laticínios, o método mais utilizado para determinação do teor de gordura, denominado de método de Gerber, se baseia no princípio de destruição das micelas de gordura e a dissolução da caseína, no entanto, é um método perigoso e com muitas etapas (DESAI; PANDYA, 2022a). Alguns outros métodos foram desenvolvidos para análise de teor de gordura, através de equipamentos modernos de alto custo e demorado, se tornando inviável para a indústria láctea (BOGOMOLOV; MELENTEVA, 2013; GASTALDI et al., 2011; HAQUE; BUBLI; KHAN, 2021; MENDOZA et al., 2015).

A detecção colorimétrica, baseado na mudança de coloração para detecção de diferentes analitos, é um método simples, de baixo custo e seletivo (LIU, Bin.; ZHUANG; WEI, 2020). O termo nanotecnologia é definido como uma tecnologia precisa em que se utiliza de fenômenos em escala nanométrica (1-100nm) e tem tido uma expressiva ascensão na última década, visto que, fornece materiais com excelentes propriedades devido ao aumento da área superficial de contato (CIAMBELLI; LA GUARDIA; VITALE, 2020; HALEEM et al., 2023).

O polidiacetileno (PDA) é um polímero conjugado com excelentes propriedades ópticas, sendo a vesícula nanométrica de 10,12-ácido pentacosadínico (PCDA) a mais utilizado em sensores (VO et al., 2021). Com radiação ultravioleta ocorre a fotopolimerização da PCDA gerando a mudança de incolor para azul, portanto, é um excepcional material para preparação de sensores químicos e biológicos (R ORTEGA et al., 2021). Para algumas moléculas, as transições colorimétricas são limitadas, e faz-se necessário a utilização de funcionalizantes, como o copolímero tribloco, com o intuito de tornar as vesículas mais estáveis e sensíveis (DE SOUZA et al., 2016).

Nesse sentido, este trabalho propõe-se a desenvolver e caracterizar vesículas de PCDA, explorando a interação colorimétrica dessas vesículas na presença de ácido palmítico, ácido oleico, ácido caprílico e a combinação desses três ácidos. Esse estudo será conduzido utilizando dois solventes distintos: o álcool isopropílico e o Triton X-100.

2. EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAIS

O 10,12-ácido pentacosadinóico e o copolímero L64 foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O álcool isopropílico foi obtido da FMaia, o ácido palmítico da Êxodo, o ácido oleico da Merk, o ácido caprílico da Synth, e o Triton X-100 foi fornecido pela Neon. Todos os reagentes foram empregados sem purificação analítica. Todos os experimentos foram conduzidos em água deionizada.

2.2 SÍNTESE DE VESÍCULAS DE 10,12-ÁCIDO PENTACOSADINÓICO (PCDA)

As vesículas de PCDA foram preparadas seguindo a metodologia proposta por De Souza et al., (2016) e Rezende et al., (2017). Foi realizada uma solução de copolímero tribloco - L64 com água deionizada a fim de obter uma solução na concentração de 1% (m/m). E então, monômeros de PCDA ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram dissolvidos nesta solução de L64. Esta solução foi submetida a um ultrassom de ponteira na potência de 400 W por 10 minutos. E imediatamente, a dispersão foi filtrada com um filtro de polifluoreto de vinilideno (PVDF) de $0,45 \mu\text{m}$. A suspensão foi mantida refrigerada a 4°C por no mínimo 10 horas. Por fim, as vesículas foram polimerizadas à radiação UV (254 nm) por 10 minutos, até que a suspensão apresente uma coloração azul.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA NANOESTRUTURA

O tamanho hidrodinâmico das nanoestruturas e o potencial Zeta foram determinados no Zetasizer PN3702 (Malvern Instruments, UK) via espalhamento de dinâmico de luz. As medidas foram realizadas utilizando um detector de fotodiodo de avalanche e um correlacionador sem qualquer purificação adicional. A fonte de luz foi um laser HeNe de 35 mW e potência de $\lambda = 632,8 \text{ nm}$, linearmente polarizada. Para o controle de intensidade foi empregado um sistema de polarizadores cruzados. O ângulo de detecção foi fixo em 173° e as medidas correlacionadas pelo algoritmo CONTIN.

Os espectros de absorção molecular UV-Vis da vesícula de PCDA foram registrados na gama de 700-300 nm no leitor de microplaca Synergy HT (Biotek, EUA).

2.4 ENSAIO COLORIMÉTRICO

Uma amostra com concentração de $0,0231 \text{ g mL}^{-1}$ de ácido palmítico e ácido oleico em isopropanol foi preparada para a realização do ensaio colorimétrico. Cada solução contendo um ácido graxo foi adicionada nas vesículas de PCDA previamente preparadas, a fim de obter amostras com diferentes concentrações de ácido palmítico e ácido oleico, conforme demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12. Ensaio colorimétrico entre PCDA e diferentes concentrações de ácidos graxos na presença de álcool isopropílico.

Amostra	Volume PCDA (μL)	Volume de solução de ácido graxo (μL)	Volume de água destilada (μL)	Concentração final de ácido graxo (g mL^{-1})
1		400		$3,85 \cdot 10^{-3}$
2		600		$5,33 \cdot 10^{-3}$
3	1500	800	500	$6,60 \cdot 10^{-3}$
4		1000		$7,70 \cdot 10^{-3}$
5		1200		$8,66 \cdot 10^{-3}$
6		1400		$9,51 \cdot 10^{-3}$

Também foi conduzido um ensaio colorimétrico utilizando o surfactante Triton X-100 (TX-100) como solvente, visando aprimorar a solubilização dos ácidos graxos. Na preparação dos ensaios, os ácidos graxos (ácido palmítico (AP), ácido oleico (AO) e ácido caprílico (AC)) foram adicionados ao TX-100 na concentração de $2,8864 \text{ g mL}^{-1}$. Adicionalmente, uma solução contendo os três ácidos graxos em conjunto foi preparada, mantendo a seguinte proporção: 50 % de ácido palmítico, 45 % de ácido oleico e 5 % de ácido caprílico para 1 mL de solvente. Uma amostra controle contendo apenas o surfactante TX-100 também foi preparada.

Em seguida, todas as amostras foram submetidas a um banho-maria a 100°C por 20 minutos. Após esse processo, as amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:20 (v/v) e armazenadas em tubos Falcon em temperatura ambiente. Para a montagem do ensaio colorimétrico, diferentes volumes das soluções preparadas foram adicionados, conforme indicado na Tabela 13, às vesículas de PCDA em frascos de vidro.

Tabela 13. Ensaio colorimétrico entre PCDA e diferentes concentrações de ácidos graxos na presença de Triton X-100.

Amostra	Volume PCDA (μL)	Volume de solução de ácido graxo (μL)	Volume de solução de TX-100 (μL)	Concentração final de ácido graxo (g mL ⁻¹)
1		46,875	453,125	9,020 10 ⁻³
2		58,594	441,406	11,275 10 ⁻³
3		70,312	429,688	13,530 10 ⁻³
4	1000	82,031	417,969	15,785 10 ⁻³
5		93,750	406,250	18,040 10 ⁻³
6		187,500	312,500	36,080 10 ⁻³
7		375,000	125,000	72,160 10 ⁻³

2.5 ANÁLISES DO ENSAIO COLORIMÉTRICO

Foram elaborados dois experimentos com o propósito de examinar a interação entre as vesículas de PCDA na presença de ácidos graxos. Um desses ensaios empregou álcool isopropílico como solvente (PCDA/IPA), enquanto o segundo utilizou Triton X-100 (PCDA/TX-100). No experimento PCDA/IPA, as análises foram conduzidas para o ácido palmítico (PCDA/IPA/AP) e ácido oleico (PCDA/IPA/AO). No experimento PCDA/TX-100, as análises envolveram o ácido palmítico (PCDA/TX-100/AP), ácido oleico (PCDA/TX-100/AO), ácido caprílico (PCDA/TX-100/AC) e a combinação dos três ácidos (PCDA/TX-100/TAG).

As amostras foram fotografadas utilizando um smartphone com um câmara de 12 megapixels. Em seguida, uma porção de 236 x 354 pixels foi recortada de cada imagem original para gerar um histograma RGB (Red, Green, Blue) usando o software OriginPro 8.5. Posteriormente, cinco pontos de cada amostra foram analisados por meio do software PhotoDirector 8, onde se calculou a média e o desvio padrão. Em seguida, o valor de cor (CV) para as componentes vermelha e azul foi calculado utilizando as Equações 1 e 2, respectivamente. Durante essa análise, a intensidade do componente vermelho foi comparada com a intensidade total dos componentes vermelho, verde e azul, conforme descrito por (ZHENG et al., 2021).

$$CV_{RED} (dB) = 10 \log \left[\frac{R}{(R+G+B)} \right] \quad (1)$$

$$CV_{BLUE} (dB) = 10 \log \left[\frac{B}{(R+G+B)} \right] \quad (2)$$

Em que, R, G e B representam a intensidade óptica do vermelho, verde e azul, respectivamente.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise de leitura UV-Vis por meio do leitor de microplacas Synergy HT (Biotek, EUA). A leitura espectrofotométrica foi conduzida em microplacas de 96 poços, adicionando 150,0 μL de cada amostra em poços individuais, para ambos os ensaios. As varreduras espectrais foram realizadas de 400 a 700 nm, com um passo de 1,0 nm para cada ponto de medição. A disposição das microplacas de 96 poços nos experimentos PCDA/IPA e PCDA/TX-100 é representada nas Figuras 42 e 43, respectivamente.

Figura 42. Disposição da placa de 96 poços usada no ensaio PCDA/IPA para leitura no espectrofotômetro.

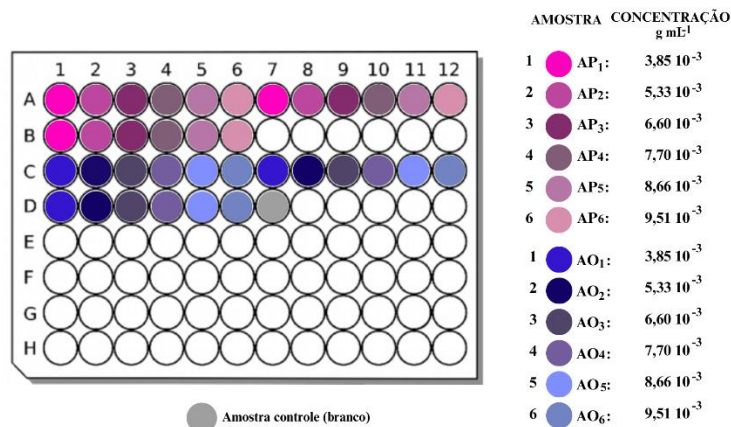
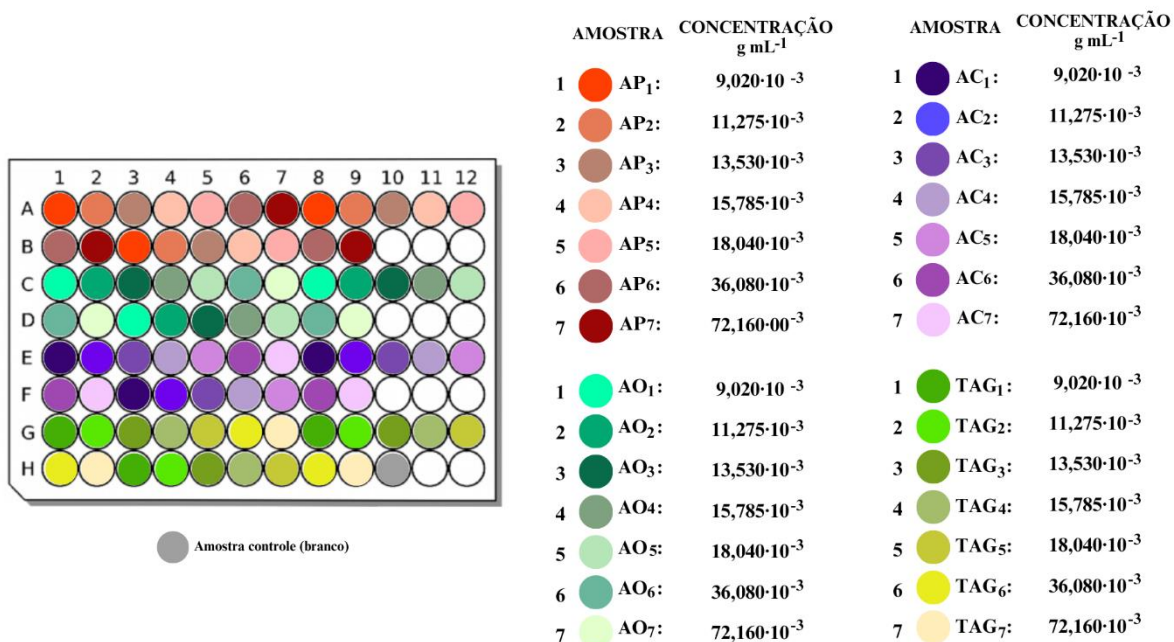


Figura 43. Disposição da placa de 96 poços usada no ensaio PCDA/TX-100 para leitura no espectrofotômetro.



2.6 ESTUDO CINÉTICO DAS CORES

O estudo cinético investigou a interação entre a molécula de PCDA e o TX-100 na presença de ácidos graxos ao longo de 48 horas. Durante esse período, foram registradas imagens em 8 momentos distintos (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24 e 48 h) das amostras para analisar a evolução das cores no decorrer do tempo. Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise no espectrofotômetro UV-Vis, em 7 momentos distintos (0, 0,25, 0,5, 1, 6, 24 e 48 h), conforme ilustrado na Figura 43. Nesse processo, foram adicionados 100 µL de PCDA, seguidos por 40 a 100 µL da solução de ácido graxo, variando em incrementos de 10 µL para cada amostra. E então, o volume de cada poço foi complementado com a solução de TX-100 até atingir 200 µL. Esse método possibilitou uma investigação mais minuciosa das mudanças espectrais ao longo do tempo, oferecendo uma compreensão mais detalhada da dinâmica relacionada às reações em análise.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O mecanismo envolvido na mudança de cor das vesículas de PCDA ainda não é totalmente compreendido. A teoria mais aceita atualmente é que a transição colorimétrica ocorre devido a uma mudança conformacional na estrutura conjugada do polidacetileno (REPPY; PINDZOLA, 2007; SUN, Xuemei et al., 2010). Nessa perspectiva, a forma azul seria associada a uma conformação linear, enquanto a forma vermelha exibiria uma conformação mais enovelada (CARPICK; SASAKI; MARCUS; et al., 2004). Apesar de serem amplamente empregadas para detecção colorimétrica, as vesículas de PCDA apresentam limitações devido à sua baixa estabilidade à agregação e uma transição colorimétrica restrita em certas condições e moléculas. Para superar essas limitações, agentes funcionalizantes, como o copolímero tribloco (CT), têm sido investigados para conferir maior estabilidade e sensibilidade às moléculas (DE SOUZA et al., 2016).

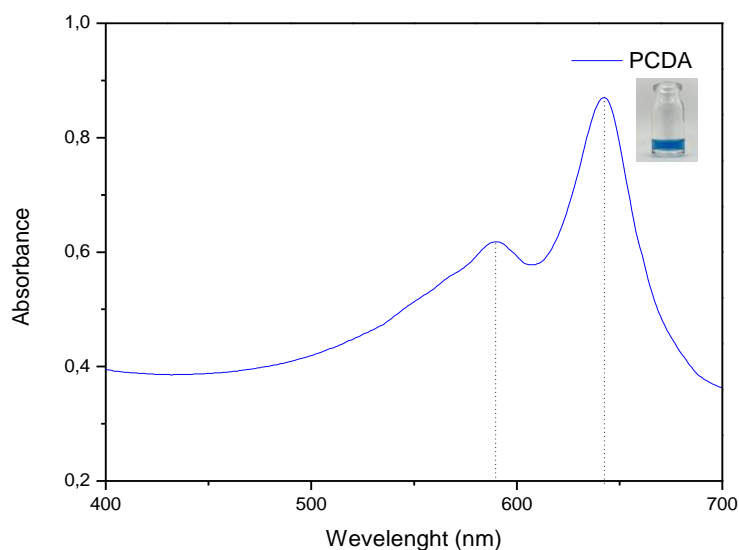
As vesículas de PCDA/L64 sintetizadas apresentaram uma coloração azul, um tamanho de $45,38 \pm 9,63$ nm e um potencial Zeta de $-24,5 \pm -1,92$ mW. De acordo com Okada et al., (1998) os diâmetros das vesículas de PCDA podem variar de 50 a 300 nm, sendo que seu tamanho varia de acordo com a molécula incorporada. Pires et al., (2010) produziram vesículas de PCDA pura e com a incorporação de colesterol e esfingomiéline, obtendo diâmetros de 87 ± 3 nm e 211 ± 3 nm, respectivamente. Já De Souza et al., (2016) obtiveram um tamanho de nanoestruturas de PCDA/L64 de 52 nm, utilizando a mesma metodologia aplicada no presente trabalho. A incorporação do copolímero tribloco L64, portanto, sugere uma diminuição do tamanho das vesículas. Essa diminuição, provavelmente, está relacionada às interações intra e

intermoleculares das vesículas e do copolímero que permitem uma maior aproximação das cadeias laterais da vesícula, e sua consequente, diminuição.

A coloração azul observada nas vesículas de PCDA/L64 é resultado da presença de um núcleo hidrofóbico composto pelos grupos alquila do PDA e pelos segmentos do L64, além de uma camada externa hidrofílica formada pelos grupos carboxílicos do PDA e pelos segmentos do L64. Essa configuração destaca que os monômeros de diacetileno constituíram uma espinha dorsal de polímero alternado, iniciada pela exposição à luz UV, culminando na formação de agregados não perturbados de vesículas de PCDA (DE SOUZA et al., 2016; SAGONG et al., 2021).

Na Figura 44 segue representado o gráfico de varredura da vesícula de PCDA/L64 diluído 1:10, em que se observa um pico de absorção em aproximadamente 640 nm, demonstrando que a solução está absorvendo a cor laranja, ou seja, azul para nossos olhos, e um pico menor em 590 nm, representando a absorção da cor amarela (roxa para nossos olhos), estando de acordo com a literatura (R ORTEGA et al., 2021).

Figura 44. Perfil espectral de absorção das nanopartículas de PCDA/L64 obtida no UV-Vis.



A literatura nos apresenta diversas aplicações das vesículas de PCDA para determinação colorimétrica de diferentes tipos de substâncias, sendo baseado na alteração da coloração da solução quando o analito entra em contato com o PCDA (DE OLIVEIRA, T. V. et al., 2015; LEBÈGUE et al., 2018; PIRES, A. C. D. S. et al., 2011; SAGONG et al., 2021). Entretanto, até o presente momento, não foi relatado a utilização de vesículas de PCDA/L64 para detecção colorimétrica específica de ácidos graxos. Weston et al., (2020, 2021) avaliaram a utilização da vesícula de PCDA, como sensor colorimétrico, na embalagem do leite para

avaliar a deterioração microbiana a partir da liberação e distinção dos ácidos graxos livres, diferindo da presente pesquisa. É possível observar, com o a Figura 44, que o copolímero L64 não afetou a etapa de polimerização dos monômeros de diacetileno, visto que apresentou as duas bandas em 640 e 590 nm. E que na presença de ácido graxo, foram verificadas alterações nos espectros, demonstrando que houve uma interação entre a vesícula de PCDA/L64 com os ácidos graxos.

Nas Figuras 45 e 46, encontram-se representados os ensaios colorimétricos que utilizaram álcool isopropílico como solvente, na interação entre PCDA/IPA/AP e PCDA/IPA/AO, respectivamente. Nessas figuras, é evidente a transição de coloração do azul para o vermelho. Nota-se também uma maior turbidez nas amostras do ensaio contendo ácido palmítico. Esse aumento na turbidez pode ser atribuído, provavelmente, à natureza saturada do ácido palmítico em comparação ao ácido oleico, que é insaturado, bem como o tamanho da cadeia carbônica (SCHAUENSTEIN, 1967).

Figura 45. Ensaio colorimétrico da interação entre a vesícula de PCDA com o ácido palmítico em diferentes concentrações: (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$.

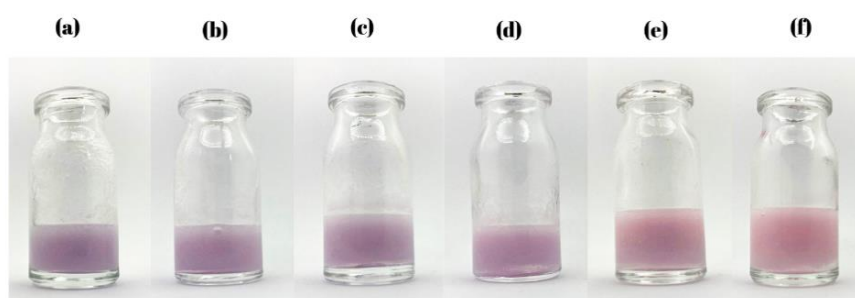
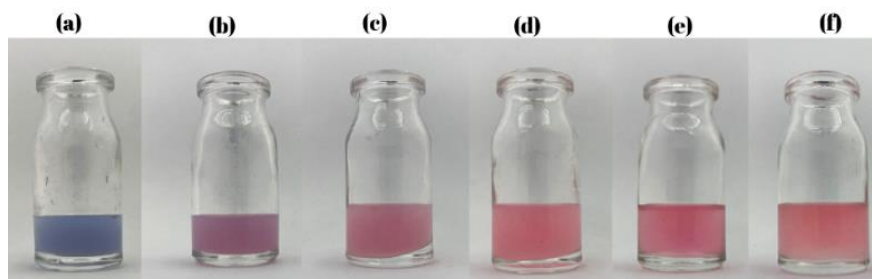


Figura 46. Ensaio colorimétrico da interação entre a vesícula de PCDA com o ácido oleico em diferentes concentrações: (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$.



Optou-se pelo uso do surfactante Triton X-100 como uma alternativa para aprimorar a emulsão resultante dos ácidos graxos. O Triton X pertence à categoria de detergentes não iônicos, originado da polimerização do octilfenol com óxido de etileno X. Esses detergentes formam uma cadeia hidrofílica de óxido de polietileno e um grupo hidrofóbico de hidrocarboneto aromático (ABU-GHUNMI; BADAWI; FAYYAD, 2014). O TX-100 demonstra excelentes propriedades de detergência e remoção de óleo, reduzindo a tensão superficial da água e as tensões interfaciais entre a água e o óleo mineral (LIN; CHEN; LIN, 1998). Com base nessas informações e seguindo a metodologia apresentada por Mirgorodskaya et al. (2010), que utilizou diferentes agentes tensoativos, incluindo o TX-100, para investigar a solubilização de ácidos graxos, ensaios colorimétricos para examinar a interação de vesículas de PCDA na presença de ácido palmítico, ácido oleico e ácido caprílico, bem como um ensaio envolvendo a combinação dos três ácidos foram realizados. O experimento utilizando TX-100 utilizou concentrações típicas de ácidos graxos encontradas no leite, e os resultados são exibidos abaixo. As Figuras 47 e 48 exibem os ensaios colorimétricos que utilizaram o TX-100 como solvente para investigar a interação entre as vesículas de PCDA na presença do ácido palmítico (PCDA/TX-100/AP) e do ácido oleico (PCDA/TX-100/AO), respectivamente.

Figura 47. Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácido palmítico em diferentes concentrações: (AP₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AP₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AP₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AP₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AP₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AP₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AP₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

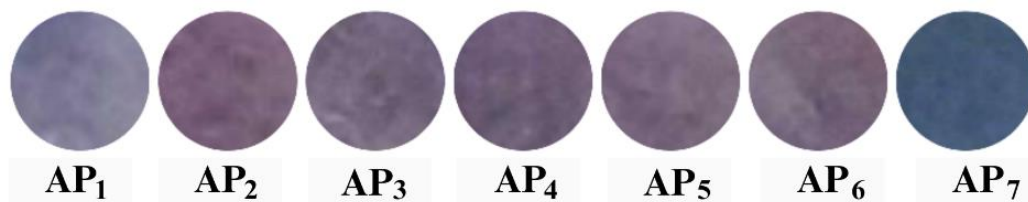
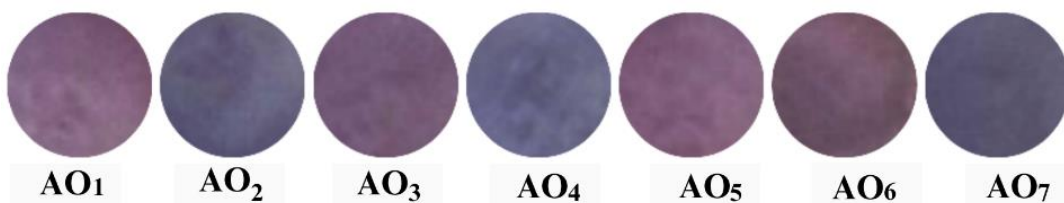


Figura 48. Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácido oleico em diferentes concentrações: (AO₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AO₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AO₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AO₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AO₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AO₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AO₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



Observa-se que mesmo na menor concentração ($9,020 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), as amostras já evidenciam uma alteração de cor. No ensaio com ácido palmítico, Figura 47, nota-se uma transição gradual de coloração, com o AP₁ exibindo um tom de roxo claro que evolui para nuances de azul. Por outro lado, a alteração de cor provocada pelo ácido oleico, Figura 48, não segue uma transição linear. As amostras AO₁, AO₃, AO₅ e AO₆ manifestam uma coloração predominantemente roxeada, ao passo que as amostras AO₂, AO₄ e AO₇ apresentam uma tonalidade mais voltada para o azul. Essas observações indicam que a resposta às variações de concentração difere entre o ácido palmítico e o ácido oleico, sendo o primeiro mais propenso a uma mudança gradual e o segundo exibindo variações mais complexas e não lineares.

Figura 49. Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácido caprílico em diferentes concentrações: (AC₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AC₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AC₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AC₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AC₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AC₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AC₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

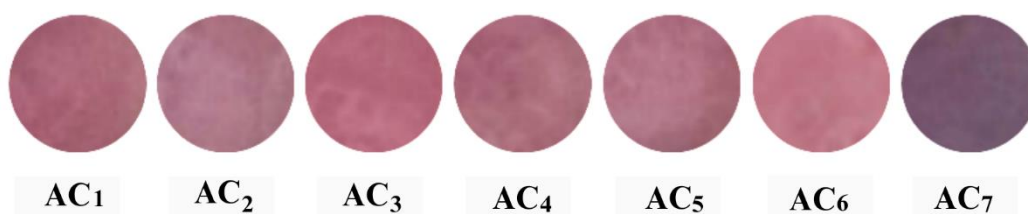


Figura 50. Ensaio colorimétrico da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácidos graxos em conjunto em diferentes concentrações: (TAG₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, TAG₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, TAG₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, TAG₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, TAG₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, TAG₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e TAG₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



As Figuras 49 e 50 ilustram os resultados dos ensaios colorimétricos realizados com ácido caprílico e a combinação dos três ácidos, respectivamente. Observa-se que o ácido caprílico manifesta uma alteração para a cor avermelhada já em sua menor concentração, atingindo a coloração roxa em AC₇. Em contraste, o ensaio que envolve os três ácidos (TAG) exibe uma maior semelhança com as colorações observadas nos ensaios que incorporam ácido palmítico e oleico, uma vez que estes são os ácidos em concentrações mais elevadas na amostra.

A resposta colorimétrica aos ácidos graxos na membrana do PDA é resultado de interações termodinâmicas, com a inserção da cadeia alquila dos ácidos graxos interrompendo a conjugação nas vesículas de PDA. Segundo Weston et al., (2020), ácidos graxos de cadeia mais curta têm uma inserção mais facilitada ou causam maior ruptura na membrana do PDA,

atribuída à maior concentração molar de compostos anfifílicos na solução. A inserção da porção hidrofóbica de compostos anfifílicos na membrana das vesículas de PDA interrompe a conjugação, provocando uma mudança visível de cor de azul para vermelho, devido à alteração no comprimento de conjugação efetivo e no comprimento de onda de absorção característico do material.

Na Figura 51, está representado o espectro de absorção do ensaio PCDA/IPA/AP. A 640 nm, que corresponde à coloração laranja (azul para nossos olhos), há uma redução na absorbância e um deslocamento dessa banda para 540 nm, que representa a coloração verde (vermelho para nossos olhos). Além disso, ocorre um deslocamento da banda que estava em 590 nm, representando a coloração amarela (roxo para nossos olhos), para 500 nm, também correspondendo à cor verde. Isso confirma a alteração de cor nas amostras. Já a Figura 52 apresenta o espectro do ensaio PCDA/IPA/AO. Observa-se uma diminuição no pico de 640 nm à medida que a concentração de ácido oleico aumenta, e um deslocamento da banda de 590 nm para 550 nm, indicando uma diminuição desse pico de maneira não proporcional.

Figura 51. Espectros de absorção UV-Vis da interação entre a vesícula de PCDA/IPA e diferentes concentrações de ácido palmítico, em escalas distintas, sendo elas: (a) W:400-700 e A:0,0-0,5; (b) W:450-600 e A:0,0-0,4; (c) W:600-700 e A:0,0-0,2.

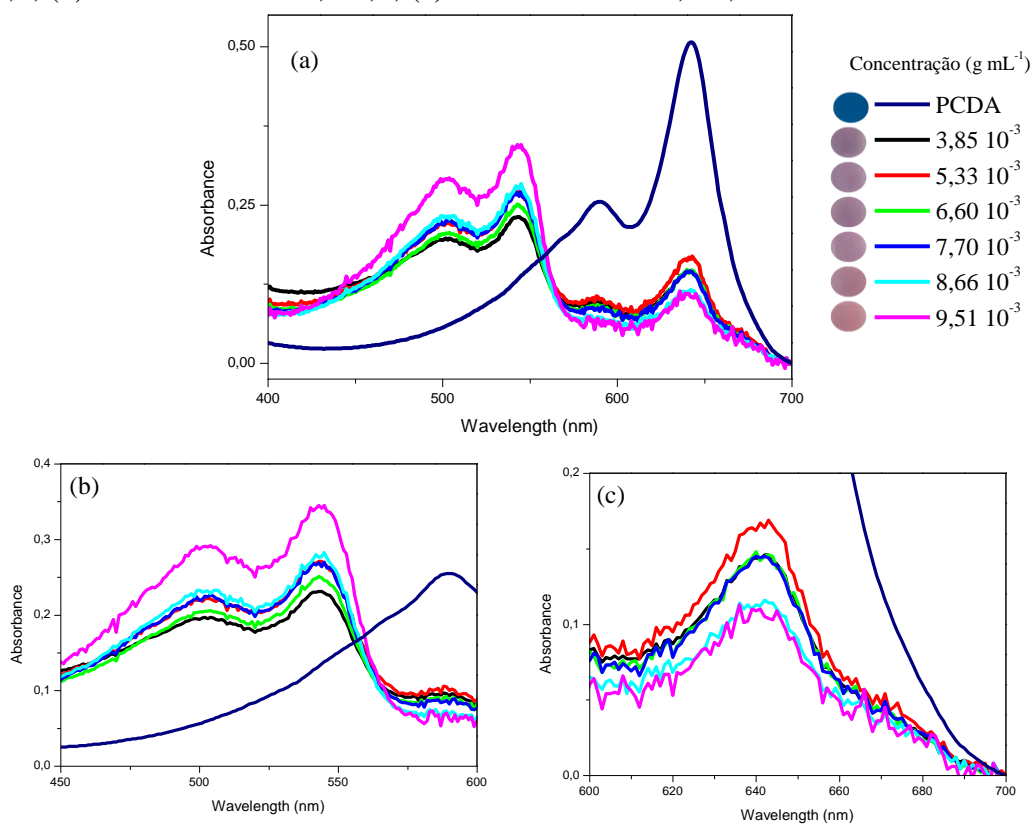
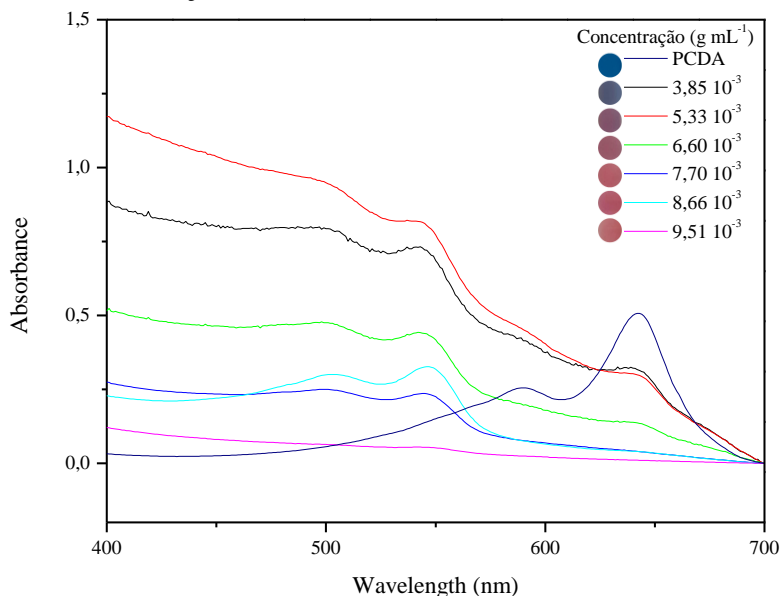


Figura 52. Espectros de absorção UV-Vis da interação entre a vesícula de PCDA/IPA e o ácido oleico em diferentes concentrações.



As Figuras 53 e 54 exibem os espectros de absorção UV-Vis resultantes da interação entre PCDA e TX-100 na presença de ácido palmítico e oleico, respectivamente. É notável que a amostra branca (PCDA/TX-100) apresenta uma coloração avermelhada, indicando uma reação entre a vesícula e o surfactante, conforme documentado na literatura (THONGMALAI et al., 2011). A mudança na coloração é corroborada pelos espectros abaixo, revelando deslocamentos dos picos para a esquerda. Este comportamento também é observado no ácido palmítico, evidenciado pelo deslocamento dos picos na amostra de PCDA pura de 640 e 590 nm para aproximadamente 550 e 500 nm, indicando a absorção da cor verde (percebida como vermelha pelos nossos olhos). Entretanto, é importante notar que os picos não se movimentam proporcionalmente com as alterações na concentração do ácido graxo. Na amostra AP₇, observa-se um pequeno pico de absorbância em ~630 nm, representando a absorção da cor laranja (percebida como azul pelos nossos olhos), o que concorda com o ensaio da Figura 47, onde foi observada uma coloração azulada na amostra. Quanto ao ácido oleico (Figura 54), o comportamento das amostras AO₁ a AO₆ assemelha-se ao encontrado no ensaio com o ácido palmítico, exibindo picos de absorbância em ~550 e ~500 nm. A amostra AO₇, no entanto, difere, apresentando menor absorbância nesses picos e a ausência de um pico em ~630 nm, conforme visualizado no ensaio demonstrado na Figura 48.

Figura 53. Espectro de absorção UV-VIs da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (AP₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AP₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AP₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AP₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AP₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AP₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AP₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹. (a) Absorbância de 0,0 a 1,0 e (b) Absorbância de 0,0 a 0,6.

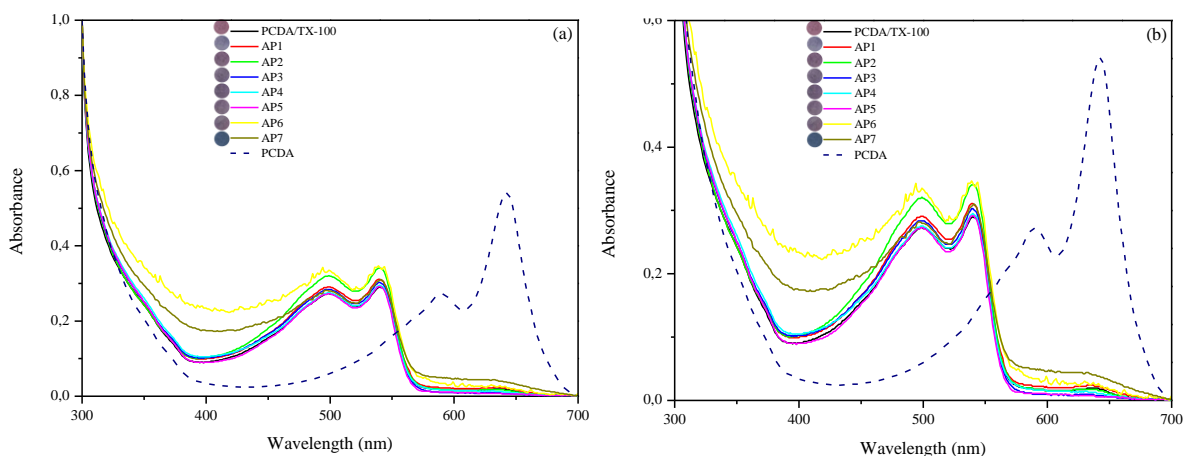
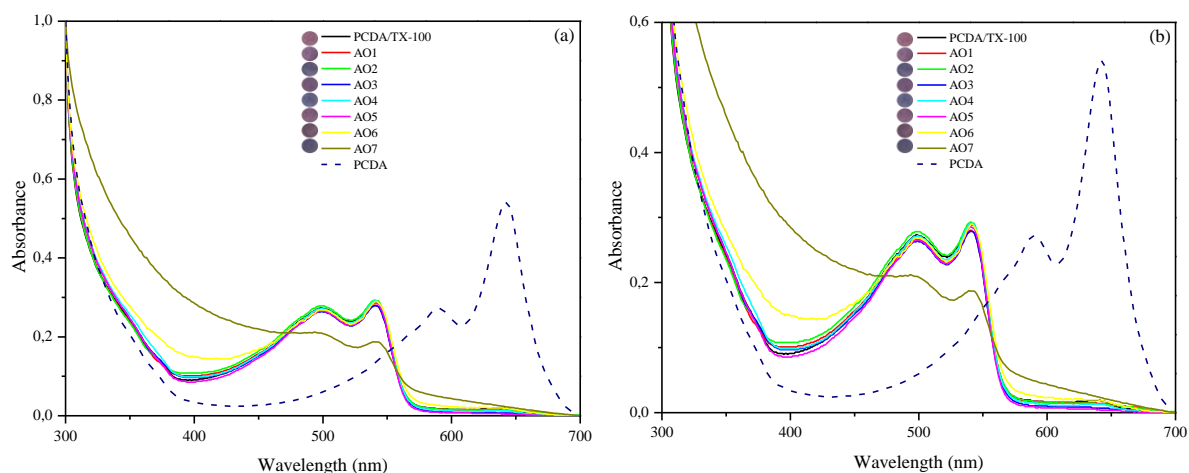


Figura 54. Espectro de absorção UV-VIs da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido oleico (AO₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AO₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AO₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AO₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AO₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AO₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AO₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹. (a) Absorbância de 0,0 a 1,0. (b) Absorbância de 0,0 a 0,6;



As Figuras 55 e 56 apresentam os espectros de absorção UV-Vis resultantes da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácido caprílico e da combinação dos três ácidos (TAG), respectivamente. Ao analisar o ensaio com ácido caprílico na Figura 49, nota-se que as amostras exibem uma coloração predominantemente avermelhada, com exceção da amostra AC₇, que apresenta uma tonalidade mais roxeada. Essa variação é visível nos espectros da Figura 55, onde o pico de absorbância é deslocado para a esquerda (550 e 500 nm), indicando uma coloração vermelha percebida pelos nossos olhos. Nota-se que esses picos aumentam quase proporcionalmente com o aumento da concentração de ácido graxo, com a exceção de AC₃, que

apresenta um pico mais elevado (próximo a AC₅ e AC₆), e AC₇, que mostra uma diminuição expressiva no pico vermelho e o surgimento de um pico em ~630 nm (azul para nossos olhos). Quanto ao ensaio que envolve todos os ácidos (TAG) na Figura 56, o comportamento assemelha-se ao observado com o ácido oleico. As amostras exibem picos semelhantes em ~550 e 500 nm, com TAG₇ apresentando uma menor absorbância. Esses resultados são consistentes com os ensaios descritos nas Figuras 48 e 50, onde as amostras exibem colorações rosadas e arroxeadas.

A modificação na coloração das vesículas de PCDA ocorre em resposta a perturbações em sua estrutura, seja por interações com moléculas específicas ou mudanças nas condições ambientais. Como resultado dessas perturbações, a molécula pode passar por reações de polimerização ou isomerização, levando a alterações em suas propriedades ópticas (CARPICK; SASAKI; ERIKSSON; et al., 2004). A interação com ácidos graxos pode ter desencadeado mudanças conformacionais ou reações que afetam a extensão da conjugação e, conseqüentemente, a cor absorvida e refletida pelas moléculas. Alguns fatores podem ter contribuído para a não linearidade observada nos resultados. Uma possível explicação é a saturação na interação, onde o aumento da concentração de ácido graxo pode ter resultando em uma saturação nos sítios de ligação, gerando uma resposta não proporcional na coloração. Outra hipótese é relacionada à natureza de interações hidrofóbicas, visto que essas interações devem ser balanceadas termodinamicamente para se tornarem favoráveis, podendo ser modificadas de acordo com o tamanho da molécula, entropias conformacionais e outros aspectos. Como resultado, a cor absorvida e refletida pode ter sido alterada.

Figura 55. Espectro de absorção UV-VIs da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico (AC₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, AC₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, AC₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, AC₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, AC₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, AC₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e AC₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹. (a) Absorbância de 0,0 a 1,0. (b) Absorbância de 0,0 a 0,6;

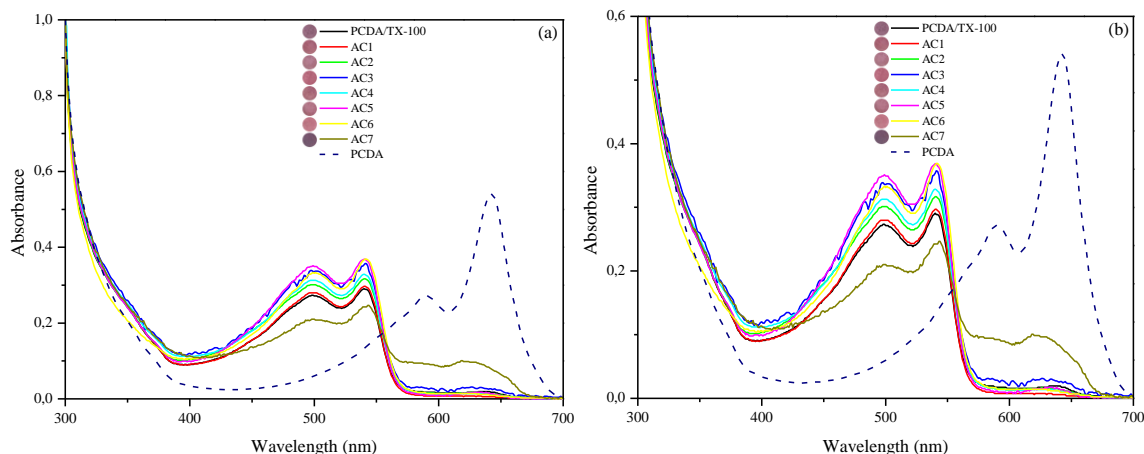
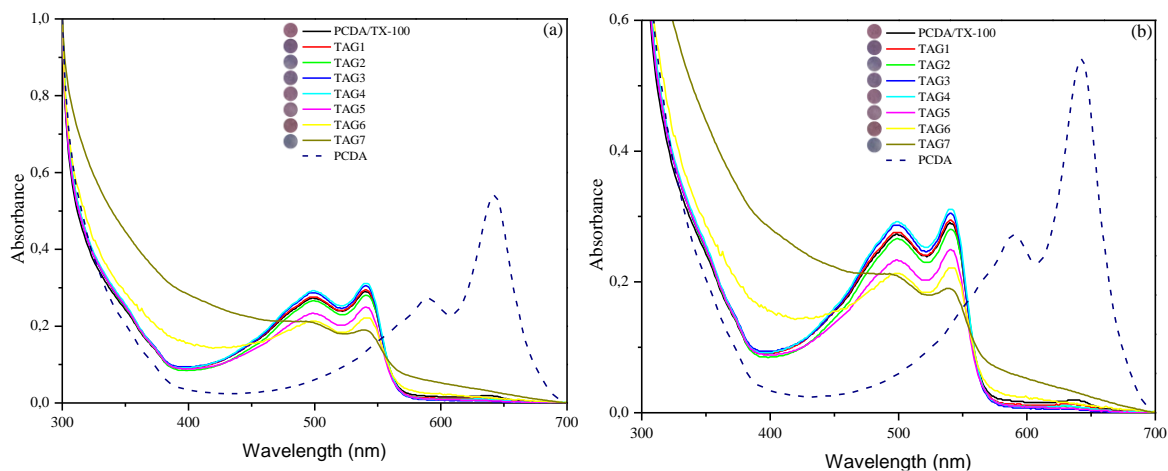


Figura 56. Espectro de absorção UV-VIs da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações dos três ácidos em conjunto (TAG₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, TAG₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, TAG₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, TAG₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, TAG₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, TAG₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e TAG₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹. (a) Absorbância de 0,0 a 1,0. (b) Absorbância de 0,0 a 0,6;



Os histogramas gerados para o ensaio PCDA/IPA com ácido palmítico e ácido oleico estão demonstrados nas Figuras 57 e 58, respectivamente. Onde as linhas sólidas representam o histograma RGB de cada amostra e as linhas pontilhadas representam o histograma RGB das vesículas de PCDA pura. Observa-se uma alteração dos picos de coloração vermelho, verde e azul nos histogramas.

Figura 57. Histograma RGB do ensaio colorimétrico PCDA/IPA utilizando diferentes concentrações de ácido palmítico: (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3}$ g mL⁻¹, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3}$ g mL⁻¹, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3}$ g mL⁻¹, (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3}$ g mL⁻¹, (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3}$ g mL⁻¹, (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3}$ g mL⁻¹.

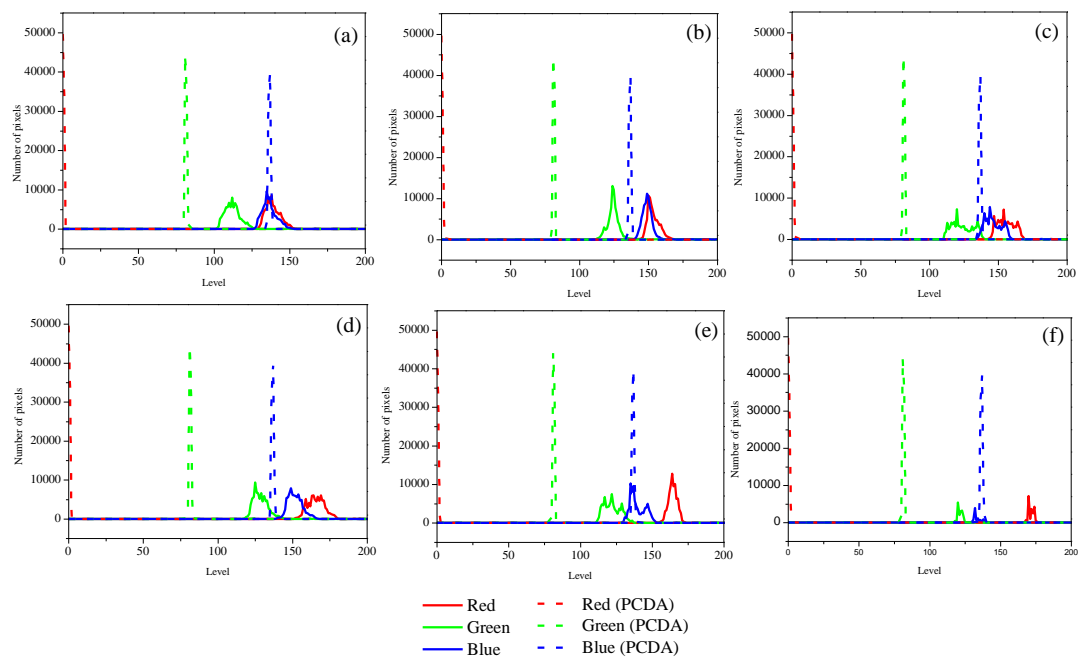
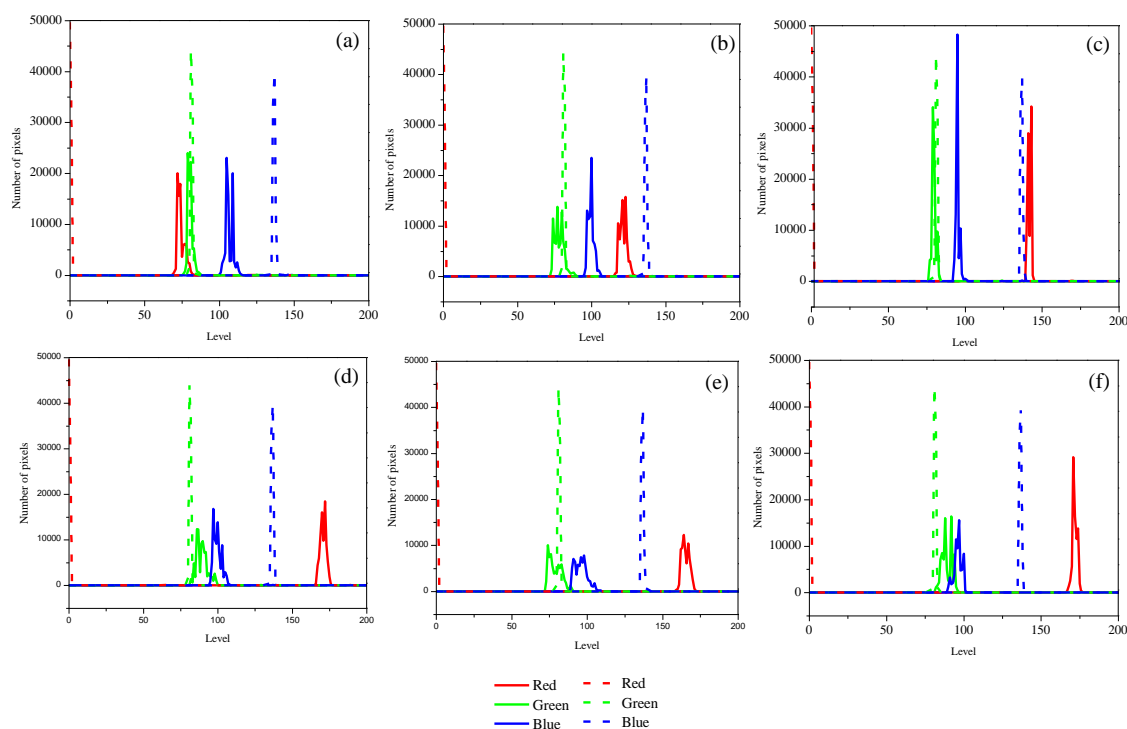


Figura 58. Histograma RGB do ensaio colorimétrico PCDA/IPA utilizando diferentes concentrações de ácido oleico: (a) Amostra 1: $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (b) Amostra 2: $5,33 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (c) Amostra 3: $6,60 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (d) Amostra 4: $7,70 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (e) Amostra 5: $8,66 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, (f) Amostra 6: $9,51 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$.

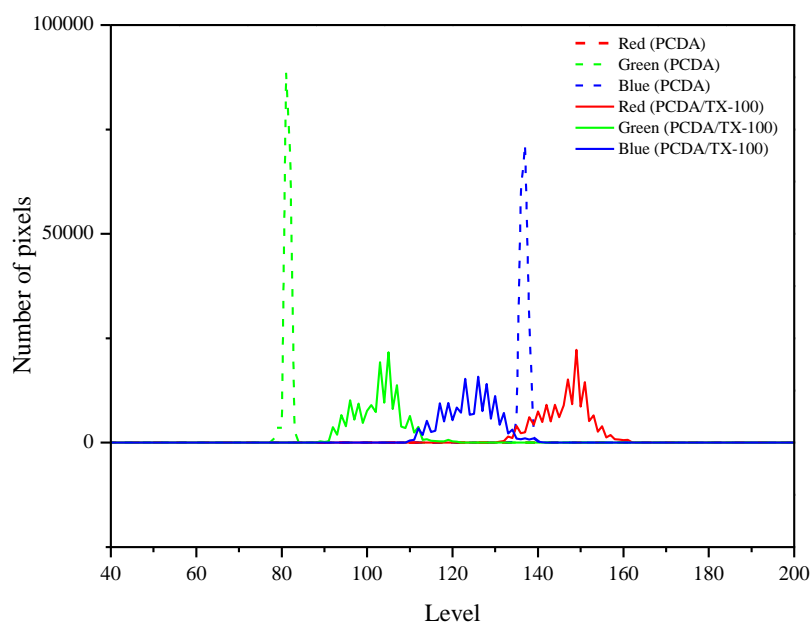


Na Figura 57, é possível observar a evolução do nível da coloração vermelha à medida que a concentração de ácido palmítico aumenta, sendo que na amostra com menor concentração (amostra 1 - $3,85 \cdot 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$), os picos de azul e vermelho estão no mesmo nível, e quando a concentração do ácido graxo aumenta, o pico da cor azul permanece praticamente no mesmo nível, enquanto ocorre o aumento do pico da cor vermelha. Na Figura 58 está representado o histograma da interação do PCDA/IPA com o ácido oleico, sendo que na menor concentração (amostra 1), o pico da cor azul se encontra em maior nível quando comparado com o da cor vermelha, e conforme a concentração do ácido oleico aumenta, o pico da cor vermelha ultrapassa o pico da coloração azul, já na segunda amostra, e continua a subir de nível, demonstrando a alteração da coloração.

A Figura 59 ilustra o histograma RGB da vesícula de PCDA pura e da interação entre PCDA/TX-100. Nota-se que na amostra pura, o PCDA não exibe presença significativa de vermelho, sendo que o nível de azul predomina em aproximadamente 149. Em contrapartida, na amostra PCDA/TX-100, a presença de vermelho não apenas se manifesta, mas também atinge o maior nível em aproximadamente 140-160, demonstrando que há uma interação

ocorrendo entre o PCDA e o TX-100. Essa observação de acordo com as cores percebidas nas amostras.

Figura 59. Histograma RGB de PCDA pura e da interação PCDA/TX-100.



As Figuras 60 e 61 exibem os histogramas RGB da interação entre PCDA/TX-100 (linhas pontilhadas) na presença de ácido palmítico e oleico (linhas sólidas), respectivamente. Observa-se que na amostra com ácido palmítico, Figura 60, o nível de azul predomina o nível de vermelho em algumas amostras (a), (c), (d) e (g), enquanto em outras concentrações esses níveis se sobrepõem. O tom de azul atinge seu ponto máximo, aproximadamente entre 140 e 160, na amostra de menor concentração (AP_1), mantendo-se praticamente constante na faixa de 100 a 140 à medida que a concentração aumenta. Por outro lado, o nível de vermelho começa em torno de 100 a 140, alcançando seu ponto mínimo na amostra de maior concentração (AP_7) com valores entre 60 e 80. O mesmo padrão é evidenciado com o ácido oleico, conforme Figura 61. O nível de tonalidade azul tem seu ponto inicial em aproximadamente 120 a 140 (AO_1) e diminui de maneira não proporcional, à medida que a concentração do ácido graxo aumenta, para a faixa de ~100-120 em AO_7 . Paralelamente, o nível de tonalidade vermelha inicia-se em contraposição ao azul, situando-se em aproximadamente 120 a 140 (AO_1), e diminui alcançando cerca de ~80-100 em AO_7 .

Figura 60. Histograma RGB do ensaio colorimétrico entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico ((a) AP₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, (b) AP₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, (c) AP₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, (d) AP₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, (e) AP₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, (f) AP₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e (g) AP₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

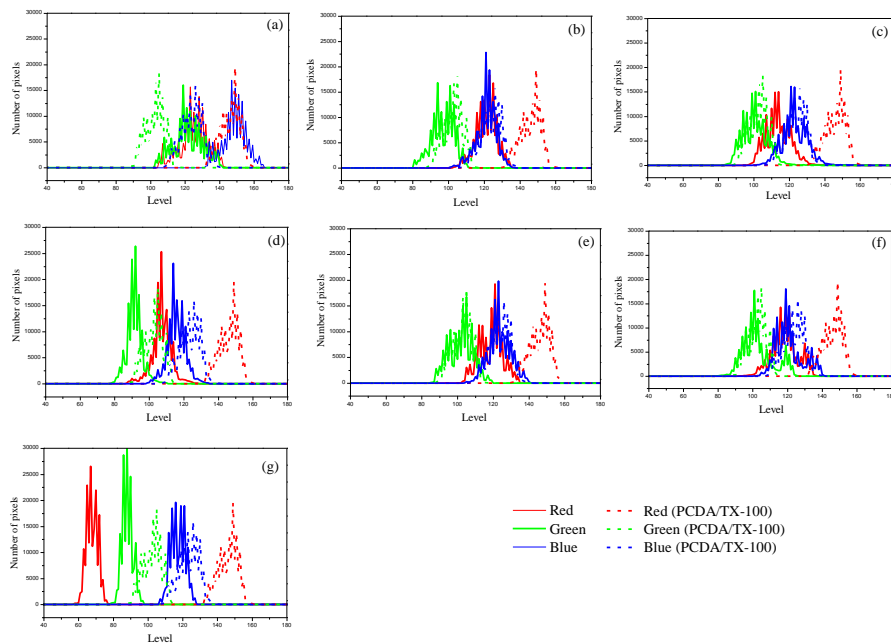
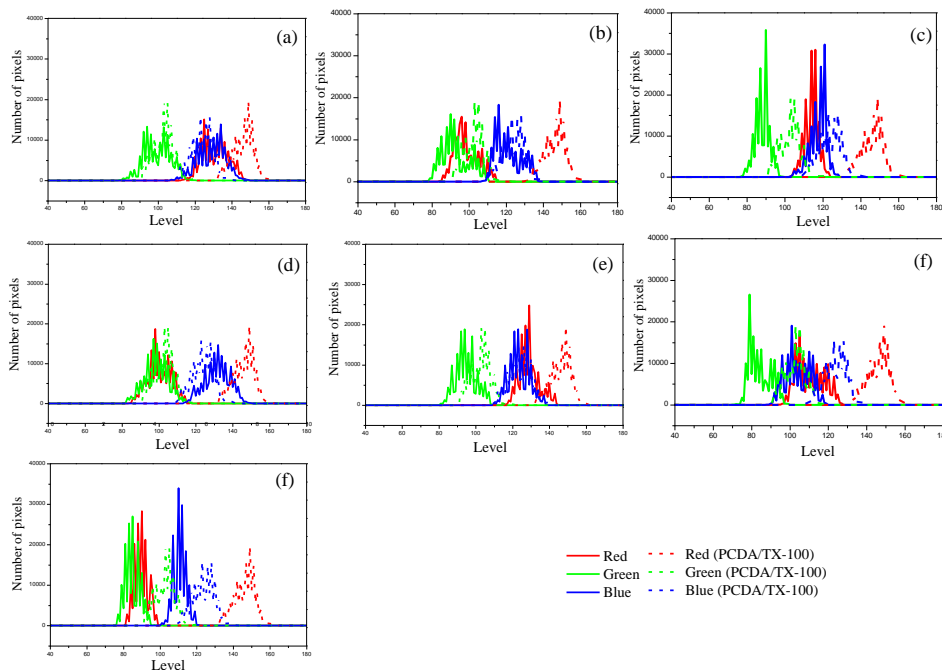


Figura 61. Histograma RGB do ensaio colorimétrico entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido oleico ((a) AO₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, (b) AO₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, (c) AO₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, (d) AO₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, (e) AO₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, (f) AO₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e (g) AO₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



No ensaio com ácido caprílico, conforme Figura 62, é possível observar um maior nível de vermelho em todas as amostras. Esse aumento atinge seu ponto máximo de

aproximadamente 180 a 200 nas amostras AC₃ e AC₆, enquanto alcança seu ponto mínimo (~100-120) em AC₇. Em contraste, o nível de tonalidade azul tem seu início em torno de 100 a 140 (AC₁) e apresenta apenas algumas pequenas variações com o aumento da concentração. Essa observação é consistente com as fotos dos ensaios, que revelam uma predominância da cor avermelhada nas amostras, exceto pela amostra de maior concentração, AC₇ (g), que exibe uma coloração mais roxeada. O histograma confirma essa percepção ao indicar uma diminuição no nível de vermelho, quase equivalendo ao nível de azul em AC₇. No ensaio com todos os ácidos (TAG), conforme Figura 63, observa-se que os níveis de tonalidade vermelha e azul começam em um patamar semelhante na amostra de menor concentração (TAG₁), situando-se entre ~100 e 140. É notável que, com o aumento da concentração de ácido graxo, o nível de azul ultrapassa o nível de vermelho em TAG₇. Entretanto, essa variação nos níveis ocorre de maneira não proporcional, uma vez que, em alguns momentos, o nível de vermelho (~140-160) torna-se superior ao nível de azul (~120 – 140), como observado nas amostras TAG₄, TAG₅ e TAG₆. Essa não linearidade nos níveis já era esperada ao considerar as variações de coloração observadas nos ensaios da Figura 50.

Figura 62. Histograma RGB do ensaio colorimétrico entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido caprílico ((a) AC₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, (b) AC₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, (c) AC₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, (d) AC₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, (e) AC₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, (f) AC₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e (g) AC₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

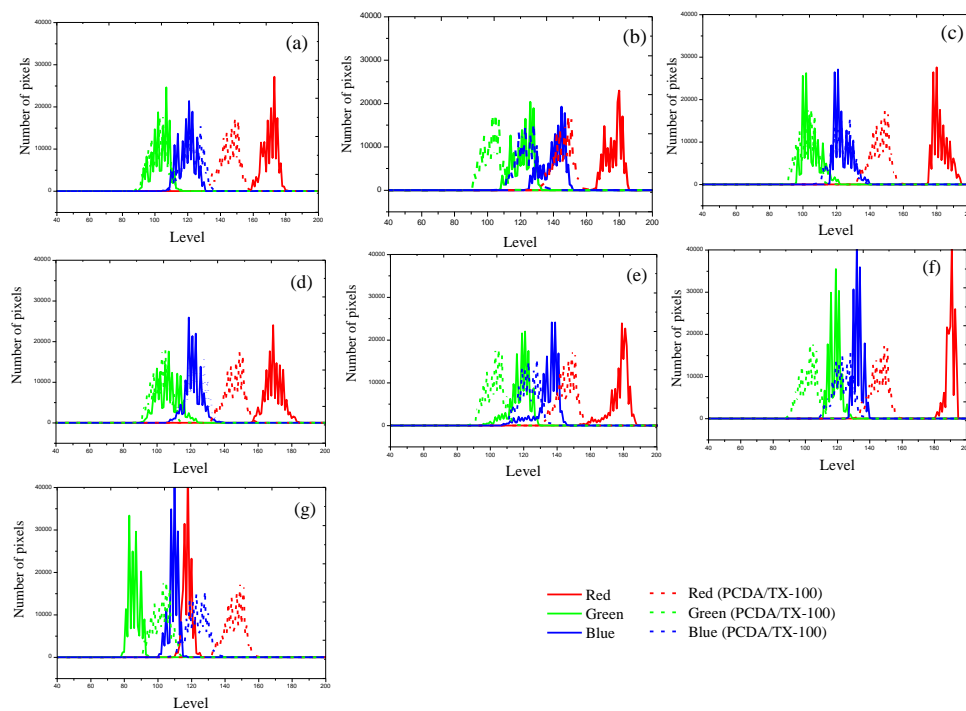
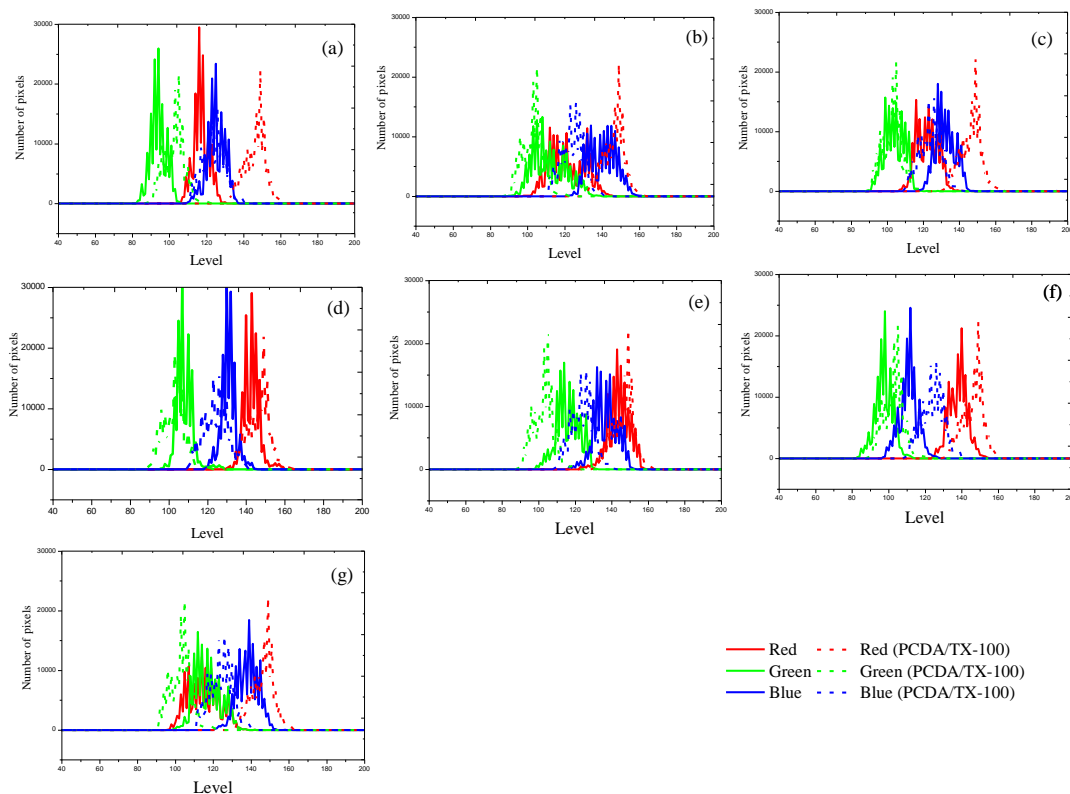


Figura 63. Histograma RGB do ensaio colorimétrico entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácidos graxos ((a) TAG₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$, (b) TAG₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$, (c) TAG₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$, (d) TAG₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$, (e) TAG₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$, (f) TAG₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$ e (g) TAG₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



O modelo de cores RGB, um sistema aditivo, combina as luzes vermelha (R), verde (G) e azul (B) em diversas proporções para retratar as cores em uma imagem. A análise dos valores RGB tem se revelado eficaz na quantificação da variação de cor em sensores colorimétricos, integrando os três valores R, G e B em uma única métrica com sucesso (WESTON; KUCHEL; CHANDRAWATI, 2021).

Na Tabela 14, são apresentados os valores médios de RGB e os valores de CV (valor de cor) para as intensidades de vermelho e azul, calculados através das equações 1 e 2, em cada ensaio da interação entre PCDA/IPA na presença de ácido palmítico e ácido oleico. Por outro lado, a Tabela 15 exibe esses dados para o ensaio PCDA/TX-100 na presença de ácido palmítico, ácido oleico, ácido caprílico e na combinação destes ácidos. A expressão CV (red) indica a magnitude do componente vermelho, ao passo que CV (blue) reflete a magnitude do componente azul, ambos relativos à magnitude total dos demais componentes (vermelho, verde e azul). A escala RGB padrão adota valores inteiros de 0 a 255 para cada uma das três cores, em que (0,0,0) simboliza preto e (255,255,255) representa a cor branca (RAJAMANIKANDAN; ILANCHELIAN, 2022).

Tabela 14. Valores de RGB e CV para ensaio AuNP/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (AP) e ácido oleico (AO).

AG	Concentração (g/mL)	R	G	B	CV (RED)	CV (BLUE)
AP	3,85 10 ⁻³	117,33 ± 7,37	105,67 ± 2,64	122,67 ± 2,64	-0,467 ^{Aa}	-0,450 ^{Bb}
	5,33 10 ⁻³	124,67 ± 4,51	111,33 ± 3,05	128,33 ± 1,52	-0,465 ^{Aa}	-0,453 ^{Bb}
	6,60 10 ⁻³	128,33 ± 2,64	116,33 ± 5,03	123,33 ± 4,04	-0,458 ^{Aa}	-0,474 ^{Bb}
	7,70 10 ⁻³	137,33 ± 6,51	115,67 ± 1,30	134,67 ± 4,51	-0,450 ^{Aa}	-0,459 ^{Bb}
	8,66 10 ⁻³	144,33 ± 4,93	112,33 ± 4,04	121,33 ± 5,69	-0,418 ^{Aa}	-0,493 ^{Bb}
	9,51 10 ⁻³	154,67 ± 6,66	109,33 ± 3,51	119,33 ± 3,78	-0,397 ^{Aa}	-0,510 ^{Bb}
AO	3,85 10 ⁻³	68,33 ± 3,51	65,67 ± 2,08	87,33 ± 2,89	-0,510 ^{Aa}	-0,403 ^{Bb}
	5,33 10 ⁻³	87,67 ± 1,15	68,33 ± 2,81	81,33 ± 2,08	-0,432 ^{Aa}	-0,465 ^{Bb}
	6,60 10 ⁻³	105,67 ± 5,03	74,67 ± 2,66	79,67 ± 2,86	-0,391 ^{Aa}	-0,513 ^{Bb}
	7,70 10 ⁻³	121,67 ± 1,53	83,33 ± 4,04	84,67 ± 4,16	-0,376 ^{Aa}	-0,534 ^{Bb}
	8,66 10 ⁻³	123,67 ± 1,53	79,67 ± 5,86	88,67 ± 1,53	-0,373 ^{Aa}	-0,517 ^{Bb}
	9,51 10 ⁻³	129,00 ± 2,00	89,33 ± 0,58	80,33 ± 3,21	-0,364 ^{Aa}	-0,570 ^{Bb}

Resultados expressos como médias ± desvio padrão. Teste tukey determinando diferenças significativas entre os valores encontrados de RGB ($p < 0,05$). Subscrito A-B: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por concentração. Subscrito a-b: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por ácido graxo.

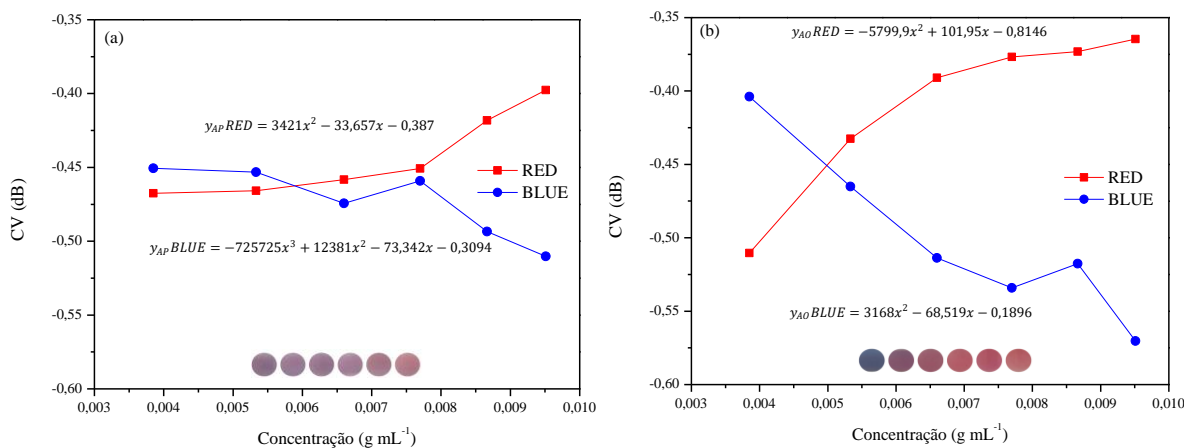
Os gráficos na Figuras 64 ilustram os parâmetros de CV vermelho e azul em relação à concentração de ácido graxo nos ensaios colorimétricos (PCDA/IPA) utilizando ácido palmítico e ácido oleico, bem como as respectivas equações das retas. Observa-se que à medida que a concentração dos ácidos graxos aumenta, a intensidade da cor vermelha aumenta enquanto a intensidade da cor azul diminui para ambos os ácidos graxos. Essa transição é evidenciada pelo cruzamento das linhas de vermelho e azul nos ensaios, ocorrendo na passagem da amostra AP₂ para AP₃ no caso do ácido palmítico e já na transição de AO₁ para AO₂ no ácido oleico. Para o ácido palmítico, foi estabelecida uma correlação linear de $R^2=0,9789$ (vermelho) e $R^2=0,8787$ (azul). No caso do ácido oleico, os valores foram $R^2=0,9932$ para o vermelho e $R^2=0,933$ para o azul.

Tabela 15. Valores de RGB e CV para ensaio AuNP/TX-100 na presença de diferentes concentrações de ácidos graxos.

Ácido graxo	Concentração (g/mL)	R	G	B	CV (RED)	CV (BLUE)
Ácido palmítico	9,020 10 ⁻³	108,2 ± 7,52	103,6 ± 1,30	127,2 ± 5,85	-0,479 ± 0,018 ^{Aa}	-0,434 ± 0,011 ^{Bc}
	11,275 10 ⁻³	92,2 ± 5,17	79,0 ± 6,20	97,4 ± 4,56	-0,463 ± 0,003 ^{Aa}	-0,443 ± 0,005 ^{Bc}
	13,530 10 ⁻³	89,0 ± 7,74	81,0 ± 7,74	98,2 ± 7,92	-0,473 ± 0,006 ^{Aa}	-0,432 ± 0,007 ^{Bc}
	15,785 10 ⁻³	88,2 ± 6,18	78,8 ± 5,36	97,8 ± 6,42	-0,475 ± 0,006 ^{Aa}	-0,437 ± 0,007 ^{Bc}
	18,044 10 ⁻³	94,6 ± 4,39	84,8 ± 4,43	102,6 ± 4,72	-0,459 ± 0,015 ^{Aa}	-0,448 ± 0,010 ^{Bc}
	36,080 10 ⁻³	94,4 ± 11,84	86,2 ± 11,56	100,0 ± 10,83	-0,462 ± 0,012 ^{Aa}	-0,455 ± 0,010 ^{Bc}
	72,160 10 ⁻³	66,4 ± 3,84	70,0 ± 3,74	94,2 ± 4,43	-0,492 ± 0,05 ^{Aa}	-0,432 ± 0,046 ^{Bc}
Ácido oleico	9,020 10 ⁻³	102,8 ± 4,32	80,0 ± 4,68	92,2 ± 4,38	-0,443 ± 0,018 ^{Aa}	-0,457 ± 0,018 ^{Bc}
	11,275 10 ⁻³	102,6 ± 9,55	83,0 ± 8,97	100,4 ± 10,4	-0,472 ± 0,029 ^{Aa}	-0,433 ± 0,023 ^{Bc}
	13,530 10 ⁻³	103,6 ± 6,50	85,2 ± 6,30	103,2 ± 7,36	-0,458 ± 0,009 ^{Aa}	-0,442 ± 0,013 ^{Bc}
	15,785 10 ⁻³	83,6 ± 4,77	69,0 ± 5,04	88,4 ± 4,82	-0,482 ± 0,024 ^{Aa}	-0,420 ± 0,016 ^{Bc}
	18,044 10 ⁻³	93,8 ± 8,01	75,2 ± 7,56	89,6 ± 8,01	-0,447 ± 0,007 ^{Aa}	-0,450 ± 0,009 ^{Bc}
	36,080 10 ⁻³	110,0 ± 4,18	87,0 ± 4,18	99,6 ± 3,84	-0,442 ± 0,012 ^{Aa}	-0,462 ± 0,012 ^{Bc}
	72,160 10 ⁻³	84,8 ± 5,89	79,8 ± 5,17	91,4 ± 3,78	-0,489 ± 0,111 ^{Aa}	-0,431 ± 0,018 ^{Bc}
Ácido caprílico	9,020 10 ⁻³	124,6 ± 5,50	91,2 ± 5,16	97,2 ± 5,21	-0,403 ± 0,004 ^{Ab}	-0,505 ± 0,005 ^{Bd}
	11,275 10 ⁻³	136,8 ± 4,76	108,2 ± 4,97	118,8 ± 4,76	-0,410 ± 0,015 ^{Ab}	-0,497 ± 0,120 ^{Bd}
	13,530 10 ⁻³	134,8 ± 5,26	95,2 ± 5,40	102,2 ± 5,40	-0,390 ± 0,003 ^{Ab}	-0,513 ± 0,002 ^{Bd}
	15,785 10 ⁻³	130,2 ± 6,38	99,4 ± 7,13	103,6 ± 5,98	-0,407 ± 0,003 ^{Ab}	-0,505 ± 0,006 ^{Bd}
	18,044 10 ⁻³	134,3 ± 7,12	103,0 ± 6,44	110,4 ± 8,79	-0,409 ± 0,005 ^{Ab}	-0,502 ± 0,007 ^{Bd}
	36,080 10 ⁻³	145,8 ± 2,68	109,8 ± 4,38	113,4 ± 3,57	-0,406 ± 0,006 ^{Ab}	-0,510 ± 0,003 ^{Bd}
	72,160 10 ⁻³	85,6 ± 1,82	70,2 ± 3,03	85,4 ± 3,13	-0,429 ± 0,022 ^{Ab}	-0,482 ± 0,033 ^{Bd}
Ácido palmítico / Ácido oleico / Ácido caprílico	9,020 10 ⁻³	99,8 ± 2,49	81,8 ± 2,49	98,8 ± 2,49	-0,460 ± 0,012 ^{Aa}	-0,438 ± 0,015 ^{Bc}
	11,275 10 ⁻³	101,4 ± 3,04	84,8 ± 1,92	104,0 ± 3,67	-0,472 ± 0,017 ^{Aa}	-0,436 ± 0,013 ^{Bc}
	13,530 10 ⁻³	100,8 ± 3,78	77,0 ± 2,91	92,6 ± 6,10	-0,453 ± 0,026 ^{Aa}	-0,447 ± 0,021 ^{Bc}
	15,785 10 ⁻³	97,4 ± 4,45	79,6 ± 4,16	96,4 ± 4,49	-0,448 ± 0,009 ^{Aa}	-0,455 ± 0,003 ^{Bc}
	18,044 10 ⁻³	94,0 ± 4,84	77,4 ± 4,72	96,2 ± 6,72	-0,456 ± 0,004 ^{Aa}	-0,450 ± 0,007 ^{Bc}
	36,080 10 ⁻³	102,0 ± 6,59	80,4 ± 6,50	91,4 ± 6,65	-0,428 ± 0,002 ^{Aa}	-0,481 ± 0,006 ^{Bc}
	72,160 10 ⁻³	84,0 ± 10,12	82,8 ± 10,18	114,4 ± 9,32	-0,513 ± 0,011 ^{Aa}	-0,408 ± 0,021 ^{Bc}

Resultados expressos como médias ± desvio padrão. Teste tukey determinando diferenças significativas entre os valores encontrados de RGB (p < 0,05). Subscrito A-B: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por concentração. Subscritos a-d: diferenças significativas entre os valores encontrados de CV por ácido graxo.

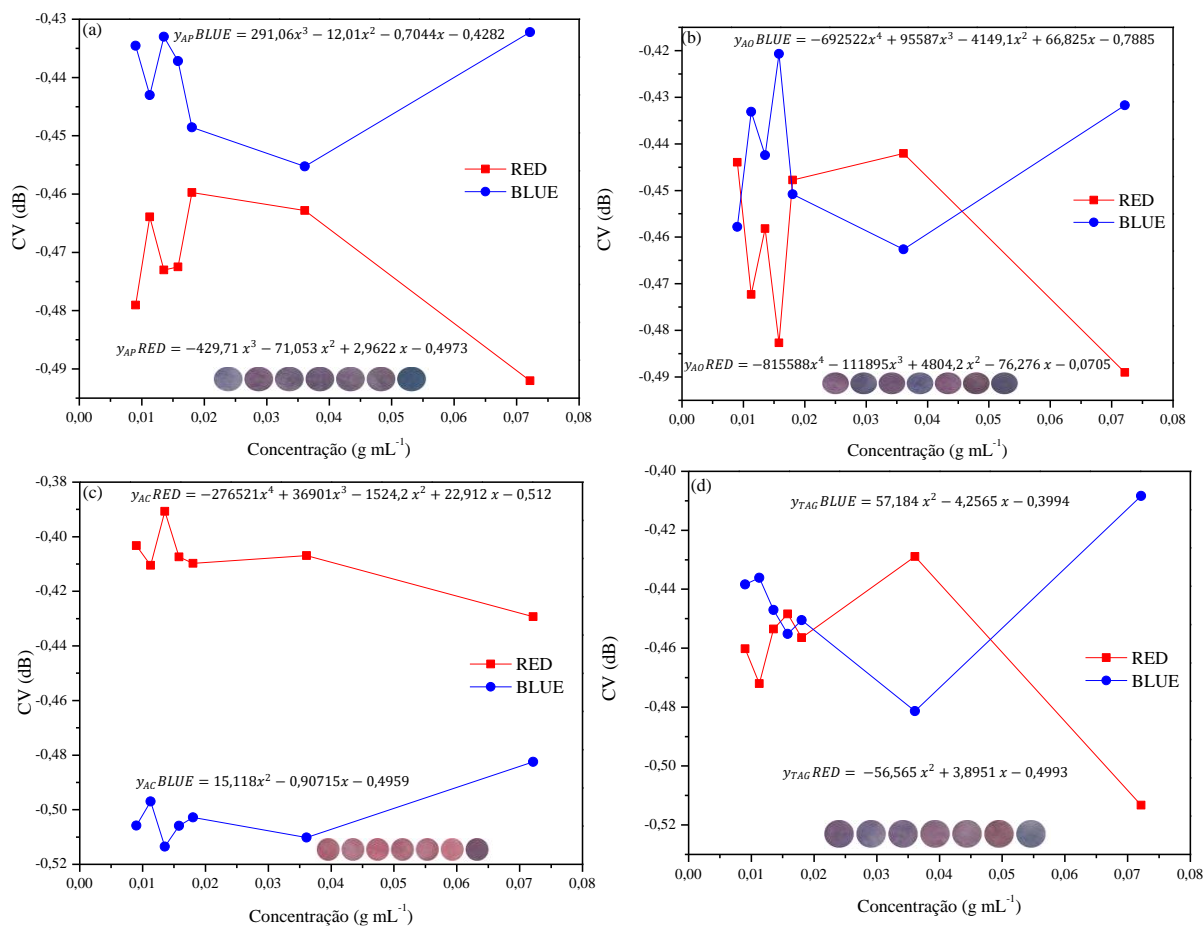
Figura 64. Valor de cor (CV) do vermelho e azul para o ensaio colorimétrico utilizando PCDA/IPA na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico e (b) ácido oleico.



Os gráficos de CV que representam a interação de PCDA/TX-100 foram gerados e estão apresentados na Figura 65, bem como as respectivas equações as retas obtidas. Ao analisar a interação com o ácido palmítico, conforme mostrado na Figura 65 (a), nota-se que até a amostra AP₅, a mudança na cor não segue um padrão linear. Houve um aumento na coloração vermelha de AP₁ para AP₂ e de AP₄ para AP₅, e só então a intensidade de vermelho diminuiu. Similarmente, a intensidade de azul diminuiu de AP₁ para AP₂ e de AP₃ para AP₅, antes de aumentar de forma linear. As linhas de intensidade de vermelho e azul no ensaio com ácido palmítico não chegam a se cruzar, o que contrasta com o ensaio com ácido oleico. Neste último, Figura 65(b), também se observa uma alteração não linear na intensidade de azul e vermelho com o aumento da concentração do ácido graxo. Entretanto, a partir da amostra AO₆, o vermelho diminui substancialmente, enquanto o azul aumenta, resultando no cruzamento das linhas. Para o ácido palmítico foi estabelecida uma correlação linear de $R^2 = 0,7979$ para o vermelho e $R^2 = 0,7435$ para o azul. Já para o ácido oleico $R^2 = 0,7609$ (vermelho) e $R^2 = 0,727$ (azul).

Ao examinar o gráfico de CV para as intensidades de vermelho e azul no ensaio que envolve o ácido caprílico. Figura 65 (c), destaca-se que a cor vermelha exibe um CV superior ao azul, o que contrasta com os ensaios contendo ácido palmítico e ácido oleico. Essa discrepância alinha-se com as imagens dos ensaios, onde a cor vermelha predomina sobre a azul. Já no ensaio com os três ácidos, Figura 65(d), é perceptível o cruzamento das linhas de intensidade do vermelho e azul em três pontos distintos, evidenciando a não linearidade da transição colorimétrica. Para o ácido caprílico foi estabelecida uma correlação linear de $R^2 = 0,7595$ para o vermelho e $R^2 = 0,7663$ para o azul. Já para o ensaio contendo os três ácidos foi obtido $R^2 = 0,932$ (vermelho) e $R^2 = 0,9624$ (azul).

Figura 65. Valor de cor (CV) do vermelho e azul para o ensaio colorimétrico utilizando PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico, (b) ácido oleico, (c) ácido caprílico e (d) três ácidos graxos em conjunto.



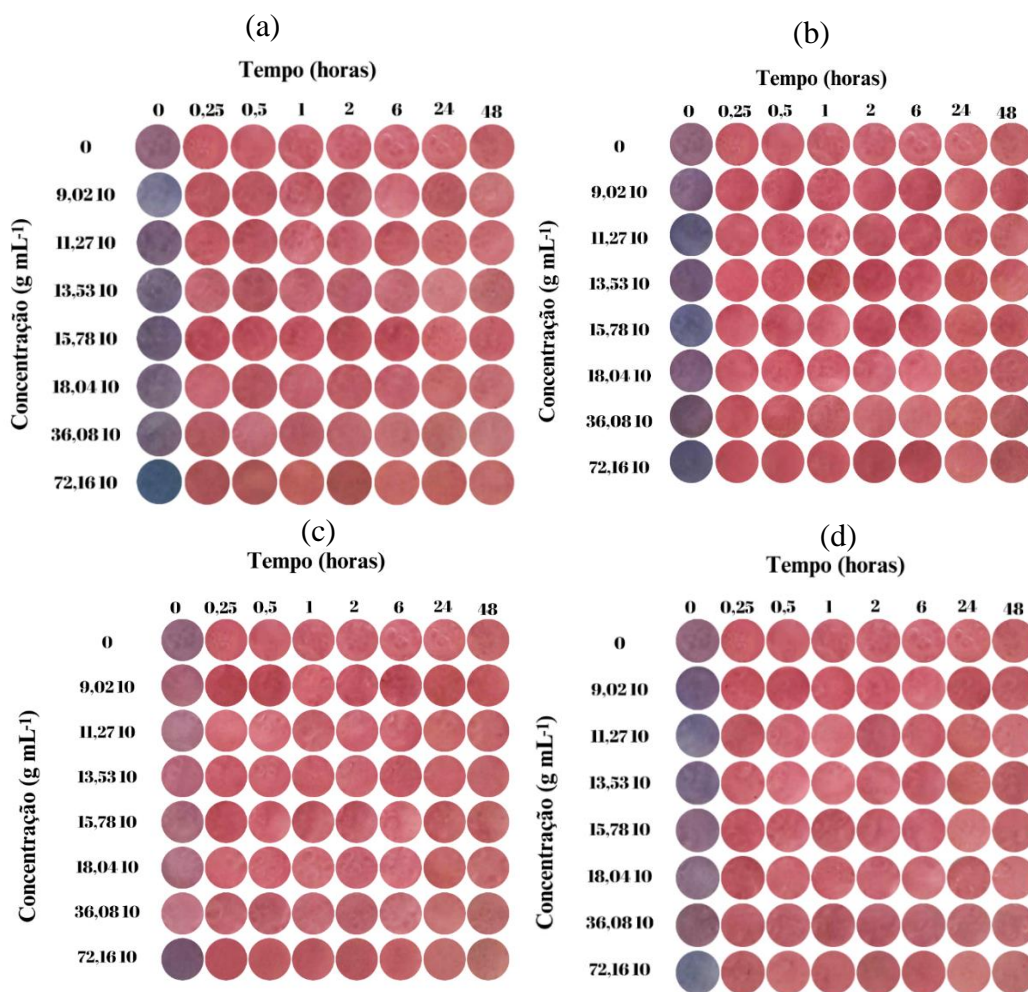
A vesícula de PCDA e o L64 exibem em suas estruturas regiões distintas, compreendendo tanto áreas hidrofílicas quanto hidrofóbicas. No PCDA, a região hidrofílica é atribuída à cabeça polar da estrutura, enquanto no L64, essa característica é conferida pelos grupos EO. Por outro lado, a porção hidrofóbica no PCDA é constituída por uma cauda de hidrocarboneto, e no L64, pelos grupos PO (DE SOUZA et al., 2016). É provável que a interação entre o L64 e o PCDA ocorra predominantemente em suas regiões hidrofóbicas, utilizando interações hidrofóbicas. Esse tipo de interação contribui para aumentar a entropia do sistema, liberando um maior número de moléculas de água que estariam solvatando tanto o L64 quanto o PCDA. A interação hidrofóbica entre essas moléculas favoreceria uma maior exposição da parte hidrofílica para as moléculas de água presentes na solução, resultando em uma melhor dispersão dessa estrutura em água. Quando um ácido graxo é adicionado, especialmente um com uma cadeia de hidrocarboneto mais longa e, portanto, maior hidrofobicidade, esse ácido graxo pode encontrar dificuldades em acessar os núcleos

hidrofóbicos da vesícula de L64/PCDA, devido a barreiras termodinâmicas e estéricas. Consequentemente, esse ácido graxo tende a interagir mais na superfície da vesícula, levando à formação de uma emulsão óleo-água. Ao introduzir um surfactante, a turbidez da emulsão tende a diminuir devido à redução da tensão interfacial, tornando a interação entre a vesícula e o ácido graxo mais favorável. Esse fenômeno contribui para uma maior estabilidade na dispersão, promovendo uma interação mais eficaz entre a vesícula e o ácido graxo na solução.

Os ensaios realizados com álcool isopropílico resultaram em amostras mais turvas, embora os resultados obtidos tanto na espectrofotometria quanto na análise RGB tenham sido mais robustos. Em contrapartida, os ensaios colorimétricos utilizando Triton X-100 como solvente apresentaram menor turbidez nas amostras. No entanto, apesar de as imagens evidenciarem diferenças nas colorações entre as diferentes concentrações de ácidos graxos, os espectros ainda enfrentaram desafios para registrar essas nuances, possivelmente devido à persistência da turbidez. Ao analisar os dados do RGB, observa-se que a intensidade de azul diminui, enquanto a de vermelho aumenta, ainda que de maneira não linear. Essa não linearidade na transição colorimétrica pode ser resultado da complexidade da interação hidrofóbica e da formação de microdomínios na membrana vesicular (YADAV; TIWARI, 2023).

Foi conduzido um estudo cinético das cores para cada concentração de ácido graxo, tanto individualmente quanto em conjunto, ao entrar em contato com PCDA e TX-100, Figura 66. O objetivo desse estudo foi analisar as mudanças colorimétricas ao longo do tempo que ocorreu nas amostras contendo ácido palmítico (a), ácido oleico (b), ácido caprílico (c) e os três ácidos (d). Observa-se que a transição da coloração para roxo/azul nas amostras ocorreu inicialmente, mas já dentro dos primeiros 5 minutos, as amostras assumiram a coloração rosa, com diferenças de tonalidade bastante sutis.

Figura 66. Cinética das cores da interação entre PCDA/TX-100 na presença de diferentes concentrações de (a) ácido palmítico, (b) ácido oleico, (c) ácido caprílico e (d) três ácidos em conjunto.



Os espectros UV-Vis do ensaio cinético também foram realizados. No ensaio com ácido palmítico (Figura 67), observa-se que os picos em ~500 e 550 nm permanecem presentes, sofrendo apenas uma diminuição não proporcional ao longo do tempo. À medida que a concentração aumenta, os ruídos nas linhas dos espectros também aumentam, possivelmente devido à turbidez. Em contraste, no ensaio com ácido oleico (Figura 68), não são observados esses ruídos, e os picos em ~500 e 550 nm mantêm praticamente a mesma absorbância, com uma alteração notável apenas na maior concentração (AO₇), onde se nota uma diminuição mais acentuada desses picos em comparação com a amostra de PCDA/TX-100. No ensaio com ácido caprílico (Figura 69), os espectros revelaram a presença de um novo pico em ~630 nm, o qual aumenta conforme a concentração do ácido caprílico se eleva. Este pico, que se traduz visualmente na cor azul, atinge sua intensidade máxima de imediato, mas ao longo do tempo, observa-se uma diminuição gradual desse pico, indicando uma resposta colorimétrica imediata

que, posteriormente, evolui para uma tonalidade avermelhada. No ensaio com ácido caprílico (Figura 70), os espectros revelaram a presença de um novo pico em ~630 nm, o qual aumenta conforme a concentração do ácido caprílico se eleva. Este pico, que se traduz visualmente na cor azul, atinge sua intensidade máxima de imediato, mas ao longo do tempo, observa-se uma diminuição gradual desse pico, indicando uma resposta colorimétrica imediata que, posteriormente, evolui para uma tonalidade avermelhada.

A transição de cor inicial para roxo/azul seguida por uma mudança para rosa, com diferenças sutis de tonalidade em um curto período de tempo, pode ser atribuída à dinâmica das interações moleculares envolvidas no sistema. Essa rápida transformação de cores sugere a ocorrência de processos dinâmicos e equilíbrios químicos durante a interação entre os ácidos graxos, PCDA e TX-100. Essa dinâmica pode envolver reorganizações nas estruturas moleculares, alterações nas interações hidrofóbicas e ajustes na microestrutura da vesícula, influenciando diretamente na absorção de luz e, conseqüentemente, na percepção visual da cor. A transição para a coloração rosa pode ser resultado de modificações nas condições de conjugação e comprimento de onda de absorção das moléculas presentes no sistema, indicando uma complexidade nas interações que se desdobram ao longo do tempo

Weston et al., (2020) desenvolveram um sensor colorimétrico baseado em PCDA para a detecção de ácidos graxos livres, incluindo o ácido oleico, como indicador de validade para leites vegetais. A interação entre as vesículas de PCDA e os ácidos graxos foi investigada por meio de microscopia eletrônica de transmissão, avaliando também a resposta colorimétrica. O sensor desenvolvido, apresentou uma pronunciada resposta colorimétrica, sendo capaz de detectar o teor de ácidos graxos por meio da interação entre a cadeia carbônica do ácido e a porção hidrofóbica do PCDA. Essa abordagem espelha a suposição adotada no presente projeto.

Figura 67. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácido palmítico durante 48 horas. ((a) AP₁: $9,020 \cdot 10^{-3}$; (b) AP₂: $11,275 \cdot 10^{-3}$; (c) AP₃: $13,530 \cdot 10^{-3}$; (d) AP₄: $15,785 \cdot 10^{-3}$; (e) AP₅: $18,040 \cdot 10^{-3}$; (f) AP₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$; (g) AP₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

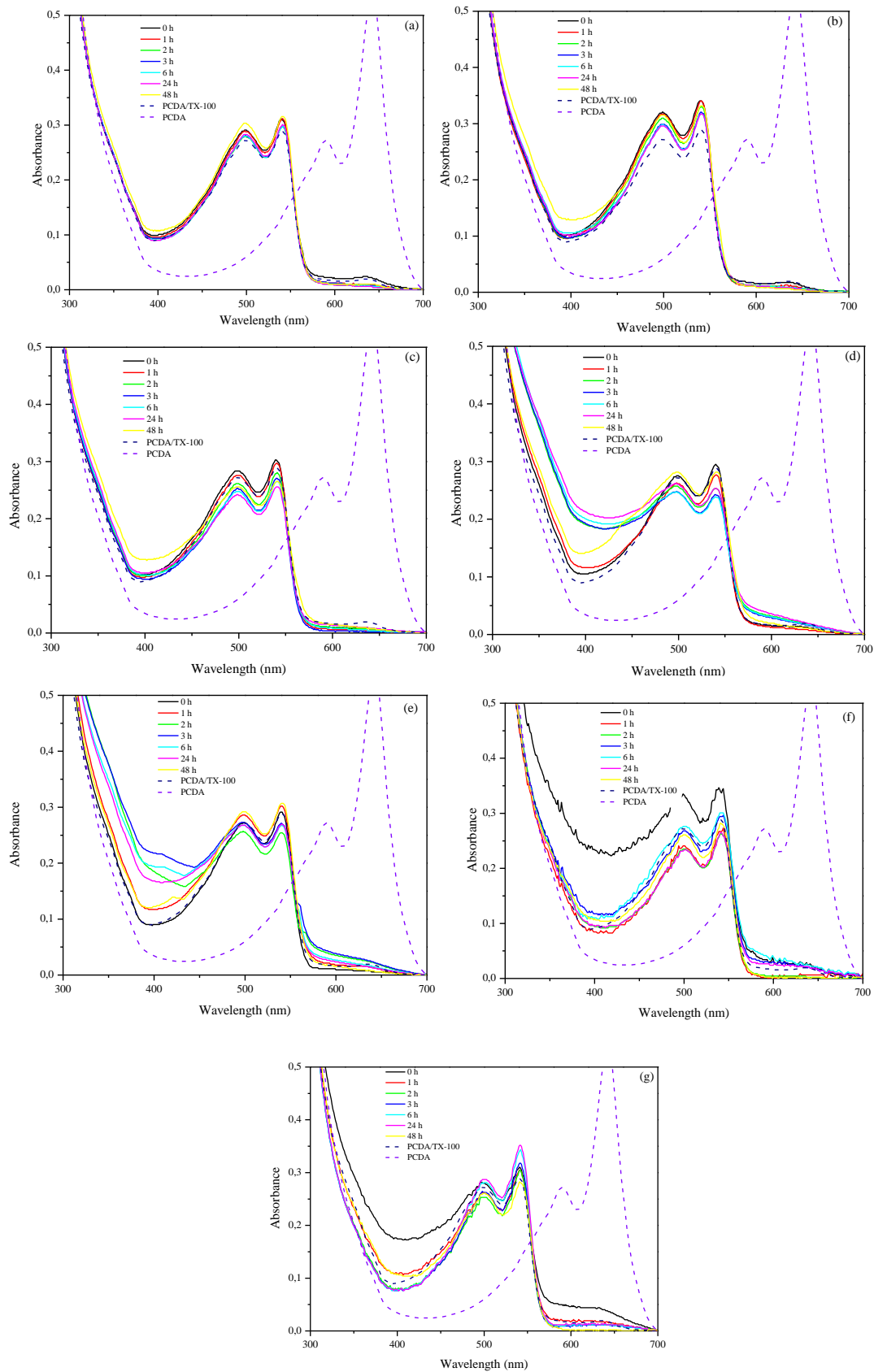


Figura 68. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácido oleico durante 48 horas. ((a) $AO_1: 9,020 \cdot 10^{-3}$; (b) $AO_2: 11,275 \cdot 10^{-3}$; (c) $AO_3: 13,530 \cdot 10^{-3}$; (d) $AO_4: 15,785 \cdot 10^{-3}$; (e) $AO_5: 18,040 \cdot 10^{-3}$; (f) $AO_6: 36,080 \cdot 10^{-3}$; (g) $AO_7: 72,160 \cdot 10^{-3}$) $g mL^{-1}$.

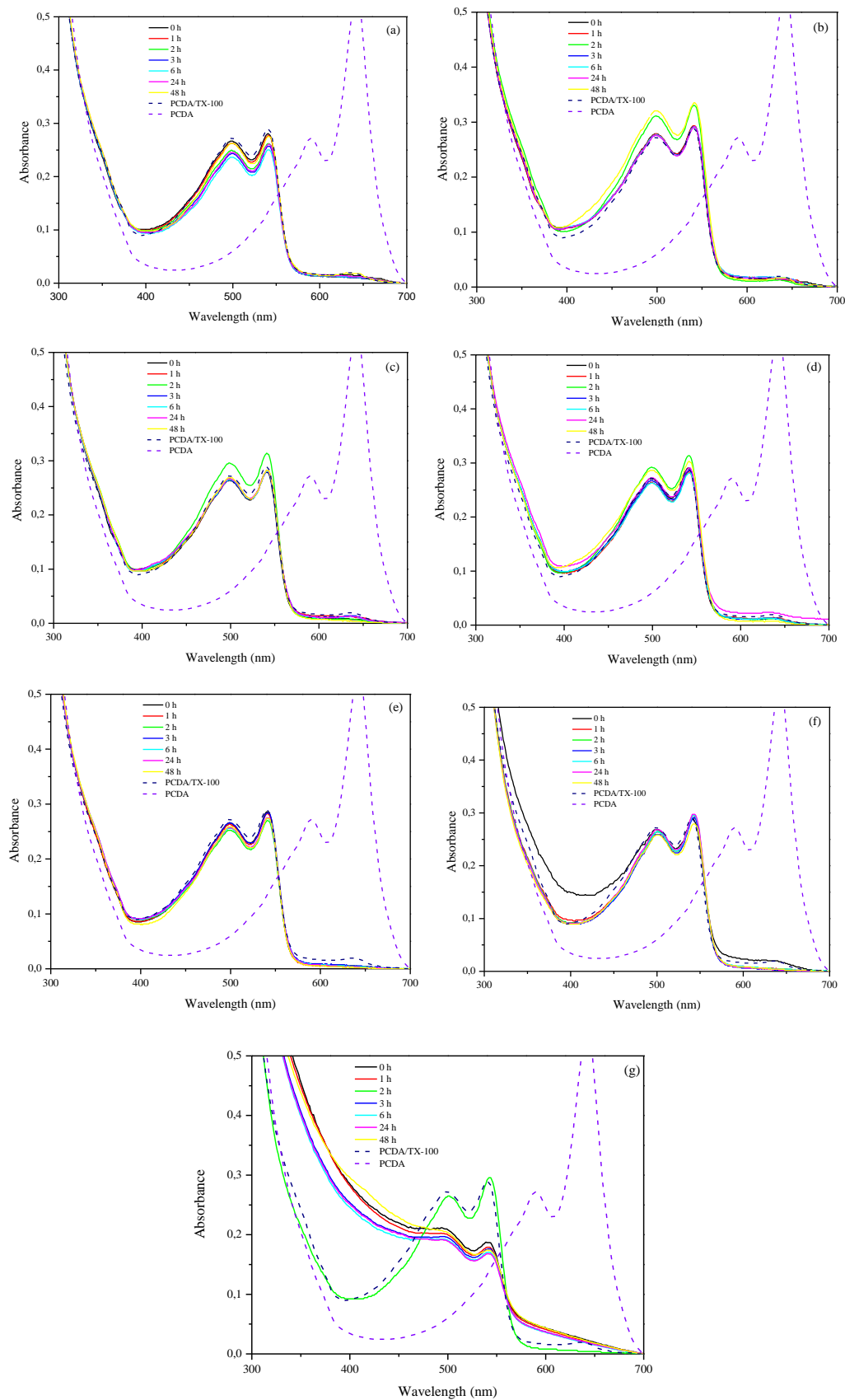


Figura 69. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácido caprílico durante 48 horas. ((a) AC1: $9,020 \cdot 10^{-3}$; (b) AC2: $11,275 \cdot 10^{-3}$; (c) AC3: $13,530 \cdot 10^{-3}$; (d) AC4: $15,785 \cdot 10^{-3}$; (e) AC5: $18,040 \cdot 10^{-3}$; (f) AO₆: $36,080 \cdot 10^{-3}$; (g) AO₇: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.

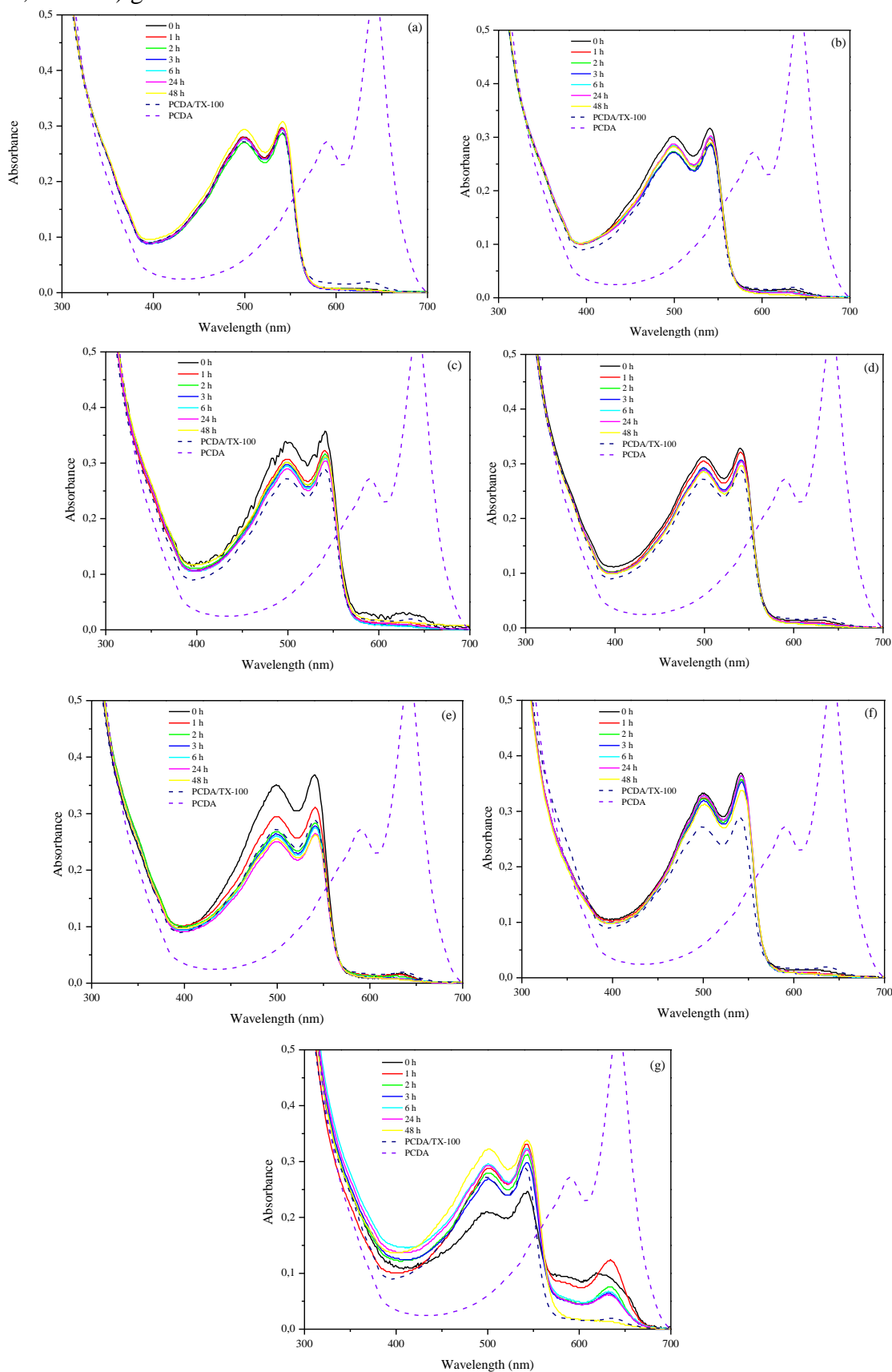
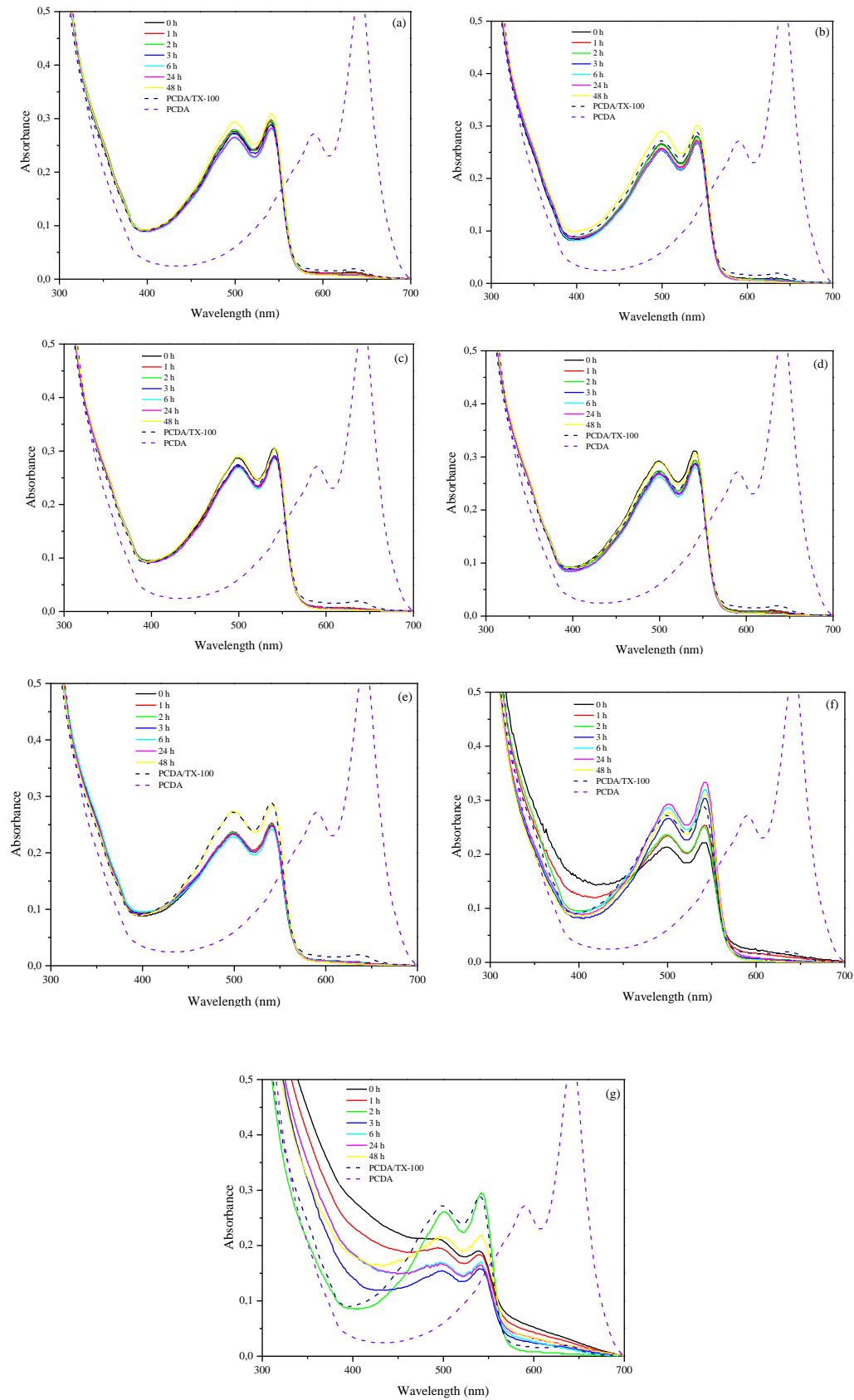


Figura 70. Espectros de absorvância UV-Vis da interação entre PCDA/TX-100 na presença de ácidos graxos durante 48 horas. ((a) TAG1: $9,020 \cdot 10^{-3}$; (b) TAG2: $11,275 \cdot 10^{-3}$; (c) TAG 3: $13,530 \cdot 10^{-3}$; (d) TAG 4: $15,785 \cdot 10^{-3}$; (e) TAG 5 $18,040 \cdot 10^{-3}$; (f) TAG 6: $36,080 \cdot 10^{-3}$; (g) TAG 7: $72,160 \cdot 10^{-3}$) g mL⁻¹.



4. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos a partir do ensaio com vesículas de diacetileno e ácidos graxos indicam que a escolha do solvente influencia significativamente nas características colorimétricas e de turbidez das amostras. O ensaio com álcool isopropílico demonstrou uma resposta mais pronunciada, com maior turbidez e uma transição de cores do azul para o rosa. Por outro lado, o ensaio com Triton X-100 apresentou menor turbidez e uma resposta colorimétrica rápida, exibindo inicialmente tonalidades de roxo e azul, seguidas por uma tonalidade rosada que se manteve ao longo do tempo.

Esses resultados ressaltam a sensibilidade da metodologia empregada, evidenciando a influência do solvente na interação entre as vesículas de diacetileno e os ácidos graxos. A compreensão dessas interações é crucial para o desenvolvimento de metodologias eficazes na detecção e quantificação de ácidos graxos em amostras, com potenciais aplicações na indústria de laticínios.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da crescente necessidade, especialmente no setor de laticínios, de desenvolver métodos de detecção e quantificação da gordura no leite de forma acessível, simples, baixo custo e eficaz, este estudo propôs uma abordagem inovadora baseada na interação colorimétrica entre nanoestruturas de ouro e 10,12-ácido pentacosadínico, visando detectar ácidos graxos predominantes no leite, como o ácido palmítico, ácido oleico e ácido caprílico.

Os capítulos 1 e 2 investigam a interação colorimétrica entre as nanopartículas de ouro (AuNPs) e as vesículas de PCDA com os ácidos graxos mencionados, tanto individualmente quanto em conjunto. Essas estruturas foram selecionadas devido às suas proeminentes propriedades ópticas. A validação da metodologia foi conduzida através de análises espectrofotométricas e de histogramas, evidenciando resultados colorimétricos satisfatórios.

Os resultados para as AuNPs revelaram uma resposta colorimétrica mais acentuada no caso do ácido caprílico, em comparação com o ácido oleico e o ácido palmítico. Houve uma clara alteração na coloração da amostra, transicionando de vermelho para roxo/azul. Embora sutis, tanto o ácido oleico quanto o ácido palmítico também apresentaram uma resposta colorimétrica em concentrações mais elevadas. Apesar de os espectros de absorvância não refletirem essas mudanças colorimétricas devido à elevada turbidez das amostras, os histogramas RGB evidenciaram essas alterações de forma mais nítida.

No que diz respeito às vesículas de PCDA, os resultados indicaram que o ensaio com álcool isopropílico resultou em maior turbidez, com as amostras transitando de tons azuis para rosados. Em contraste, o ensaio com Triton X-100 apresentou menor turbidez, com uma resposta colorimétrica imediata, alterando as amostras entre tons de roxo e azul; após 5 minutos, as amostras assumiram uma tonalidade rosada, mantendo-se assim.

Para aprimorar a validação do método, é crucial realizar análises com outros ácidos graxos e, principalmente, com amostras reais de leite. Além disso, a determinação do limite de detecção e a possível criação de nanosensores, sensíveis e de baixo custo, baseados em papel são etapas futuras necessárias. Acredita-se que este trabalho contribuirá significativamente para o avanço do setor lácteo, oferecendo soluções inovadoras e eficazes para a análise de componentes lipídicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-GHUNMI, L.; BADAWI, M.; FAYYAD, M. Fate of triton X-100 applications on water and soil environments: A review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 17, n. 5, p. 833–838, 10 abr. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11743-014-1584-3>>.
- AERNOUTS, B. et al. Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: Reflectance or transmittance? **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5315–5329, 1 nov. 2011.
- AGOSTONI, C.; MORENO, L.; SHAMIR, R. Palmitic Acid and Health: Introduction. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1017435>, v. 56, n. 12, p. 1941–1942, 9 set. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2015.1017435>>.
- AI, K. et al. Localized surface plasmon resonance properties and biomedical applications of copper selenide nanomaterials. **Materials Today Chemistry**, v. 20, 1 jun. 2021.
- AKSHAYA, K. et al. Bioconjugated gold nanoparticles as an efficient colorimetric sensor for cancer diagnostics. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, 1 jun. 2020.
- AL-JOHANI, H. et al. The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles. **Nature Chemistry** 2017 9:9, v. 9, n. 9, p. 890–895, 27 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nchem.2752>>.
- ALOTHMAN, M. et al. The “Grass-Fed” Milk Story: Understanding the Impact of Pasture Feeding on the Composition and Quality of Bovine Milk. **Foods** 2019, Vol. 8, Page 350, v. 8, n. 8, p. 350, 17 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/8/8/350/htm>>.
- ALTINOZ, M. A.; OZPINAR, A.; SEYFRIED, T. N. Caprylic (Octanoic) Acid as a Potential Fatty Acid Chemotherapeutic for Glioblastoma. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 159, p. 102142, 1 ago. 2020.
- AMINI, B. et al. Spectrophotometric, colorimetric and visually detection of Pseudomonas aeruginosa ETA gene based gold nanoparticles DNA probe and endonuclease enzyme. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 199, p. 421–429, 15 jun. 2018.
- AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUGS, AND BIOLOGICALS (14TH EDITION). In: THE MERCK INDEX. **Reference Reviews**. 15. ed. Whitehouse Station: Merck Research - Laboratories Division of Merck & CO, 1996. v. 21.
- ANH, N. H. et al. Gold nanoparticle-based optical nanosensors for food and health safety monitoring: recent advances and future perspectives. **RSC Advances**, v. 12, n. 18, p. 10950–10988, 7 abr. 2022. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/ra/d1ra08311b>>.
- APAK, R. et al. Colorimetric sensors and nanoprobe for characterizing antioxidant and energetic substances. **Analytical Methods**, v. 12, n. 44, p. 5266–5321, 28 nov. 2020.
- BABU, K. S.; SILIVERU, K.; AMAMCHARLA, J. K. Influence of micro- and nano-bubble treatment on morphological characteristics and flow properties of spray-dried milk protein concentrate powders. **JDS Communications**, v. 3, n. 6, p. 398–402, 1 nov. 2022.
- BACH, A. C.; BABAYAN, V. K. Medium-chain triglycerides: an update. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 36, n. 5, p. 950–962, 1 nov. 1982. Acesso em: 17 nov. 2023.

BADERTSCHER, R.; BERGER, T.; KUHN, R. Densitometric determination of the fat content of milk and milk products. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 1, p. 20–23, 1 jan. 2007.

BÄR, C. et al. Protein profile of dairy products: Simultaneous quantification of twenty bovine milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 167–175, 1 out. 2019.

BARBANO, D. M.; CLARK, J. L.; DUNHAM, C. E. Comparison of Babcock and ether extraction methods for determination of fat content of milk: collaborative study. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 5, p. 898–914, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3235409/>>.

BEBER, C. L.; LANGER, G.; MEYER, J. Strategic Actions for a Sustainable Internationalization of Agri-Food Supply Chains: The Case of the Dairy Industries from Brazil and Germany. **Sustainability** 2021, Vol. 13, Page 10873, v. 13, n. 19, p. 10873, 30 set. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2071-1050/13/19/10873/htm>>.

BHAMORE, J. R.; GANGULY, P.; KAILASA, S. K. Molecular assembly of 3-mercaptopropionic acid and guanidine acetic acid on silver nanoparticles for selective colorimetric detection of triazophos in water and food samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 233, p. 486–495, 5 out. 2016.

BOGOMOLOV, A.; MELENTEVA, A. Scatter-based quantitative spectroscopic analysis of milk fat and total protein in the region 400–1100 nm in the presence of fat globule size variability. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 126, p. 129–139, 15 jul. 2013.

BONFATTI, V. et al. Short communication: Mid-infrared spectroscopy prediction of fine milk composition and technological properties in Italian Simmental. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 8216–8221, 1 out. 2016. Acesso em: 2 maio 2023.

BRANDT, L. et al. Solubility and density measurements of palmitic acid in supercritical carbon dioxide + alcohol mixtures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 289, n. 1, p. 72–79, 25 fev. 2010.

BRINK, L. R.; LÖNNERDAL, B. Milk fat globule membrane: the role of its various components in infant health and development. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 85, 1 nov. 2020.

BROADBENT, A. D. A critical review of the development of the CIE1931 RGB color-matching functions. **Color Research and Application**, v. 29, n. 4, p. 267–272, ago. 2004.

CALVO, B.; COLLADO, I.; CEPEDA, E. A. Solubilities of palmitic acid in pure solvents and its mixtures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 54, n. 1, p. 64–68, 8 jan. 2009. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jc8005979>>. Acesso em: 15 maio 2023.

CAN, K.; ÜZER, A.; APAK, R. A manganese oxide (MnOx)-Based colorimetric nanosensor for indirect measurement of lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity. **Analytical Methods**, v. 12, n. 4, p. 448–455, 30 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/ay/c9ay02027f>>.

CARPICK, R. W.; SASAKI, D. Y.; ERIKSSON, M.; et al. Polydiacetylene films: A review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. **Article in Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 16, p. 679–697, 2004. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/230975743>>.

CARPICK, R. W.; SASAKI, D. Y.; MARCUS, M. S.; et al. Polydiacetylene films: a review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. **Journal of**

Physics: Condensed Matter, v. 16, n. 23, p. R679, 28 maio 2004. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-8984/16/23/R01>>. Acesso em: 18 jun. 2023.

CHEN, J. Y. et al. Effect of Multiplicative Scatter Correction on Wavelength Selection for near Infrared Calibration to Determine Fat Content in Raw Milk. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Vol. 10, Issue 4, pp. 301-307, v. 10, n. 4, p. 301–307, 1 out. 2002. Disponível em: <<https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=jnirs-10-4-301>>.

CIAMBELLI, P.; LA GUARDIA, G.; VITALE, L. Nanotechnology for green materials and processes. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 179, p. 97–116, 1 jan. 2020.

CIMMINO, F. et al. Invited review: Human, cow, and donkey milk comparison: Focus on metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 5, p. 3072–3085, 1 maio 2023.

COLLOMB, M. et al. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 8, p. 649–659, 1 jan. 2002.

CONAB. **Análise Mensal - Leite e Derivados - Janeiro de 2023**. . [S.l: s.n.], 2023. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-leite/item/6541-leite-e-derivados-analise-mensal-janeiro-2018>>.

CONSTABLE, F. H.; TEGUL, S. Solubility and Heat of Solution of Caprylic Acid in Water. **Nature** 1946 157:3996, v. 157, n. 3996, p. 735–735, 1946. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/157735b0>>.

CREIGHTON, J. A.; EADON, D. G. Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 87, n. 24, p. 3881–3891, 1991.

CUNHA, D. A. da et al. Lactose quantification in bovine milk by nuclear magnetic resonance without deuterated solvent (No-D qNMR). 2020.

DANILOSKI, D. et al. What is the impact of amino acid mutations in the primary structure of caseins on the composition and functionality of milk and dairy products? **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 1701–1712, 1 jan. 2022.

DARUICH DE SOUZA, C.; RIBEIRO NOGUEIRA, B.; ROSTELATO, M. E. C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 798, p. 714–740, 25 ago. 2019.

DE CARVALHO OLIVEIRA, G. et al. RGB color sensor for colorimetric determinations: Evaluation and quantitative analysis of colored liquid samples. **Talanta**, v. 241, p. 123244, 1 maio 2022.

DE OLIVEIRA, T. V. et al. Application of PCDA/SPH/CHO/Lysine vesicles to detect pathogenic bacteria in chicken. **Food Chemistry**, v. 172, p. 428–432, 1 abr. 2015.

DE SOUZA, L. C. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanoblend applied as a sensor for micellar casein: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**, v. 197, p. 841–847, 15 abr. 2016.

DEMIREL, B. et al. Chemical, thermal, and mechanical properties and ultraviolet transmittance of novel nano-hydroxyapatite/polyethylene terephthalate milk bottles. **Polymer Engineering & Science**, v. 61, n. 7, p. 2043–2054, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pen.25720>>.

DESAI, P.; PANDYA, U. Optical Butyrometric reading tube: An approach towards Gerber automation. **Indian J Dairy Sci**, v. 75, n. 6, p. 536–541, 2022a. Disponível em: <<https://doi.org/10.33785/IJDS.2022.v75i06.007>>. Acesso em: 10 abr. 2023.

_____. Review on Reference & Routine Measurement Techniques of Milk Fat based on Process, Cost and Instrumentation. 2022b.

DJORDJEVIC, J. et al. Fatty acid profile of milk. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 333, n. 1, p. 012057, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/333/1/012057>>.

DOLAI, S. et al. Colorimetric polydiacetylene-aerogel detector for volatile organic compounds (VOCs). **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 3, p. 2891–2898, 25 jan. 2017.

DUFFY, J. J.; LARSSON, M.; HILL, A. Suspension Stability; Why Particle Size, Zeta Potential and Rheology are Important. **Annual transactions of the nordic rheology society**, v. 20, 2012.

EL-ABASSY, R. M. et al. Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 56, n. 1, p. 3–8, 12 maio 2011.

ELAHI, N.; BAGHERSAD, M. H.; KAMALI, M. Precise, direct, and rapid detection of Shigella Spa gene by a novel unmodified AuNPs-based optical genosensing system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, p. 42–49, 1 jul. 2019.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537–556, 1 jul. 2018..

FAO. **Crops and livestock products - FAOSTAD**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#search/Crops%20and%20livestock%20products%20>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

_____. **World Food and Agriculture – Statistical Yearbook** . . Rome: [s.n.], 2022.

FERRAND-CALMELS, M. et al. Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 17–35, 1 jan. 2014. Acesso em: 2 maio 2023.

FERREIRA, G. M. D. et al. A simple and inexpensive thermal optic nanosensor formed by triblock copolymer and polydiacetylene mixture. **Food Chemistry**, v. 241, p. 358–363, 15 fev. 2018. Acesso em: 17 abr. 2023.

FONTANA, A.; SPOLAORE, B.; POLVERINO DE LAURETO, P. The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 6, p. 1125–1143, 1 jun. 2013. Acesso em: 16 jun. 2023.

FORCATO, D. O. et al. Milk Fat Content Measurement by a Simple UV Spectrophotometric Method: An Alternative Screening Method. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 478–481, 1 fev. 2005. Acesso em: 3 maio 2023.

FOROUTAN, A. et al. Chemical Composition of Commercial Cow’s Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 4897–4914, 1 maio 2019. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jafc.9b00204>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

FRAGKOULIS, N.; SAMARTZIS, P. C.; VELEGRAKIS, M. Commercial milk discrimination by fat content and animal origin using optical absorption and fluorescence spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 123, p. 105181, 1 dez. 2021. Acesso em: 3 maio 2023.

GARLAPATI, C.; MADRAS, G. Solubilities of palmitic and stearic fatty acids in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 42, n. 2, p. 193–197, 1 fev. 2010. Acesso em: 15 maio 2023.

GASTALDI, D. et al. HPLC-APCI analysis of triacylglycerols in milk fat from different sources. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 2, p. 197–207, 1 fev. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejlt.201000068>>. Acesso em: 3 maio 2023.

GE, X. et al. Micro-scale hollow nanosphere as highly efficient ORR electrocatalyst derived from the self-assembly of triblock copolymer (L64). **Ionics**, v. 27, n. 4, p. 1611–1618, 1 abr. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11581-021-03927-z>>. Acesso em: 4 jun. 2023.

GHASEMI, F. et al. Paper-based optical nanosensors – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1238, p. 340640, 15 jan. 2023. Acesso em: 7 maio 2023.

GIRIGOSWAMI, A. et al. Nanotechnology in Detection of Food Toxins-Focus on the Dairy Products. v. 11, n. 6, p. 14155–14172, 2021. Disponível em: <<https://biointerfaceresearch.com/>>. Acesso em: 8 maio 2023.

GOU, M. et al. Time-temperature chromatic sensor based on polydiacetylene (PDA) vesicle and amphiphilic copolymer. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 150, n. 1, p. 406–411, 21 out. 2010. Acesso em: 18 maio 2023.

GOULDING, D. A.; FOX, P. F.; O'MAHONY, J. A. Milk proteins: An overview. **Milk Proteins: From Expression to Food**, p. 21–98, 15 nov. 2019. Acesso em: 28 mar. 2023.

GRABAR, K. C. et al. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 735–743, 1995. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00100a008>>. Acesso em: 28 mar. 2023.

GUO, C. et al. Investigation on the temperature effect of a mixed vesicle composed of polydiacetylene and BODIPY 558. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, n. 1, p. 41–45, 15 out. 2007. Acesso em: 21 maio 2023.

GUO, Yongming; ZHAO, W. In situ formed nanomaterials for colorimetric and fluorescent sensing. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 387, p. 249–261, 15 maio 2019. Acesso em: 7 maio 2023.

GUO, Yujun et al. A polyamidoamine-mediated competitive colorimetric assay based on gold nanoparticles for determining acid values in edible sunflower seed, corn and extra virgin olive oils. **Food Chemistry**, v. 285, p. 450–457, 1 jul. 2019. Acesso em: 2 jan. 2024.

GURD, C. et al. Determination of fats, oils and greases in food service establishment wastewater using a modification of the Gerber method. **Water and Environment Journal**, v. 34, n. 1, p. 5–13, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/wej.12431>>. Acesso em: 2 maio 2023.

GUTIÉRREZ, R. et al. Detection of non-milk fat in milk fat by gas chromatography and linear discriminant analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1846–1855, 1 maio 2009. Acesso em: 3 maio 2023.

HAGEMAN, J. H. J. et al. Comparison of bovine milk fat and vegetable fat for infant formula: Implications for infant health. **International Dairy Journal**, v. 92, p. 37–49, 1 maio 2019. Acesso em: 30 mar. 2023.

HAIDER, A. J.; SHABEEB, D. A.; TH MOHAMMED, A. Synthesis and stabilization of gold nanoparticles by inverse reduction method using sodium citrate and sodium boro hydride as reducing agent. **J. of University of Anbar for pure science**, v. 10, n. 1, 2016. Acesso em: 27 dez. 2023.

HALEEM, A. et al. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. **Global Health Journal**, 25 fev. 2023. Acesso em: 6 maio 2023.

HALL, A. V. et al. The crystal engineering of radiation-sensitive diacetylene cocrystals and salts. **Chemical Science**, v. 11, n. 30, p. 8025–8035, 5 ago. 2020. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/sc/d0sc02540b>>. Acesso em: 18 maio 2023.

HAQUE, F.; BUBLI, S. Y.; KHAN, M. S. UV–Vis Spectroscopy for Food Analysis. p. 169–193, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-68636-9_8>. Acesso em: 3 maio 2023.

HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease** 2007 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–16, 25 set. 2007. Disponível em: <<https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-6-25>>. Acesso em: 29 mar. 2023.

HE, H. et al. Insights into the multi-scale structure and in vitro digestibility changes of rice starch-oleic acid/linoleic acid complex induced by heat-moisture treatment. **Food Research International**, v. 137, p. 109612, 1 nov. 2020. Acesso em: 16 jun. 2023.

HE, X.; DENG, H.; HWANG, H. min. The current application of nanotechnology in food and agriculture. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 1, p. 1–21, 1 jan. 2019. Acesso em: 6 maio 2023.

HE, Y. et al. Noble metal nanomaterial-based aptasensors for microbial toxin detection. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 28, n. 4, p. 508, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3261816/>>. Acesso em: 14 maio 2023.

HERIZCHI, R. et al. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.971807>, v. 44, n. 2, p. 596–602, 1 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/21691401.2014.971807>>. Acesso em: 14 maio 2023.

HERNELL, O. et al. Clinical Benefits of Milk Fat Globule Membranes for Infants and Children. **Journal of Pediatrics**, v. 173, p. S60–S65, 1 jun. 2016. Acesso em: 30 mar. 2023.

HUI, Y. et al. A label-free electrochemical aptasensor based on a gold nanoparticle/carbon nanotube/metal–organic framework nanohybrid for ultrasensitive detection of streptomycin in milk samples. **Food Chemistry**, v. 402, p. 134150, 15 fev. 2023. Acesso em: 7 maio 2023.

IBGE. **Conab - Análise mensal do leite - Janeiro de 2023**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-leite>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

INNIS, S. M. Palmitic Acid in Early Human Development. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1018045>, v. 56, n. 12, p. 1952–1959, 9 set. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2015.1018045>>. Acesso em: 1 maio 2023.

IWAI, Y. et al. Measurement of solubilities of palmitic acid in supercritical carbon dioxide and entrainer effect of water by FTIR spectroscopy. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, n. 2–3, p. 193–200, 1 mar. 2004. Acesso em: 15 maio 2023.

JAFARIZADEH-MALMIRI, H. et al. Nano-sensors in Food Nanobiotechnology. **Nanobiotechnology in Food: Concepts, Applications and Perspectives**. [S.l.]: Springer, Cham, 2019. p. 81–94. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-05846-3_6>. Acesso em: 7 maio 2023.

JAGTIANI, E. Advancements in nanotechnology for food science and industry. **Food Frontiers**, v. 3, n. 1, p. 56–82, 1 mar. 2022. Acesso em: 8 maio 2023.

JANNAH, F.; KIM, J. M. pH-sensitive colorimetric polydiacetylene vesicles for urease sensing. **Dyes and Pigments**, v. 169, p. 15–21, 1 out. 2019. Acesso em: 4 jun. 2023.

JAVAID, M. et al. Exploring the potential of nanosensors: A brief overview. **Sensors International**, v. 2, p. 100130, 1 jan. 2021. Acesso em: 7 maio 2023.

JEEVIKA, A.; SHANKARAN, D. R. Functionalized silver nanoparticles probe for visual colorimetric sensing of mercury. **Materials Research Bulletin**, v. 83, p. 48–55, 1 nov. 2016. Acesso em: 8 maio 2023.

JENSEN, R. G. et al. Lipids of Bovine and Human Milks: A Comparison. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 2, p. 223–240, 1 fev. 1990. Acesso em: 17 nov. 2023.

JULLAKAN, S.; BUNKOED, O. A nanocomposite adsorbent of metallic copper, polypyrrole, halloysite nanotubes and magnetite nanoparticles for the extraction and enrichment of sulfonamides in milk. **Journal of Chromatography B**, v. 1180, p. 122900, 15 ago. 2021. Acesso em: 7 maio 2023.

JUNG, Y. K.; PARK, H. G.; KIM, J. M. Polydiacetylene (PDA)-based colorimetric detection of biotin–streptavidin interactions. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 8, p. 1536–1544, 15 fev. 2006. Acesso em: 21 maio 2023.

KAILASAPATHY, K. Chemical Composition, Physical, and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients. **Dairy Processing and Quality Assurance**, p. 77–105, 30 out. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118810279.ch04>>. Acesso em: 27 abr. 2023.

KANICKY, J. R.; SHAH, D. O. Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 256, n. 1, p. 201–207, 2002. Acesso em: 16 jun. 2023.

KARACOR, K.; CAM, M. Effects of oleic acid. **Medical Science and Discovery**, v. 2, n. 1, p. 125–157, 2015. Disponível em: <<http://www.medscidiscovery.com>>. Acesso em: 16 jun. 2023.

KARAKUŞ, S. et al. An ultra-sensitive smartphone-integrated digital colorimetric and electrochemical Camellia sinensis polyphenols encapsulated CuO nanoparticles-based ammonia biosensor. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 143, p. 109733, 1 set. 2022. Acesso em: 8 maio 2023.

KEW, S. J.; HALL, E. A. H. pH response of carboxy-terminated colorimetric polydiacetylene vesicles. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 7, p. 2231–2238, 1 abr. 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac0517794>>. Acesso em: 21 maio 2023.

KHAN, H. et al. Cancer biomarkers and their biosensors: A comprehensive review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 158, p. 116813, 1 jan. 2023. Acesso em: 5 maio 2023.

KIM, M. et al. Chromatic detection of glucose using polymerization of diacetylene vesicle. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 25, p. 46394, 5 jul. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/app.46394>>. Acesso em: 30 maio 2023.

KLEYN, D. H. et al. Determination of fat in raw and processed milks by the Gerber method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 5, p. 1499–1508, 2001. Acesso em: 2 maio 2023.

KUCHERYAVSKIY, S.; MELENTEVA, A.; BOGOMOLOV, A. Determination of fat and total protein content in milk using conventional digital imaging. **Talanta**, v. 121, p. 144–152, 2014. Acesso em: 10 abr. 2023.

KUMAR, N.; SETH, R.; KUMAR, H. Colorimetric detection of melamine in milk by citrate-stabilized gold nanoparticles. **Analytical Biochemistry**, v. 456, n. 1, p. 43–49, 1 jul. 2014. Acesso em: 9 maio 2023.

KUMAR, P. et al. Nanotechnology and its challenges in the food sector: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 17, p. 100332, 1 set. 2020. Acesso em: 6 maio 2023.

KUMAR, R.; KUMAR, M.; LUTHRA, G. Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. **Materials Today: Proceedings**, 2 jan. 2023. Acesso em: 6 maio 2023.

KURBANOGLU, S. et al. Chemical Nanosensors in Pharmaceutical Analysis. **New Developments in Nanosensors for Pharmaceutical Analysis**. [S.l.]: Academic Press, 2019. p. 141–170. . Acesso em: 7 maio 2023.

LEBÈGUE, E. et al. Responsive Polydiacetylene Vesicles for Biosensing Microorganisms. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 2, 15 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29462870/>>. Acesso em: 30 maio 2023.

LEE, C. L. et al. Standards and labeling of milk fat and spread products in different countries. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 469–480, 1 abr. 2018. Acesso em: 1 maio 2023.

LI, C. H. et al. Gold Nanoparticles as a Biosensor for Cancer Biomarker Determination. **Molecules** 2023, Vol. 28, Page 364, v. 28, n. 1, p. 364, 2 jan. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/28/1/364/htm>>. Acesso em: 27 maio 2023.

LI, X. et al. A simple highly sensitive and selective aptamer-based colorimetric sensor for environmental toxins microcystin-LR in water samples. **Journal of hazardous materials**, v. 304, p. 474–480, 5 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26619046/>>. Acesso em: 14 maio 2023.

LI, Y. et al. A Asp/Ce nanotube-based colorimetric nanosensor for H₂O₂-free and enzyme-free detection of cysteine. **Talanta**, v. 196, p. 556–562, 1 maio 2019. Acesso em: 8 maio 2023.

LIM, J. et al. Surface Modification of Citrate-Capped Gold Nanoparticles Using CTAB Micelles. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 35, n. 8, p. 2567–2569, 20 ago. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.8.2567>>. Acesso em: 27 dez. 2023.

LIN, S. C.; CHEN, Y. C.; LIN, Y. M. General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactant analysis and purification. **Journal of Chromatography A**, v. 825, n. 2, p. 149–159, 6 nov. 1998. Acesso em: 27 dez. 2023.

LINDMARK MÅNSSON, H. Fatty acids in bovine milk fat. **Food & nutrition research**, v. 52, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19109654/>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

LIU, Bin.; ZHUANG, Jinyin.; WEI, Gang. Recent advances in the design of colorimetric sensors for environmental monitoring. **Environmental Science Nano**, 2020. Acesso em: 16 abr. 2023.

LIU, Z. et al. Comprehensive Characterization of Bovine Milk Lipids: Triglycerides. **ACS Omega**, v. 5, n. 21, p. 12573–12582, 2 jun. 2020. Acesso em: 29 mar. 2023.

LIU, Z.; ROCHFORT, S.; COCKS, B. Milk lipidomics: What we know and what we don't. **Progress in Lipid Research**, v. 71, p. 70–85, 1 jul. 2018. Acesso em: 19 abr. 2023.

LOPEZ-VILLALOBOS, N. et al. Estimation of genetic and crossbreeding parameters of fatty acid concentrations in milk fat predicted by mid-infrared spectroscopy in New Zealand dairy cattle. **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 3, p. 340–349, 2014. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/abs/estimation-of-genetic-and-crossbreeding-parameters-of-fatty-acid-concentrations-in-milk-fat-predicted-by-midinfrared-spectroscopy-in-new-zealand-dairy-cattle/6C73B62D3077196354658A53369C7977>>. Acesso em: 2 maio 2023.

LUAN, Y. et al. Rapid Visual Detection of Aflatoxin B1 by Label-Free Aptasensor Using Unmodified Gold Nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 2, p. 1357–1361, 1 fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26353655/>>. Acesso em: 8 maio 2023.

MA, Q. et al. Colorimetric aptasensors for determination of tobramycin in milk and chicken eggs based on DNA and gold nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 249, p. 98–103, 30 maio 2018. Acesso em: 9 maio 2023.

MACGIBBON, A. K. H. Composition and Structure of Bovine Milk Lipids. **Advanced Dairy Chemistry: Volume 2: Lipids, Fourth Edition**, v. 2, p. 1–32, 1 jan. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-48686-0_1>. Acesso em: 29 mar. 2023.

MADKOUR, E. et al. Sensitive and selective colorimetric detection of Staphylococcus aureus-SPA gene by engineered gold nanosensor. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 103559, 1 fev. 2023. Acesso em: 14 maio 2023.

MANONI, M. et al. Milk Fat Globule Membrane Proteome and Micronutrients in the Milk Lipid Fraction: Insights into Milk Bioactive Compounds. **Dairy 2021, Vol. 2, Pages 202-217**, v. 2, n. 2, p. 202–217, 12 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2624-862X/2/2/18/htm>>. Acesso em: 28 mar. 2023.

MAPA. **Mapa do Leite — Ministério da Agricultura e Pecuária**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

MAZUREK, S. et al. Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 138, p. 285–289, 1 jun. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25863403/>>. Acesso em: 3 maio 2023.

MCGOVERIN, C. M. et al. Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. **Analytica chimica acta**, v. 673, n. 1, p. 26–32, jul. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20630174/>>. Acesso em: 3 maio 2023.

MENDOZA, L. G. et al. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of milk fat by an ionic liquid derived from L-phenylalanine as the stationary phase. **Talanta**, v. 143, p. 212–218, 1 out. 2015. Acesso em: 3 maio 2023.

MIRGORODSKAYA, A. B.; YATSKEVICH, E. I.; ZAKHAROVA, L. Y. The solubilization of fatty acids in systems based on block copolymers and nonionic surfactants. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 84, n. 12, p. 2066–2070, 30 dez. 2010. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1134/S0036024410120101>>. Acesso em: 27 dez. 2023.

MOGHADAM, F. V. et al. Use of Fish Oil Nanoencapsulated with Gum Arabic Carrier in Low Fat Probiotic Fermented Milk. **Food Science of Animal Resources**, v. 39, n. 2, p. 309, 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6533394/>. Acesso em: 7 maio 2023.

MORIBE, K. et al. Drug Nanoparticle Formulation Using Ascorbic Acid Derivatives. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, 2011. Acesso em: 22 maio 2023.

MURPHY, S. C. et al. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 10128–10149, 1 dez. 2016. Acesso em: 27 abr. 2023.

NARBAND, N. et al. The interaction between gold nanoparticles and cationic and anionic dyes: enhanced UV-visible absorption. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 44, p. 10513–10518, 4 nov. 2009. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2009/cp/b909714g>. Acesso em: 28 dez. 2023.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Freeman and Company, 2004. . Acesso em: 15 maio 2023.

NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 10, p. 1957–1962, 20 maio 2003. Acesso em: 27 maio 2023.

NILE, S. H. et al. Nanotechnologies in Food Science: Applications, Recent Trends, and Future Perspectives. **Nano-Micro Letters** 2020 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–34, 4 fev. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40820-020-0383-9>. Acesso em: 6 maio 2023.

OKADA, S. et al. Color and Chromism of Polydiacetylene Vesicles. **Accounts of Chemical Research**, v. 31, n. 5, p. 229–239, 1998. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ar970063v>. Acesso em: 22 jun. 2023.

OLIVEIRA, C. P. De et al. Behaviour of polydiacetylene vesicles under different conditions of temperature, pH and chemical components of milk. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1052–1056, 1 dez. 2012. Acesso em: 21 maio 2023.

PACHECO-PAPPENHEIM, S. et al. Seasonal variation in fatty acid and triacylglycerol composition of bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 8, p. 8479–8492, 1 ago. 2021. Acesso em: 29 mar. 2023.

PALOMER, X. et al. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 178–190, 1 mar. 2018. Acesso em: 15 maio 2023.

PANNICO, M. et al. Polydiacetylene-coated gold nanoparticles as a novel plasmonic thermosensor based on the phase transition of the outer shell. **Applied Surface Science**, v. 636, p. 157799, 1 nov. 2023. Acesso em: 27 dez. 2023.

PEREIRA, E. V. dos S. et al. Simultaneous determination of goat milk adulteration with cow milk and their fat and protein contents using NIR spectroscopy and PLS algorithms. **LWT**, v. 127, p. 109427, 1 jun. 2020. Acesso em: 3 maio 2023.

PICOLLO, M.; ACETO, M.; VITORINO, T. UV-Vis spectroscopy. **Physical Sciences Reviews**, v. 4, n. 4, 1 abr. 2019. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/psr-2018-0008/html>. Acesso em: 28 dez. 2023.

PIRES, A. C. D. S. et al. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 153, n. 1, p. 17–23, 31 mar. 2011. Acesso em: 17 jun. 2023.

PIRES, A. C. S. et al. Thermodynamic study of colorimetric transitions in polydiacetylene vesicles induced by the solvent effect. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 42, p. 13365–13371, 28 out. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jp105604t>>. Acesso em: 22 jun. 2023.

PIRIYA V.S, A. et al. Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1231–1245, 1 set. 2017. Acesso em: 5 maio 2023.

POKRAJAC, L. et al. Nanotechnology for a Sustainable Future: Addressing Global Challenges with the International Network4Sustainable Nanotechnology. **ACS Nano**, v. 15, n. 12, p. 18608–18623, 28 dez. 2021. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.1c10919>>. Acesso em: 6 maio 2023.

POONIA, A. Recent trends in nanomaterials used in dairy industry. **Nanoscience for Sustainable Agriculture**, p. 375–396, 23 set. 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-97852-9_17>. Acesso em: 6 maio 2023.

PRIYADARSHINI, E.; PRADHAN, N. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: A review. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 238, p. 888–902, 1 jan. 2017. Acesso em: 9 maio 2023.

PRIYADARSHNI, N.; CHANDA, N. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Sensing of Metal Toxins. **Miniaturized Biosensing Devices: Fabrication and Applications**, p. 273–308, 1 jan. 2022. Acesso em: 27 dez. 2023.

PRIYASHANTHA, H. et al. Composition and properties of bovine milk: A study from dairy farms in northern Sweden; Part I. Effect of dairy farming system. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 8, p. 8582–8594, 1 ago. 2021. Acesso em: 27 mar. 2023.

PRIYASHANTHA, H.; LUNDH, Å. Graduate Student Literature Review: Current understanding of the influence of on-farm factors on bovine raw milk and its suitability for cheesemaking. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 11, p. 12173–12183, 1 nov. 2021. Acesso em: 24 abr. 2023.

PU, H. et al. Optical nanosensors for biofilm detection in the food industry: principles, applications and challenges. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition journal**, v. 61, n. 13, p. 2107–2124, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2020.1808877>>. Acesso em: 11 abr. 2023.

_____. Optical nanosensors for biofilm detection in the food industry: principles, applications and challenges. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 13, p. 2107–2124, 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2020.1808877>>. Acesso em: 7 nov. 2023.

QIAN, X.; STÄDLER, B. Recent Developments in Polydiacetylene-Based Sensors. **Chemistry of Materials**, v. 31, n. 4, p. 1196–1222, 26 fev. 2019. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemmater.8b05185>>. Acesso em: 30 maio 2023.

R ORTEGA, P. F. et al. Thermochromism in Polydiacetylene/Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Obtained by the Freeze–Thaw Method: A Theoretical and Experimental Study. **Cite This: Ind.**

Eng. Chem. Res., v. 60, p. 13243–13252, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c01783>>. Acesso em: 8 jun. 2023.

RAJAMANIKANDAN, R.; ILANCHELIAN, M. Simple smartphone merged rapid colorimetric platform for the environmental monitoring of toxic sulfide ions by cysteine functionalized silver nanoparticles. **Microchemical Journal**, v. 174, p. 107071, 1 mar. 2022. Acesso em: 26 maio 2023.

RATTU, G.; MURALI KRISHNA, P. Enzyme-free colorimetric nanosensor for the rapid detection of lactic acid in food quality analysis. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, p. 100268, 1 mar. 2022. Acesso em: 8 maio 2023.

REPPY, M. A.; PINDZOLA, B. A. Biosensing with polydiacetylene materials: structures, optical properties and applications. **Chemical Communications**, n. 42, p. 4317–4338, 23 out. 2007. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2007/cc/b703691d>>. Acesso em: 18 jun. 2023.

REZENDE, J. de P. et al. Polydiacetylene/triblock copolymer nanosensor for the detection of native and free bovine serum albumin. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 70, n. Pt 1, p. 535–543, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27770925/>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

_____. Polydiacetylene/triblock copolymer/surfactant nanoblend: A simple and rapid method for the colorimetric screening of enrofloxacin residue. **Food Chemistry**, v. 280, p. 1–7, 15 maio 2019. Acesso em: 8 maio 2023.

RHARBI, Y. et al. Characterizing aqueous micellar Triton X-100 solutions of a fluorescent model triglyceride. **Langmuir**, v. 15, n. 7, p. 2259–2266, 30 mar. 1999. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/la980234k>>. Acesso em: 27 dez. 2023.

ROZHKOVA, A.; OLENTSOVA, J. Development of New Technological Solutions for the Dairy Industry. **E3S Web of Conferences**, v. 161, 15 abr. 2020. Acesso em: 27 mar. 2023.

RUTTEN, M. J. M. et al. Predicting bovine milk fat composition using infrared spectroscopy based on milk samples collected in winter and summer. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 12, p. 6202–6209, 1 dez. 2009. Acesso em: 2 maio 2023.

SADAT MOUSAVIZADEH, F.; SARLAK, N. A sensitive dual mode turn-on fluorescence and colorimetric nanosensor for ultrasensitive detection of trace amount of gluten proteins in bread products based on crystalline nano cellulose and gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 287, 15 fev. 2023. Acesso em: 11 abr. 2023.

SAGONG, H. Y. et al. Controllable color change of polydiacetylene vesicles under thermal-photo stimuli. **Polymer**, v. 233, p. 124211, 26 out. 2021. Acesso em: 17 jun. 2023.

SAINI, P. et al. Review on nanotechnology “Impact on the food services industry”. **Materials Today: Proceedings**, 29 abr. 2023. Acesso em: 6 maio 2023.

SAJWAN, R. K.; SOLANKI, P. R. A hybrid optical strategy based on graphene quantum dots and gold nanoparticles for selective determination of gentamicin in the milk and egg samples. **Food Chemistry**, v. 370, p. 131312, 15 fev. 2022. Acesso em: 9 maio 2023.

SANGWAN, S.; SETH, R. Synthesis, Characterization and Stability of Gold Nanoparticles (AuNPs) in Different Buffer Systems. **Journal of Cluster Science**, v. 33, n. 2, p. 749–764, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10876-020-01956-8>>. Acesso em: 28 dez. 2023.

ŠAŠIĆ, S.; OZAKI, Y. Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. 1. Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least-squares regression and band assignment. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 64–71, 1 jan. 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac000469c>>. Acesso em: 2 maio 2023.

SCHAUENSTEIN, E. Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products. **Journal of Lipid Research**, v. 8, n. 5, p. 417–428, 1 set. 1967. Acesso em: 29 dez. 2023.

ŠEKER, S.; ALHARTHI, S.; AYDOĞAN, C. Open tubular nano-liquid chromatography with a new polylysine grafted on graphene oxide stationary phase for the separation and determination of casein protein variants in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1667, p. 462885, 29 mar. 2022. Acesso em: 7 maio 2023.

SELVA SHARMA, A.; SASIKUMAR, T.; ILANCHELIAN, M. A Rapid and Sensitive Colorimetric Sensor for Detection of Silver Ions Based on the Non-aggregation of Gold Nanoparticles in the Presence of Ascorbic Acid. **Journal of Cluster Science**, v. 29, n. 4, p. 655–662, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10876-018-1375-5>>. Acesso em: 27 maio 2023.

SHAHBAZI, R. et al. Highly selective and sensitive detection of Staphylococcus aureus with gold nanoparticle-based core-shell nano biosensor. **Molecular and Cellular Probes**, v. 41, p. 8–13, 1 out. 2018. Acesso em: 8 maio 2023.

SHERIDAN, A. J.; THOMPSON, K. C.; SLATER, J. M. Interaction of negatively and positively capped gold nanoparticle with different lipid model membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 290, p. 106896, 1 nov. 2022. Acesso em: 26 dez. 2023.

SILVEIRA, L. et al. Characterization of nutritional parameters in bovine milk by Raman spectroscopy with least squares modeling. **Instrumentation Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 85–97, 2 jan. 2016. Acesso em: 3 maio 2023.

SINGH, H. et al. Recent advances in the application of noble metal nanoparticles in colorimetric sensors for lead ions. **Environmental Science: Nano**, v. 8, n. 4, p. 863–889, 1 abr. 2021. Acesso em: 8 maio 2023.

SMYKOV, I. T. Nanotechnology in the Dairy Industry. **The ELSI Handbook of Nanotechnology: Risk, Safety, ELSI and Commercialization**, p. 223–275, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781119592990.ch11>>. Acesso em: 6 maio 2023.

SONG, S. et al. Colorimetric detection of influenza A (H1N1) virus by a peptide-functionalized polydiacetylene (PEP-PDA) nanosensor. **RSC Advances**, v. 6, n. 54, p. 48566–48570, 16 maio 2016. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra06689e>>. Acesso em: 30 maio 2023.

SOYEURT, H. et al. Estimating Fatty Acid Content in Cow Milk Using Mid-Infrared Spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 9, p. 3690–3695, 1 set. 2006. Acesso em: 2 maio 2023.

STATNANO. **Nanotechnology Products Database**. Disponível em: <<https://product.statnano.com/>>. Acesso em: 8 jun. 2023.

STEFANOV, I.; VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V. A novel procedure for routine milk fat extraction based on dichloromethane. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 8, p. 852–855, 1 dez. 2010. Acesso em: 3 maio 2023.

SUN, J. et al. Colorimetric sensor array based on gold nanoparticles: Design principles and recent advances. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 122, p. 115754, 1 jan. 2020. Acesso em: 31 dez. 2023.

SUN, Xiaojun et al. Mechanistic Roles of Hydroxide in Controlling the Deposition of Gold on Colloidal Silver Nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 29, n. 9, p. 4014–4021, 9 maio 2017. Acesso em: 27 maio 2023.

SUN, Xuemei et al. Chromatic polydiacetylene with novel sensitivity. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4244–4257, 19 out. 2010. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cs/c001151g>>. Acesso em: 18 jun. 2023.

TEIMOORI, S. et al. Rapid extraction of BTEX in water and milk samples based on functionalized multi-walled carbon nanotubes by dispersive homogenized-micro-solid phase extraction. **Food Chemistry**, v. 421, p. 136229, 30 set. 2023. Acesso em: 7 maio 2023.

TEMPLETON, A. C.; WUELFING, W. P.; MURRAY, R. W. Monolayer-protected cluster molecules. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 1, p. 27–36, 2000. Acesso em: 22 jun. 2023.

TESSARO, L. et al. A systematic review of the advancement on colorimetric nanobiosensors for SARS-CoV-2 detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 222, p. 115087, 5 jan. 2023. Acesso em: 5 maio 2023.

THAKUR, M.; WANG, B.; VERMA, M. L. Development and applications of nanobiosensors for sustainable agricultural and food industries: Recent developments, challenges and perspectives. **Environmental Technology & Innovation**, v. 26, p. 102371, 1 maio 2022. Acesso em: 7 nov. 2023.

THONGMALAI, W. et al. Polydiacetylenes carrying amino groups for colorimetric detection and identification of anionic surfactants. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 41, p. 16391–16397, 11 out. 2011. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/jm/c1jm12795k>>. Acesso em: 30 dez. 2023.

THORMAR, H. et al. Inactivation of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 724, n. 1, p. 465–471, 1 jun. 1994. Disponível em: <<https://europemc.org/article/med/8030974>>. Acesso em: 17 nov. 2023.

TIAN, F. et al. Multicolor colorimetric detection of ochratoxin A via structure-switching aptamer and enzyme-induced metallization of gold nanorods. **Food Chemistry**, v. 320, p. 126607, 1 ago. 2020. Acesso em: 8 maio 2023.

TIPLADY, K. M. et al. Comparison of the genetic characteristics of directly measured and Fourier-transform mid-infrared-predicted bovine milk fatty acids and proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 12, p. 9763–9791, 1 dez. 2022. Acesso em: 27 abr. 2023.

TORRES, P. et al. Enzymatic Modification for Ascorbic Acid and Alpha-Tocopherol to Enhance their Stability in Food and Nutritional Application. **The Open Food Science Journal**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 25 mar. 2008. Acesso em: 22 maio 2023.

TSENKOVA, R. et al. Near infrared spectroscopy for biomonitoring: cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 3, p. 515–522, 1 mar. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/78/3/515/4625718>>. Acesso em: 2 maio 2023.

_____. Near-Infrared Spectroscopy for Dairy Management: Measurement of Unhomogenized Milk Composition. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2344–2351, 1 nov. 1999. Acesso em: 2 maio 2023.

US DOA. **Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems: a report submitted to cooperative state research, education and extension service**. . Washington, DC: [s.n.], 2003. Disponível em: <https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Nanoscale%20science%20and%20engineering%20for%20agriculture%20and%20food%20systems%3A%20a%20report%20submitted%20to%20cooperative%20state%20research%20education%20and%20extension%20service&publication_year=2003&author=US%20DOA>. Acesso em: 6 maio 2023.

VALDEZ, M. et al. ForceSpun polydiacetylene nanofibers as colorimetric sensor for food spoilage detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 297, 15 out. 2019. Acesso em: 17 abr. 2023.

VERMA, H. N.; SINGH, P.; CHAVAN, R. M. Gold nanoparticle: synthesis and characterization. **Veterinary World**, v. 7, n. 2, p. 72–77, fev. 2014.

VERMA, K. et al. Formulation and characterization of nano-curcumin fortified milk cream powder through microfluidization and spray drying. **Food Research International**, v. 160, p. 111705, 1 out. 2022. Acesso em: 7 maio 2023.

VIEGAS, C. A. et al. The H⁺-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 779–783, 1998. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.64.2.779-783.1998>>. Acesso em: 17 nov. 2023.

VIRIATO, R. L. S. et al. Design of new lipids from bovine milk fat for baby nutrition. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1813073>, v. 62, n. 1, p. 145–159, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2020.1813073>>. Acesso em: 1 maio 2023.

VO, P. P. et al. X-ray composite fibrous color dosimeter based on 10,12-pentacosadiynoic acid. **Dyes and Pigments**, v. 191, p. 109356, 1 jul. 2021. Acesso em: 17 abr. 2023.

WANG, C. et al. Emulsion structure design for improving the oxidative stability of polyunsaturated fatty acids. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 2955–2971, 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12621>>. Acesso em: 18 jun. 2023.

WANG, M. et al. microorganisms Bovine Milk Oligosaccharides and Human Milk Oligosaccharides Modulate the Gut Microbiota Composition and Volatile Fatty Acid Concentrations in a Preclinical Neonatal Model. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9050884>>. Acesso em: 28 mar. 2023.

WESTON, M.; KUCHEL, R. P.; CHANDRAWATI, R. A Polydiacetylene-Based Colorimetric Sensor as an Active Use-By Date for Plant-Based Milk Alternatives. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 41, n. 18, p. 2000172, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/marc.202000172>>. Acesso em: 17 jun. 2023.

_____. Digital analysis of polydiacetylene quality tags for contactless monitoring of milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 1148, p. 238190, 1 mar. 2021. Acesso em: 17 jun. 2023.

WIKING, L. et al. Herd factors influencing free fatty acid concentrations in bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 2, p. 226–232, 1 maio 2019.

WOODHOUSE, H. M.; KELTON, D. F. Farm factors associated with increased free fatty acids in bulk tank milk. **JDS Communications**, v. 4, n. 1, p. 51–54, jan. 2023.

XIN, Q. et al. The rapid determination of fat and protein content in fresh raw milk using the laser light scattering technology. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 44, n. 8, p. 858–869, 1 ago. 2006. Acesso em: 3 maio 2023.

XIONG, S. et al. Determination of ultra-low milk fat content using dual-wavelength ultraviolet spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9652–9658, 1 dez. 2016.

XU, W. et al. Localized surface plasmon resonances in self-doped copper chalcogenide binary nanocrystals and their emerging applications. **Nano Today**, v. 33, p. 100892, 1 ago. 2020.

YADAV, M. K.; TIWARI, S. K. Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology 2023 92:6**, v. 92, n. 6, p. 745–765, 28 nov. 2023. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261723600520>>.

YANG, B. et al. A cost-effective on-site milk analyzer based on multispectral sensor. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 179, 1 dez. 2020.

_____. Design and evaluation of a miniature milk quality detection system based on UV/Vis spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 106, 1 mar. 2022.

YANG, T.; DUNCAN, T. V. Challenges and potential solutions for nanosensors intended for use with foods. **Nature Nanotechnology 2021 16:3**, v. 16, n. 3, p. 251–265, 12 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41565-021-00867-7>>.

YANG, W.; KIM, J. A phase-change material with high through-plane thermal conductivity comprising a palmitic acid–cellulose nanofiber matrix with via acylation an expanded graphite@cellulose nanofiber@carbon nanotube hybrid filler. **Polymer Testing**, v. 118, p. 107880, 15 jan. 2023.

YAO, Y. et al. Milk fat globules by confocal Raman microscopy: Differences in human, bovine and caprine milk. **Food Research International**, v. 80, p. 61–69, 1 fev. 2016.

ZHANG, F. et al. A multichannel Au nanosensor for visual and pattern inspection of fatty acids. **Nanotechnology**, v. 30, n. 6, 8 fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30523802/>>.

ZHANG, Y. et al. Selection of a DNA Aptamer against Zearalenone and Docking Analysis for Highly Sensitive Rapid Visual Detection with Label-Free Aptasensor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 45, p. 12102–12110, 14 nov. 2018. Acesso em: 14 maio 2023.

ZHENG, B. et al. Rapid colorimetric detection of arsenic (III) by glutathione functionalized gold nanoparticles based on RGB extracting system. **Optics & Laser Technology**, v. 133, p. 106522, 1 jan. 2021.

ZHOU, D. et al. Colorimetric determination of staphylococcal enterotoxin B via DNAzyme-guided growth of gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 10, p. 2753–2760, 1 out. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-016-1919-z>>.

ZHU, X.; GUO, W.; LIANG, Z. Determination of the Fat Content in Cow's Milk Based on Dielectric Properties. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 7, p. 1485–1494, 4 jul. 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-015-1508-x>>.