



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS

QUÍMICA E BIOLÓGICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTRUTURA E PROPRIEDADES DE NANOPARTÍCULAS
DE OURO SINTETIZADAS NA PRESENÇA DE POLÍMEROS**

PRISCILA RIOS TEIXEIRA

Brasília, DF

2016

PRISCILA RIOS TEIXEIRA

**ESTRUTURA E PROPRIEDADES DE NANOPARTÍCULAS
DE OURO SINTETIZADAS NA PRESENÇA DE POLÍMEROS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. LEONARDO GIORDANO PATERNO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Química e Biológica.

Brasília, DF

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Priscila Rios Teixeira**, matrícula nº **14/0106669**, intitulada ***“Estrutura e Propriedades de Nanopartículas de Ouro Sintetizadas na Presença de Polímeros”***, apresentada no (a) sala PADCT do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 2 de março de 2016.

Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Profª Drª Maria José Araújo Sales
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Jonatas Gomes da Silva
Membro Titular (UCB)

Profª Drª Roseany de Vasconcelos Vieira Lopes
Membro Suplente (FGA / UnB)

Em 2 de março de 2016.

*A Deus que é meu tudo, à minha
família e amigos que sempre me incentivaram
a buscar o melhor e a nunca desistir dos meus
sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que é incomparável, meu melhor amigo e Senhor, aquele em que eu tudo posso, meu paizinho querido que está comigo em todos os momentos.

À minha linda família que sempre me apoiou, incentivou e ajudou em momentos que achei que não iria conseguir, as tantas noites em claro em que um simples lanche ou um “não desista” me deram forças para continuar. Meu sincero muito obrigado.

Ao meu orientador Professor Leonardo Paterno, por sua paciência e carinho incondicional. Por estar sempre presente, incentivando a fazer um bom trabalho. Aos “puxões de orelha” necessários, buscando a excelência. As conversas e risadas, momentos sensacionais que serão guardados na memória. Muito obrigada por tudo, a minha sincera gratidão.

Agradeço à Professora Maria José que sempre esteve presente, acompanhando o trabalho e sempre incentivando a fazer o melhor e por aceitar fazer parte da comissão examinadora. Às risadas e momentos maravilhosos. Muito obrigada.

Ao LAQUIMET-UnB por ceder o poli líquido iônico.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UnB.

À Mayara e à Ana Lúza que, mais do que a sincera amizade, cederam tempo para realizar análises biológicas e de microscopia. Investiram dias e noites com cuidados especiais para a realização deste trabalho. Pelas conversas

maravilhosas e risadas infindáveis e choros de alegria, momentos especiais que nunca esquecerei.

Às minhas amadas amigas Ruana Brandão e Camila Dourado, que estiveram fazendo o mestrado juntamente comigo, incentivando, ajudando, ouvindo e aconselhando. As infindáveis risadas e aos ombros amigos em momentos de dor. Por sempre estarem comigo, seja nos momentos bons ou ruins, meu carinho e sincero muito obrigado.

Aos meus amigos do LABPOL que sempre estiveram presentes, ajudando em análises e infindáveis conversas científicas que ajudaram a concretização deste trabalho. Aos momentos de risadas e conversas sobre fatos engraçados da vida. Aos lanches maravilhosos no fim da tarde, depois de um longo dia de trabalho. Meu sincero muito obrigado.

À Amanda, Fernanda e Camila que estiveram comigo nos primeiros passos do mestrado, ensinando-me análises e procedimentos necessários para realização deste trabalho. Pela amizade e companheirismo que me fizeram chegar a este momento.

A todos meus sinceros agradecimentos.

“Você não pode ser qualquer coisa que desejar ser.

Mas pode ser tudo o que Deus quer que você seja.”

Max Lucado

RESUMO

Este trabalho descreve a síntese de nanopartículas de ouro (np-Au) na presença de estabilizantes poliméricos, a caracterização da estrutura e algumas propriedades. As np-Au foram sintetizadas tanto por método químico, via redução de ácido cloroaurico (HAuCl_4) com citrato e na presença do poli líquido iônico, hidrocloreto de poli(1-vinil-3-N-carboximetilimidazólio) (PVAIE), quanto por método fotoquímico, empregando-se luz UV (254 nm), na presença do polímero poli(etileno imina) ramificado (PEI). As soluções coloidais resultantes de np-Au-PVAIE e np-Au-PEI foram caracterizadas por espectroscopia UV-vis, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e mobilidade eletroforética, e a morfologia investigada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras de np-Au-PVAIE são formadas por partículas esféricas, com diâmetro médio de 12 nm. Embora negativo, o potencial zeta das np-Au-PVAIE é menor que da amostra controle (sem polímero) devido ao pareamento dos íons citrato com o cátion imidazólio do polímero PVAIE. As np-Au-PVAIE foram posteriormente depositadas em filmes ultrafinos pela técnica de automontagem *Layer-by-Layer* (LbL). Os filmes obtidos contém uma quantidade muito maior de nanopartículas quando comparados aos filmes com np-Au sem cobertura polimérica. Além disso, as np-Au-PVAIE permanecem individualizadas nos filmes, diferentemente da aglomeração observada em filmes depositados com np-Au sem polímero. Por meio da voltametria cíclica, os filmes de np-Au-PVAIE depositados sobre eletrodo de ITO são capazes de conduzir a interconversão ferricianeto \leftrightarrow ferrocianeto com taxas de transferência eletrônica maiores que aquelas determinadas com eletrodo de ITO sem filme. Da mesma forma, tais filmes permitem conduzir a oxidação e detecção de cisteína. As amostras de np-Au-PEI são também formadas por partículas esféricas, com diâmetros médios variando entre 35,6 nm e 8,6 nm, dependendo da concentração utilizada de PEI. Em contrapartida, as soluções coloidais de np-Au-PEI exibem potencial zeta positivo, uma vez que HAuCl_4 protona os grupos amino do PEI e não há a presença de citrato. Essas nanopartículas podem ser obtidas sob luz ambiente, apenas pela ação redutora dos grupos amino do PEI. No entanto, nessa condição são necessárias cerca de 5 h de reação. Por outro lado, a luz UV acelera o processo que pode ser concluído num intervalo de 10 minutos. As np-Au-PEI não apresentam toxicidade quando avaliadas em ensaio de viabilidade celular com células de adenocarcinoma da mama humano (MCF - 7, American Type Culture Collection EUA) e células do tecido conjuntivo humano normais.

Palavras-chave: nanopartículas de ouro, redução fotoquímica, filmes ultrafinos, sensores, viabilidade célula.

ABSTRACT

This work describes the synthesis of gold nanoparticles (np-Au) in presence of polymeric stabilizers and characterization of their structure and some properties. The np-Au were synthesized by either chemical method, via reduction of HAuCl_4 with citrate in presence of the poly ionic liquid, poly(1-vynil-3-N-carboxymethyl imidazolium) hydrochloride (PVAIE) or by photochemical method, employing UV light (254 nm) in presence of the ramified poly(ethylenimine) (PEI). The structure and morphology of the resulting colloidal solutions of np-Au-PVAIE and np-Au-PEI were investigated by UV-vis absorption spectroscopy, dynamic light scattering and electroforetic mobility, and transmission electron microscopy. The np-Au-PVAIE samples are composed of spherical particles of 12 nm. Even negative, the zeta potential of np-Au-PVAIE is lower than that exhibited by naked np-Au (without polymer) due to ionic pairing of citrate ions with the imidazolium cation of PVAIE. The np-Au-PVAIE were further deposited as ultrathin films via the layer-by-layer technique. The amount of nanoparticles is greater in films deposited with np-Au-PVAIE than that found in films made with naked np-Au. While the films deposited with naked np-Au show significant particle agglomeration, the np-Au-PVAIE remain as individuals in their respective films. By means of cyclic voltammetry, the np-Au-PVAIE films deposited onto ITO electrodes are capable of conducting the ferricyanide \leftrightarrow ferrocyanide interconversion at much higher electron transfer rates. Furthermore, such films allow one to oxidize and detect cystein. The np-Au-PEI samples are also formed by spherical particles with diameters ranging from 35.6 nm to 8.6 nm, which depends on the concentration of PEI. Their colloidal solutions exhibit a positive zeta potential since HAuCl_4 protonates PEI amino groups and there is not citrate in the medium. These nanoparticles can be prepared under ambient illumination solely by the reductive action of PEI. Nonetheless, in this condition the reaction takes about 5h to be completed. By the other hand, the UV light shortens the process to about 10 minutes. The np-Au-PEI samples are non-toxic when evaluated in cell viability tests performed with MCF-7 and human connective tissues.

Keywords : Gold nanoparticles, photochemical reduction, ultrathin films, sensors, cell viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estruturas de cátions e ânions comumente utilizados para formação de Líquidos Iônicos.	8
Figura 3.2 - Esquema de construção do filme pela técnica LbL por atração eletrostática de poliânion e polication.....	10
Figura 3.3 – Voltametria cíclica do potencial aplicado em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ onde E_i é o potencial inicial, E_{Ai} o potencial final. E_{pc} corrente potencial catódica e E_{pa} corrente de potencial anódico.	14
Figura 3.4 - Voltametria Cíclica do eletrodo modificado de Grafeno e nanopaticulas de ouro em PBS 0,1 mol.L-1 contendo 2 mmol de L-CySH, variando as velocidades de varredura de 40 mV a 300 mV.....	15
Figura 4.1 Fórmula estrutural dos polímeros. Poli(etileno imina) ramificada (PEI) (a). Poli(4-estirenosulfato de sódio) (PSS) (b), hidrocloreto de poli(cloreto de 1-vinil-3-N-carboximetilimidazólio) (PVAIE)(c), hidrocloreto de poli(dialildimetil amônio) (PDAC).....	18
Figura 4.2 – Câmara para fotoredução.....	21
Figura 4.3 - Esquema de automontagem dos filmes.....	24
Figura 5.1 - Espectros de absorção UV-vis das soluções antes e após a redução com citrato.	28
Figura 5.2 – Soluções antes da síntese e depois da síntese. (a) Solução de HAuCl_4 e solução sintetizada de np-Au. (b) Solução de HAuCl_4 com 500 μL de solução de Cl-PVAIE e solução sintetizada de np-Au e Cl-PVAIE.....	29
Figura 5.3 - Micrografias obtidas por MET das amostras np-Au-cit (a) e np-Au-PVAIE-10 (b).....	30

Figura 5.4 Espectros de absorção UV-vis obtidos na deposição do filme-I (a), filme-II (b) e filme-III (c). Os gráficos inseridos em cada conjunto de espectros representa a variação da absorbância máxima com o número de bicamadas depositadas.....	32
Figura 5.5. Voltamogramas obtidos em KCl 1,0 mol.L ⁻¹ , 100 mV.s ⁻¹ , com o filme-I (a), filme-II (b) e filme-III (c).....	35
Figura 5.6 - Voltamogramas e curvas de J (anódico e catódico) versus V ^{1/2} obtidas em solução de K ₃ Fe(CN) ₆ 0,1 mol.L ⁻¹ em KCl 1,0 mol.L ⁻¹ com o filme-I (a e d), filme-II (b e e) e filme-III (c e f).	37
Figura 5.7 - Voltamogramas obtidos em cisteína em diferentes concentrações, 2 mol.L ⁻¹ a 8 mmol.L ⁻¹ em NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ , a 100 mV.s ⁻¹ com os filmes (a) controle (ITO sem filme), b) (PVAIE/np-Au-cit)10, c) (PVAIE/np-Au-PVAIE) e d) (PDAC/np-Au-PVAIE).	40
Figura 5.8 - Espectros UV-vis das soluções puras e das misturas (a) antes e (b) depois do tratamento com luz UV.....	43
Figura 5.9 – (a) Solução pura de HAuCl ₄ e as misturas de HAuCl ₄ e PEI antes da redução. (b) Solução de np-Au pura e as misturas de np-Au e PEI depois da redução.	44
Figura 5.10 - Espectros de absorção UV-vis da mistura HAuCl ₄ + PEI-10x obtidos em diferentes tempos de reação conduzida sob luz ambiente (a) e UV (b).	45
Figura 5.11 - Imagens de MET e curva de distribuição de tamanhos das amostras np-Au-PEI-05 (a,d), np-Au-PEI-10 (b,e) e np-Au-PEI-20 (c,f).	49

Figura 5.12 – Voltametria cíclica das soluções de H _{Au} Cl ₄ ($6,0 \times 10^{-8}$ mol.L ⁻¹), PEI (1 g.mol ⁻¹) e a mistura das soluções na razão molar PEI / Au 10:1, a velocidade de 50 mV.....	50
Figura 5.13 – Mecanismo de reação para a redução do ácido cloroáurico, na presença do PEI.....	51
Figura 5.14 - Viabilidade celular de tecido conjuntivo humano e adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) após tratamento com np-Au-PEI por 72 horas. Células normais (A) e tumorais (B) tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de ouro cobertas com PEI, como indicado. Os dados são apresentados como porcentagem de células viáveis ± desvio padrão da média de três experimentos independentes. * Estatisticamente significante, * P < 0.05, ** P<0.01 e *** P<0.001.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Potencial zeta (ζ), diâmetro hidrodinâmico (DH) e diâmetro estimado por MET (D_{MET}) dos coloides preparados.....	31
Tabela 5.2 - Parâmetros eletroquímicos para os filmes I, II e III e para o controle (ITO sem filme) determinados por voltametria cíclica em $K_3Fe(CN)_6$ 0,1 mol.L ⁻¹ em KCl 1,0 mol.L ⁻¹ . Valores determinados a $v = 60$	38
Tabela 5.3 - Parâmetros eletroquímicos obtidos para a oxidação-redução da cisteína por VC a 100 mV.s ⁻¹ com filmes de np-Au.	41
Tabela 5.4 – Proriedades coloidais e D_{MET} das misturas np-Au e PEI.....	47

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ΔE_p	Variação do potencial de pico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência.
PVAIE	Poli(cloreto de 1-vinil-3N-carboximetilimidazólio)
CNT	<i>Carbon Nanotubes</i> – Nanotubos de Carbono
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
D_{MET}	Diâmetro medido por microscopia eletrônica de transmissão
J	Densidade de corrente
J_{pa}	Densidade de corrente anódica
J_{pc}	Densidade de corrente catódica
k_{ap}	Constante aparente de taxa de transferência de elétrons
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
nm	nanômetros
np-Au	Nanopartículas de ouro
PDAC	Hidrocloreto de poli(dialil dimetilamônio)
PEI	Poli(etilenoimina)
PLIs	Poli líquidos iônicos
PSS	Poli(4-estirenosulfato de sódio)
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> – ressonância plasmônica de superfície
UV- Vis	Ultravioleta visível
v	Velocidade de varredura
$v^{1/2}$	Raiz da velocidade de varredura
VC	Voltametria cíclica
VDP	Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO	4
3.2 POLI LÍQUIDO IÔNICO	6
3.3 FILMES ULTRAFINOS	8
3.4 SENSORES QUÍMICOS.....	11
3.5 MORFOLOGIA E PROPRIEDADE DAS NANOPARTICULAS.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 MATERIAIS	17
4.2 MÉTODOS	19
4.2.1 Síntese das Nanopartículas de Ouro (np-Au).....	19
4.2.2 Caracterização Estrutural e Morfológicas das np-Au.....	22
4.2.3. Deposição de Filmes de np-Au	23
4.2.4 Caracterização Eletroquímica dos filmes de np-Au	25
4.2.5. Detecção de cisteína.....	25
4.2.6. Ensaio Biológico.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Síntese Química de np-Au-PVAIE	28
5.1.1 Propriedades ópticas/Espectroscopia UV-vis das soluções	28
5.1.2 Morfologia e propriedades dos coloides	30
5.2 Filmes de np-Au-PVAIE e detecção de cisteína.....	31
5.2.1. Deposição dos filmes	31
5.2.2. Comportamento Eletroquímico dos Filmes.....	34
5.2.3. Detecção de cisteína.....	39

5.3 Síntese fotoquímica de np-Au-PEI.....	42
5.3.1 Propriedades ópticas/Espectroscopia UV-vis das soluções	42
5.3.2 Morfologia e propriedades coloidais	47
6. CONCLUSÕES	54
7. TRABALHOS FUTUROS	55
8. REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

O ouro, um material muito explorado na ciência, obteve um crescimento exponencial em suas aplicações principalmente na nanotecnologia e na nanociência com novos materiais, como exemplo as nanopartículas.¹ As nanopartículas de ouro (np-Au), são partículas metálicas estáveis, e que apresentam aspectos importantes, como suas propriedades eletrônicas relacionadas ao tamanho, para diversas aplicações, podemos citar os sensores eletroquímicos.

Tais sensores eletroquímicos têm se desenvolvido rapidamente desde a década de 1990, devido à necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para a detecção de compostos químicos e biológicos em concentrações muito baixas.² Em essência, são dispositivos que convertem informações químicas ou bioquímicas em sinais analiticamente mensuráveis.³ Os principais sensores eletroquímicos podem ser classificados em potenciométricos, amperométricos, voltamétricos e condutométricos.

Muitos sensores eletroquímicos são construídos a partir de materiais nanoestruturados que ganharam importância a partir da década de 1990. Em particular, as nanopartículas de metais nobres, como Ag, Au e Pt são de grande interesse ao desenvolvimento desses sensores.⁴ Tais nanopartículas aumentam consideravelmente a taxa de transferência eletrônica na superfície do eletrodo, o que aumenta os níveis de corrente medida e, portanto, a sensibilidade.⁵ As

nanopartículas podem ainda servir de sítio de ancoragem para moléculas do analito ou de receptores que sejam capazes de reconhecer o analito de interesse.⁶ Alguns analitos de importância biológica tais como cisteína, cafeína, ácido ascórbico e dopamina podem ser detectados e identificados com sensores eletroquímicos nanoestruturados utilizando eletrodos de nanopartículas ouro.^{7,8}

A cisteína, cuja detecção é uma das aplicações deste trabalho, é um aminoácido sulfurado, sintetizado a partir da metionina durante a vida adulta. É considerado aminoácido essencial, pois em lactantes sua síntese é insuficiente sendo inserido como suplemento em crianças que recebem alimentação por via parental total. Alguns estudos já mostraram que a administração por via oral da acetilcisteína inibe a ação de lesões na pele causadas pela exposição a luz.⁹

Além dos sensores eletroquímicos, as nanopartículas de ouro são empregadas em dispositivos biomédicos, em particular no tratamento de câncer por terapia fototérmica.^{10,11} Em geometrias particulares, as nanopartículas de ouro dissipam calor quando excitadas com radiação infravermelha, gerando gradientes de temperatura de 10-40°C que são suficientes para romper a parede de células tumorais.¹²

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A proposta do trabalho é desenvolver métodos de preparação de nanopartículas de ouro estabilizadas por polímeros, visando sua aplicação em sensores eletroquímicos e dispositivos para terapia fototérmica.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar as nanopartículas por método químico (redução com citrato de sódio), na presença do líquido iônico polimerizado, o cloreto de poli(1-vinil-3-N-carboximetilimidazólio) (PVAIE), e por método fotoquímico, na presença de poli(etilenoimina) ramificada (PEI).

- Caracterizar as nanopartículas, np-Au-PVAIE e np-Au-PEI, por espectroscopia de absorção UV-vis, medidas de potencial Zeta, diâmetro hidrodinâmico e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

- Imobilizar as np-Au-PVAIE sobre vidro comum e vidro condutor (ITO) na forma de filmes ultrafinos depositados pela técnica de automontagem ou LbL (do inglês *Layer-by-Layer*).

- Avaliar as propriedades eletroquímicas desses filmes por voltametria cíclica. Após esta caracterização preliminar, os filmes serão testados como eletrodo de trabalho para a oxidação da cisteína.

- Avaliar a toxicidade das np-Au-PEI por ensaio de viabilidade celular com células de adenocarcinoma humano e de tecido conjuntivo sadio.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO

A definição utilizada para descrever a nanopartícula, conceitua que a partícula é considerada nano quando seu diâmetro estiver entre 1 a 100 nm, nas quais suas propriedades derivam do seu tamanho, ou seja, a proporção entre a área superficial e o volume.¹³

As nanopartículas de metais nobres, como ouro (np-Au), prata (np-Ag) e platina (np-Pt), são nanomateriais de enorme interesse às áreas de fotônica, catálise, biomedicina, sensores, entre outras.^{14,15} Esse interesse se deve à dependência de suas propriedades ópticas e reatividade com o formato e o tamanho das partículas que, por sua vez, podem ser arquitetados com grande precisão em escala atômica.¹⁶ Nas np-Au e np-Ag, o forte acoplamento entre os plasmons de superfície, - que são definidos como uma oscilação coletiva dos elétrons na interface de dois materiais, geralmente um metal e um isolante -¹⁷ com a luz visível, ou seja, quando a frequência de oscilação de um plasmon entra em ressonância com a frequência de um foton incidente,¹⁸ gera o fenômeno denominado de ressonância plasmônica de superfície localizada (*localized surface plasmon resonance*, LSPR).^{19,20}

Entre outros efeitos, o fenômeno LSPR atribui cores distintas às suspensões coloidais de np-Au e np-Ag. As cores são dependentes do formato, tamanho e distância interpartículas.²¹ Além disso, dependem das propriedades físico-químicas do ambiente que as envolve, tais como constante dielétrica, natureza dos solutos, o que permite seu uso como sonda em sensores químicos e biológicos.^{22,23}

A síntese das np-Au pode se dar de várias maneiras, sendo o método de redução com citrato, descrito pela primeira vez por Turkevich, em 1951,²⁴ o mais empregado. O método consiste basicamente em adicionar citrato de sódio em excesso sobre uma solução aquosa de ácido cloroáurico (HAuCl₄) mantida em temperatura de refluxo. Após trinta minutos de reação, é obtida uma solução coloidal de np-Au, de cor roxo, como se fosse um vinho. O citrato em excesso serve para, além da redução do precursor de ouro, estabilizar as nanopartículas em solução coloidal.

A solução obtida de np-Au é considerada um colóide liofóbico, ou seja, as np-Au têm pouca afinidade pelo meio dispersante. Desse modo, o tratamento da superfície das np-Au, por exemplo com citrato de sódio em excesso, é capaz de garantir a estabilidade do coloide via repulsão eletrostática entre as nanopartículas. Outros tratamentos podem também garantir a estabilidade coloidal, como a adição de surfactantes, polieletrólitos e ligantes.^{19,25} Em particular, a síntese das nanopartículas na presença de polímeros é de grande interesse, devido o polímero funcionar como um agente de nucleação, aumentando a taxa de formação das partículas e, ainda, como estabilizante, prevenindo a aglomeração com o tempo.^{26,27}

Embora a redução química de íons metálicos seja o método mais difundido para a síntese de nanopartículas metálicas, muitos desses agentes redutores são tóxicos, de custo alto e, ainda, seus resíduos podem ser incorporados à nanoestrutura, dificultando a caracterização e limitando suas aplicações.²⁸ O uso da luz como agente redutor é uma das alternativas investigadas atualmente, uma vez que não produz resíduos tóxicos e permite modular com melhor eficiência as características das nanopartículas (tamanho, formato, superfície).^{29,30} Além disso,

a redução fotoquímica é de custo relativamente menor que dos outros métodos de preparação de nanopartículas. Há que se considerar também que a luz como agente redutor é mais seletiva e, na maioria das vezes, não é influenciada pela presença de outros solutos. Assim, a redução fotoquímica pode ser uma técnica muito eficaz na preparação de nanopartículas.^{16,31,32}

Embora a luz seja capaz de conduzir a formação das nanopartículas, o processo pode ser muito lento.³³ Nesse caso, é comum o uso de um agente de sacrifício, uma espécie doadora de elétrons mais susceptível à oxidação. Nessa função, são usados cetonas, alcoóis e aminas. Polímeros contendo esses grupos funcionais também podem ser empregados.³⁰ Tais polímeros ainda podem servir como estabilizadores, enquanto formam uma cobertura na superfície das nanopartículas que evita sua aglomeração.³⁴

3.2 POLI LÍQUIDO IÔNICO

Os líquidos iônicos (LIs) podem ser brevemente descritos como sais que sob temperatura ambiente são líquidos. Um dos primeiros LIs sintetizados pelo homem foi o nitrato de etilamônio, $(C_2H_5)NH_3^+NO_3^-$, com temperatura de fusão de 12°C.³⁵ A partir da década de 1980 começaram a ser introduzidos os LIs baseados no cátion imidazólio alquil-substituído, cujas propriedades tais como viscosidade, temperatura de fusão e acidez podem ser moduladas pelo tipo de substituição e do contra-íon.^{36,37}

Entre as principais propriedades dos LIs, destacam-se: pressão de vapor desprezível, viscosidade moderada, estabilidade elevada, inclusive eletroquímica e, principalmente, alta capacidade de solvatação, desde espécies polares até

não-polares.³⁸ Por conta dessas propriedades, os LIs são conhecidos como solventes ideais, que podem ser usados em Química Verde, processamento de celulose, baterias, reciclagem, extração de metais, dispositivos aeroespaciais, entre outros.^{39,40}

As propriedades dos LIs, especialmente os baseados em derivados do cátion imidazólio, devem-se ao arranjo supramolecular entre os cátions e o ânions que se estabelece via ligações de hidrogênio. Essa organização se estende desde o estado sólido até a fase gasosa. Essa organização estrutural, de natureza entrópica, permite que os LIs “solubilizem” tanto espécies polares quanto apolares, algo único entre os solventes conhecidos.⁴¹ Também conhecido como efeito líquido iônico, essa organização estrutural permite a preparação de nanoestruturas, como nanopartículas de ouro.

Para que as propriedades dos LIs pudessem ser exploradas na preparação de novos materiais, polímeros à base de LIs ou simplesmente poli líquidos iônicos (PLIs) também têm sido desenvolvidos, isto é, referem-se a um tipo especial de polieletrólito que carregam uma espécie de LI em cada unidade de repetição.⁴² Os PLIs se assemelham a polieletrólitos, como pode ser observado na **Figura 3.1**, uma vez que apresentam um grupo ionizável em cada uma das suas unidades de repetição. Além disso, os PLIs são sólidos com temperatura de transição vítrea bem menor que dos polieletrólitos convencionais, tais como o hidrocloreto de poli(dialildimetil amônio) (PDAC) e o poli(4-estirenosulfato de sódio) (PSS).³⁸ Sendo assim, a mobilidade molecular nos PLIs permite seu uso como eletrólito sólido em dispositivos eletroquímicos. As vantagens de um PLI frente ao respectivo LI são, principalmente, a maior estabilidade mecânica,

processabilidade, durabilidade e o controle espacial das subunidades de LIs na arquitetura da cadeia polimérica.^{43,44}

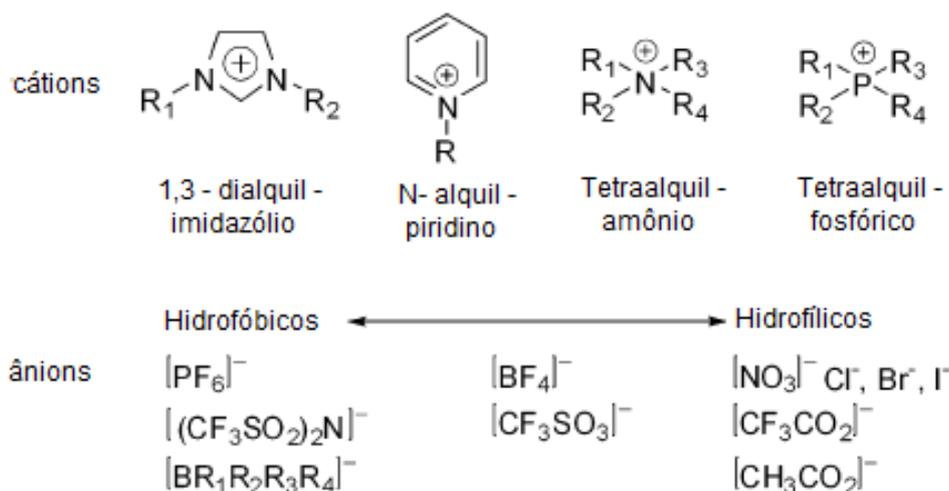


Figura 3.1 - Estruturas de cátions e ânions comumente utilizados para formação de Líquidos Iônicos. Figura adaptada da referência 38.

3.3 FILMES ULTRAFINOS

São denominados filmes ultrafinos aqueles que possuem espessuras inferiores a 100 nm, nos quais, estruturas moleculares aderem ao substrato permanecendo ordenadas em forma de bicamadas envolvendo processos heterogêneos tais como adsorção, dessorção, nucleação e agregação de materiais na superfície.^{45,46}

Os filmes ultrafinos podem ser obtidos por diferentes técnicas de deposição.^{47,48} Entre as principais características desejadas de uma técnica de deposição, esta a sua capacidade de obter filmes com espessura controlável em escala nanométrica, e que a técnica seja de fácil execução e custo baixo.⁴⁹ Assim, a técnica de automontagem ou LbL (do inglês *layer-by-layer*) tem se

destacado como uma das mais promissoras. Além da facilidade de execução e custo baixo, a técnica LbL pode ser aplicada a diferentes classes de materiais. A técnica consiste na transferência de materiais em solução para um substrato sólido, cuja adsorção é mediada por atração eletrostática.^{50,51}

A técnica LbL foi proposta originalmente por Decher em 1991 para a deposição de filmes de polieletrólitos.⁵² Ainda na década de 1990, a técnica LbL foi explorada para diversos materiais tornando-se um dos métodos mais utilizados para a preparação de filmes nanoestruturados, visando o desenvolvimento de dispositivos moleculares para conversão de energia e sensores químicos.⁵³

A deposição dos filmes por LbL consiste na transferência de camadas de materiais em solução para um substrato sólido. O substrato é imerso na solução do material de deposição por um tempo determinado, sendo a adsorção um processo espontâneo, regido por forças secundárias, como atração eletrostática, ligação de hidrogênio e forças de dispersão.⁵⁰

Na **Figura 3.2** é apresentada uma ilustração esquemática da técnica LbL. Na etapa (1) o substrato, carregado positivamente, é imerso na solução de um poliânion, formando uma camada adsorvida, por interação eletrostática. Em seguida, na etapa (2), o substrato+poliânion é enxaguado para eliminar o material fracamente adsorvido. Na etapa (3) o substrato+poliânion é imerso na solução de um policátion até a formação de uma nova camada. Posteriormente, o substrato + poliânion + policátion são lavados e ao final do ciclo, um filme com uma bicamada de poliânion + policátion é obtido. Os ciclos 1 a 4 podem ser repetidos indefinidamente, até se atingir a espessura desejada.

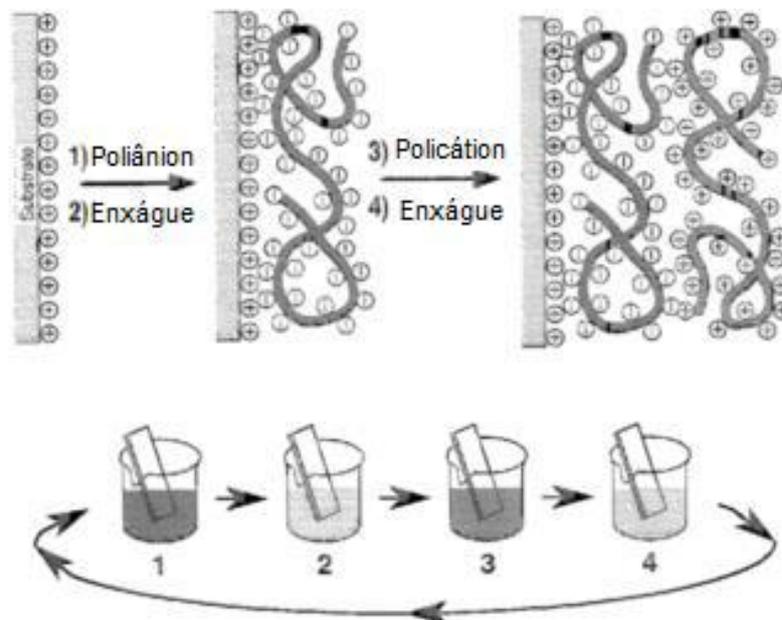


Figura 3.2 - Esquema de construção do filme pela técnica LbL por atração eletrostática de poliânion e policátion. Adaptado da referência 52.

A deposição por atração eletrostática envolve um mecanismo de supercompensação de cargas, no qual o substrato é recoberto pelas cadeias do polieletrólito até que seus sítios de carga superficial sejam supercompensados.⁵⁴ Isso significa que o sinal da carga inicial do substrato é invertido e assim, a camada formada de polieletrólito passa a repelir as espécies em solução, fazendo com que a adsorção cesse por completo.

A quantidade de material adsorvido é constante a cada ciclo de deposição. Como as camadas apresentam espessuras pequenas, a técnica LbL é reconhecida por produzir filmes com controle de espessura em escala nanométrica.⁵³ A espessura, assim como a morfologia e as propriedades dos filmes, podem também ser controladas pelas condições físico-químicas das soluções, como concentração e pH.^{55,}

A adsorção dos materiais durante a deposição LbL normalmente é monitorada por espectroscopia de absorção UV-vis, isto porque muitos materiais de interesse absorvem radiação nessa região do espectro eletromagnético..⁵⁶

3.4 SENSORES QUÍMICOS

Os sensores químicos são definidos como dispositivos que convertem informação química em sinais elétricos e ópticos mensuráveis. Isto ocorre, pois no sensor existe uma camada ativa que interage com a espécie e tal evento é traduzido para um sinal mensurável.⁵⁰ Assim, os sensores eletroquímicos se baseiam no fato da corrente gerada pela oxidação e a redução do analíto eletroativo na superfície do eletrodo gerar uma medida eletroquímica dentro de um potencial fixo ou variável.⁵ Estas medidas eletroquímicas são simples e de baixo custo, comparadas a técnicas espectroscópicas e cromatográficas, e hoje são realizadas por equipamentos como potenciostatos e galvanostatos.⁵⁷

Os sensores químicos são dispositivos pequenos, robustos, portáteis e de fácil manipulação. O sensor tem sido um instrumento muito utilizado na química analítica, substituindo, na maioria das vezes, aparelhos complexos e a necessidade de um estrutura de suporte.⁵⁸

Muitas atividades no campo de biomedicina, indústria de alimentos, e controle ambiental necessitam de detecção e quantificação de produtos químicos. Tais tarefas são normalmente realizadas por técnicas espectroscópicas, cromatográficas e de difração de raios X, pois são robustas, confiáveis e disponíveis. No entanto, essas técnicas necessitam de operadores especializados, e as análises são geralmente demoradas, além do seu alto custo.

Assim, houve a necessidade de uma forma mais rápida, fácil de operar sendo capaz de operar de forma semelhante à convencional, desta forma os sensores químicos se tornaram a melhor opção atualmente.

A combinação de sensores elétricos e as incríveis características das nanopartículas têm alcançado métodos mais confiáveis e potentes para detecção de analitos.⁵⁹ Desta forma, muitos sensores ao longo dos anos têm sido construídos com tamanhos, formas, composições e propriedades diferentes.

Muitos nanomateriais têm chamado a atenção por poderem ser usados como sensores como, por exemplo, os nanotubos de carbono (CNT). Dentre muitas aplicações, os CNTs são considerados candidatos para o desenvolvimento da próxima geração de sensores eletroquímicos.^{60, 61}

Sensores de diferentes formas e arquiteturas tem ganhado espaço na química de materiais, como, os sensores de misturas híbridas de nanopartículas de ouro e matrizes poliméricas,^{59,23} que possuem propriedades distintas, provando serem ótimos sensores para estruturas químicas específicas, como cisteína, dopamina e ácido ascórbico, por exemplo.⁶²

A cisteína, cuja estrutura é apresentada na Figura X, é um aminoácido que ocorre naturalmente no organismo. Seu grupo sulfidril (SH) desempenha um papel importante na atividade biológica. Os níveis anormais de cisteína ou homocisteína (Hcy) estão relacionados a várias doenças tais como crescimento retardado, Alzheimer e doenças cardiovasculares.⁵⁹ Surge então a necessidade de sistemas que possam detectar e quantificar analitos em meio biológico.

Diversos métodos têm sido utilizado para detecção de cisteína, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),⁶³ colorimetria¹⁴ e métodos eletroquímicos. O método eletroquímico recebeu atenção, comparado a outras

tecnologias, devido a características importantes, como simples operação, alta sensibilidade, boa seletividade e principalmente baixo custo.⁶⁴

A voltametria se baseia na medida da corrente em uma célula eletroquímica nas condições de completa polarização de concentração, na qual, a velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo limita a velocidade de oxidação ou redução do analito.⁶⁵ A voltametria é amplamente empregada por químicos analíticos, inorgânicos, físico-químicos e bioquímicos para estudos fundamentais, tais como, processos de adsorção nas superfícies,⁷ processos de oxidação e redução em vários meios e mecanismos de transferência de elétrons em superfícies modificadas de eletrodos.⁶⁶

A célula é constituída de três eletrodos imersos em uma solução contendo um excesso de um eletrólito não reativo (eletrólito de suporte). Um dos eletrodos imersos no eletrólito é o eletrodo de trabalho, cujo potencial varia linearmente com o tempo, em relação a um eletrodo de referência cujo potencial permanece constante durante o experimento. As dimensões do eletrodo de trabalho são mantidas pequenas para aumentar sua tendência em se tornar polarizado. O outro eletrodo é um contra-eletrodo, que frequentemente é um fio de platina enrolado.⁶⁷

A voltametria cíclica é a técnica mais empregada para a caracterização dos sensores desenvolvidos e para detecção de analitos. A voltametria cíclica baseia-se na voltagem aplicada no eletrodo de trabalho varrido linearmente de um valor inicial a um limite pré-determinado. O operador pode interromper a varredura em qualquer instante ou deixar que o ciclo termine em algum outro valor pré-determinado. A resposta da corrente é representada graficamente como a função do potencial aplicado.⁶⁸ Conforme observado na **Figura 3.3**.

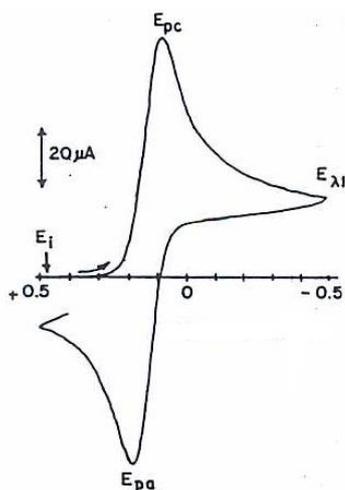


Figura 3.3 – Voltametria cíclica do potencial aplicado em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ onde E_i é o potencial inicial, E_{ai} o potencial final. E_{pc} corrente potencial catódica e E_{pa} corrente de potencial anódico. Figura adaptada da referência 68.

Esta tecnologia foi utilizada por um grupo de química na Universidade de Xiangtan para detecção de L-cySH em eletrodos de folhas de grafeno e nanopartículas de ouro.⁶⁴

Obtiveram como resultado a observação da resposta do eletrodo modificado para oxidação de cisteína em diferentes velocidades. Observa-se o comportamento cíclico de L-CySH sobre o eletrodo de grafeno modificado em diferentes velocidades de varredura, visualizados na **Figura 3.4**. Verifica-se que a E_{pc} é deslocada acompanhada positivamente pelo aumento da corrente de pico mediante o aumento da velocidade. Isto é resultado de uma reação incompleta da oxidação da L-CySH em maiores velocidades. Entretanto, observa-se que há uma relação linear entre a densidade de corrente e a raiz quadrada da velocidade o que indica que o processo foi controlado por difusão, o que torna o eletrodo, qualificado para a quantificação e detecção de L-CySH. Resultado importante que fundamenta os resultados descritos neste trabalho.

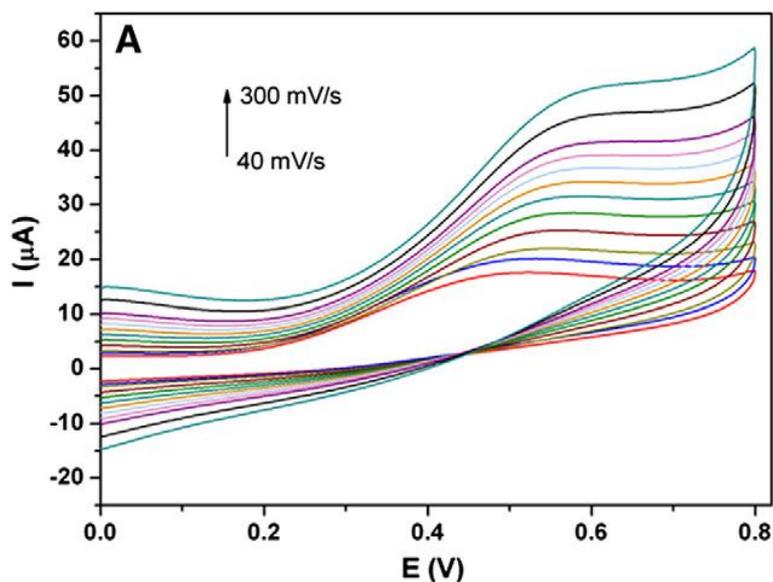


Figura 3.4 - Voltametria Cíclica do eletrodo modificado de Grafeno e nanopaticulas de ouro em PBS 0,1 mol.L-1 contendo 2 mmol de L-CySH, variando as velocidades de varredura de 40 mV a 300 mV. Figura adaptada da referencia 64.

3.5 MORFOLOGIA E PROPRIEDADE DAS NANOPARTICULAS

As nanopartículas são caracterizadas em termos de seus diâmetros hidrodinâmicos (DH), índices de polidispersão (Pdl) e potenciais zeta. O Pdl é a medida da distribuição de diâmetro hidrodinâmico derivada da análise cumulativa de Espalhamento de Luz Dinâmica (Dynamic light scattering (DLS)). Valores de iguais ou menores que 0,1 de Pdl descrevem medidas de suspensões monodispersas. Para valores próximos de 1 têm-se suspensões com polidispersão elevada.⁶⁹

O potencial zeta é um parâmetro que descreve o potencial elétrico na camada de separação entre sólido/líquido interfacial de uma matéria em solução aquosa, sendo um indicador importante e útil para identificar cargas de superfície.⁷⁰ A estabilidade de uma suspensão pode ser, em parte, determinada pelo potencial zeta, ou seja, o potencial zeta está intimamente relacionado com a estabilidade da suspensão de partículas e a morfologia da superfície.⁷¹ Os valores do potencial zeta conferem aos sistemas coloidais uma maior estabilidade, visto que, há repulsões eletrostáticas que impedem a agregação das partículas no coloide, geralmente, soluções estáveis de coloides carregados são preparadas com nanopartículas cujo potencial zeta seja igual ou superior a – 30 mV e +30 mV.⁷² O potencial Zeta pode ser determinado através da velocidade eletroforética, segundo a equação:

$$\xi = \frac{3 \mu \eta}{2 \varepsilon_0 \varepsilon}$$

onde μ = mobilidade eletroforética, η é a viscosidade do meio, ε_0 = permissividade de vácuo, ε = constante dielétrica do meio. A mobilidade elétrica por sua vez é calculada a partir da velocidade média (v) sob a ação do campo elétrico E .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os seguintes reagentes e materiais com as devidas especificações foram empregados na realização do trabalho:

- Ácido cloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 50%, Sigma-Aldrich, $339,79 \text{ g mol}^{-1}$);
- Ácido clorídrico (HCl , 37 %, Vetec);
- Ácido nítrico (HNO_3 , 68 %, Vetec);
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98 %, Vetec);
- Água ultrapura (resistividade: 18 Mohm.cm, purificador Milli-Q[®]);
- Citrato de sódio dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99,5%, Vetec)
- Cloreto de potássio (KCl , 99,5 %, Vetec);
- Gás nitrogênio (N_2 , 99,9 %, White Martins);
- Hidróxido de amônio (NH_4OH , 28 %, Vetec);
- Hidróxido de sódio (NaOH , 98 %, Vetec);
- Hexacianoferrato de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 99 %, Vetec);
- L-Cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$, 97 %, Sigma-Aldrich);
- Poli(4-estirenosulfato de sódio) (PSS), $[-\text{CH}_2\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na})-]_n$, $M_n 70,000 \text{ g mol}^{-1}$, pureza 99 %, Sigma-Aldrich, poliânion);
- Cloreto de poli(1-vinil-3-N-carboximetilimidazólio) (PVAIE), cedido pelo LAQUIMET-IQ-UnB;
- Hidrocloro de poli(dialil dimetilamônio) (PDAC, $(\text{C}_8\text{H}_{16}\text{ClN})_n$, $M_n 450,000 \text{ g mol}^{-1}$, solução aquosa 20%, Sigma-Aldrich, policação);

- Poli(etileno imina) ramificada, (PEI, M_n 60,000 g mol⁻¹, solução aquosa 50%, Sigma-Aldrich);
- Lâminas circulares de quartzo (diâmetro: 15 mm);
- Lâminas de vidro comum (20 mm x 10 mm x 1 mm);
- Substrato de ITO (resistividade: 15 ohm.cm);
- Peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30 %, Vetec).

As fórmulas estruturais dos polímeros empregados são apresentadas na **Figura 4.1**.

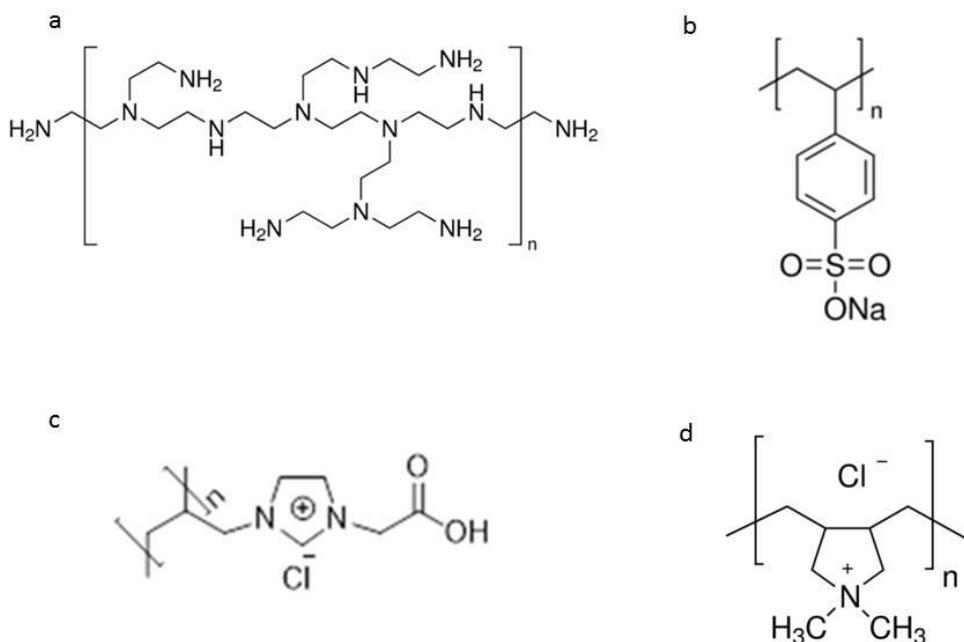


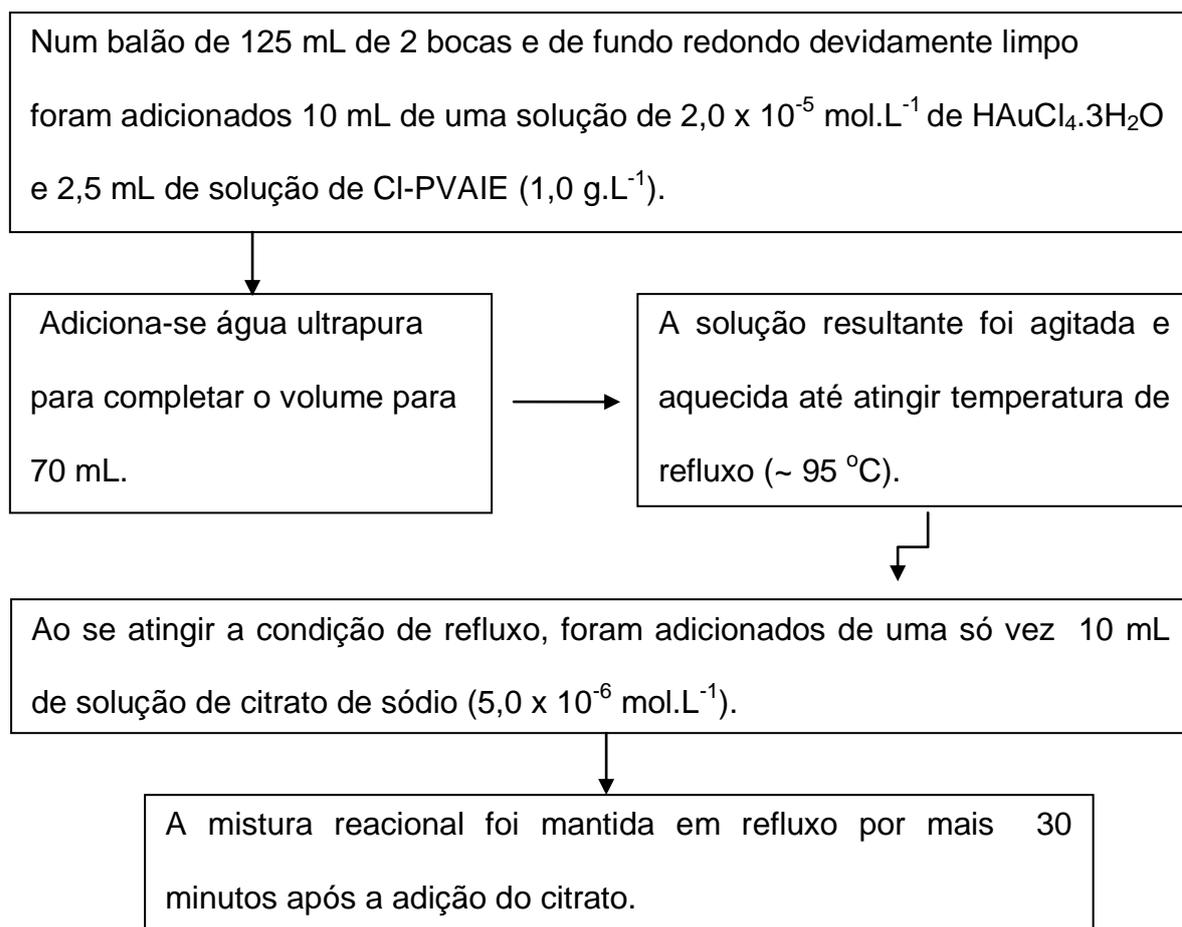
Figura 4.1 Fórmula estrutural dos polímeros. Poli(etileno imina) ramificada (PEI) (a), poli(4-estirenosulfato de sódio) (PSS) (b), hidrocloreto de poli1-vinil-3-N-carboximetilimidazólio) (PVAIE) (c), hidrocloreto de poli(dialildimetil amônio) (PDAC) (d).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese das Nanopartículas de Ouro (np-Au)

4.2.1.1 Síntese Química

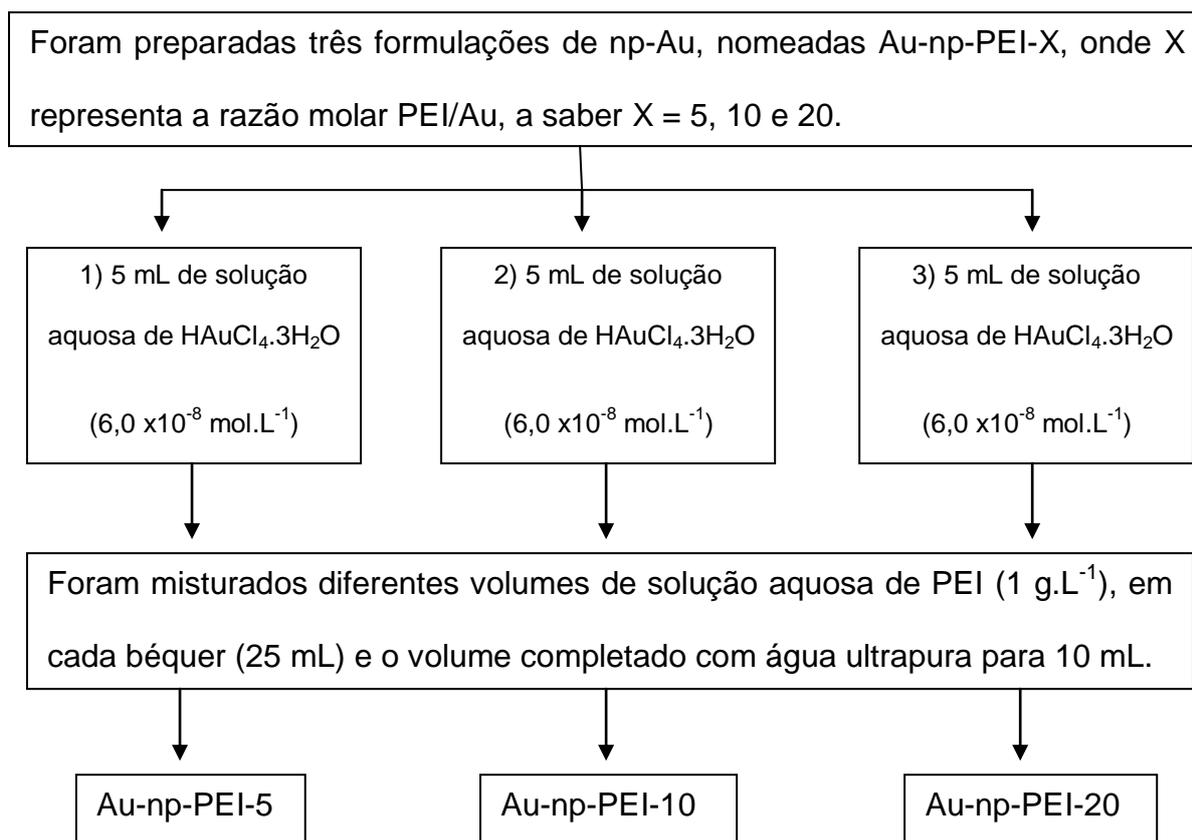
A síntese química das np-Au foi realizada segundo o método originalmente descrito por Turkevich, por redução do ácido cloroáurico com citrato de sódio.²⁴ Contudo, as quantidades dos reagentes foram as mesmas empregadas por Wang *et al.*⁸ Via de regra, o citrato é usado em excesso para também garantir a estabilidade do coloide. Inicialmente, toda as vidrarias empregadas foram lavadas com água régia (HNO₃/HCl 1:3 v/v) a fim de eliminar possíveis pontos de nucleação, como resíduos de outros metais. A síntese segue segundo fluxograma abaixo:



Após a adição do citrato, a cor amarela inicial da mistura entre o HAuCl_4 e o polímero dá lugar rapidamente a uma solução de cor roxa, semelhante a um vinho.⁷³ A solução resultante não requer tratamento adicional é essencialmente, uma solução coloidal de np-Au. A solução coloidal de np-Au foi transferida para um frasco de vidro borosilicato com tampa e recoberto por papel alumínio e armazenada em geladeira. A síntese da amostra de np-Au controle foi realizada da mesma maneira na ausência do polímero.

4.2.1.2 Síntese Fotoquímica

Para a síntese fotoquímica foi empregada uma câmara construída em laboratório, cujas fotografias são apresentadas na **Figura 4.2**. A câmara consiste de uma caixa de ferramentas adaptada com duas lâmpadas UV (254 nm, 8 W) da Osram e um ventilador de computador. Para a síntese:



As soluções obtidas foram então submetidas à radiação UV por igual período de tempo (30 min). Foi estabelecida uma massa de 471 g.mol^{-1} para a unidade de repetição do PEI. Foram realizadas tentativas, porém sem sucesso, de sintetizar as np-Au via fotoquímica sem empregar PEI. A adição de etanol permitiu que np-Au fossem formadas na ausência do polímero, mas as np-Au produzidas rapidamente sedimentavam, indicando a importância do polímero na estabilização da solução coloidal.



Figura 4.2 – Câmara para fotorredução.

4.2.2 Caracterização Estrutural e Morfológicas das np-Au

As soluções coloidais obtidas a partir dos sistemas np-Au/Cl-PVAIE e np-Au/PEI, bem como dos polímeros individuais, foram caracterizadas por espectroscopia de absorção UV-vis com um espectrofotômetro Varian Cary 5000.

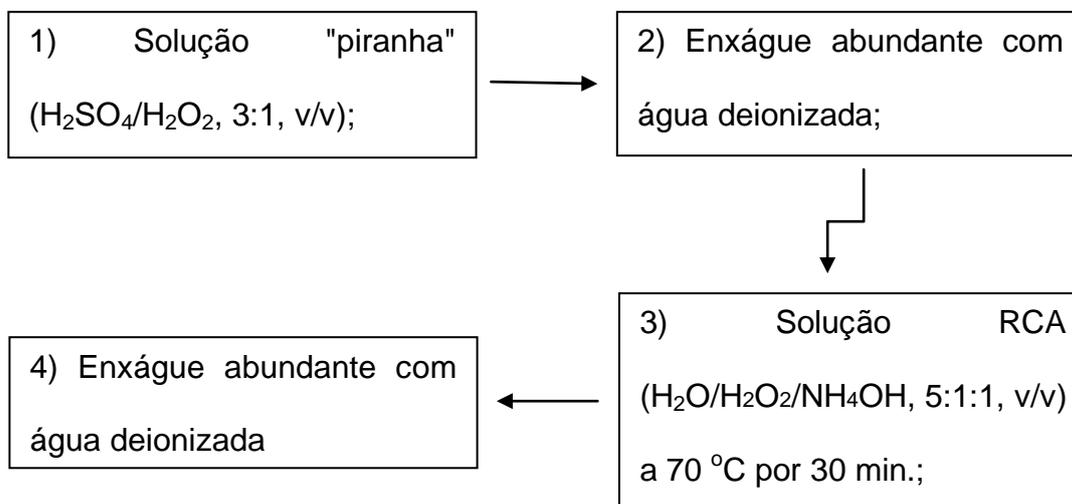
O diâmetro hidrodinâmico (DH) e o potencial zeta (ζ) das np-Au foram determinados em solução por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e mobilidade eletroforética com um equipamento Zeta Sizer Nano- ZS, Malvern Instruments.

A morfologia das np-Au-PEI foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), em microscópio eletrônico JEOL JEM-1011 (JEOL, Japan). As nanopartículas foram diluídas em água ultrapura a concentração de 5% e 3 μ l da solução foram transferidas para telas de cobre de 300 “mesh” (malhas), cobertas com polímero Formvar[®] 0,8%. As amostras foram analisadas em MET a 100 kV e as imagens processadas em câmera UltraScan[®] conectada ao programa Digital Micrograph 3.6.5[®] (Gatan, USA).

O tamanho médio das np-Au foi estimado a partir de uma distribuição log-normal com dados dos tamanhos de aproximadamente 300 partículas, identificadas e medidas nas imagens com o auxílio do software ImageJ.

4.2.3. Deposição de Filmes de np-Au

Os filmes foram depositados em substratos de vidro, quartzo e ITO, descrito no procedimento mais adiante. Os substratos de vidro e quartzo foram previamente limpos numa sequência de soluções:



Os substratos limpos são armazenados em água em geladeira até a deposição dos filmes.⁷⁴ Os substratos de ITO foram esfregados manualmente, um a um, com uma luva de látex e detergente neutro. Os substratos foram depois transferidos para um béquer ao qual se adicionou água ultrapura, formando uma solução de detergente. Os substratos foram então submetidos a tratamento em banho de ultrassom por 20 minutos.

Após esta etapa os substratos foram lavados com água ultrapura para remover o detergente e posteriormente imersos em água ultrapura e submetidos a mais um ciclo de 20 minutos de banho ultrassom. Os substratos foram então acondicionados em água ultrapura na geladeira até a deposição dos filmes.

As deposições foram realizadas com soluções dos materiais nas seguintes condições: PDAC (1 g.L⁻¹), catiônico; PSS (1 g.L⁻¹), aniônico; PVAIE (1 g.L⁻¹) catiônico; np-Au-cit (1,5 x 10⁻⁶ mol.L⁻¹), aniônico, np-Au-PVAIE (1,5 x 10⁻⁶ mol.L⁻¹),

aniônico. Foram depositados filmes com três tipos de arquiteturas: filme-I (PVAIE/np-Au-cit)_n; filme-II (PVAIE/np-Au-PVAIE); filme-III (PDAC/np-Au-PVAIE)_n, onde n representa o número de bicamadas do filme. Previamente à deposição de cada tipo de filme, uma pré-bicamada PDAC/PSS foi depositada em cada substrato para aumentar e uniformizar os sítios de adsorção para a primeira bicamada do filme de interesse. A deposição da pré-bicamada e do filme propriamente dito foi realizada por automontagem, pela imersão sucessiva e alternada do substrato nas soluções dos materiais catiônico e aniônico, assumindo-se que a formação dos filmes ocorre preferencialmente por atração eletrostática. O tempo de imersão em PDAC e PSS foi 3 min., enquanto na solução de np-Au-PVAIE o tempo foi de 5 min. Entre cada imersão, o substrato com material adsorvido foi enxaguado por 20 s com água ultrapura mantido sob agitação magnética intensa. Após o enxague, o substrato foi seco com um jato de ar comprimido. Os ciclos de deposição foram repetidos para valores de n = 1, 3, 5, 7 e 10 (**Figura 4.3**). A deposição dos filmes foi monitorada por espectroscopia UV-vis, obtendo-se espectros a cada número pré-determinado de bicamadas.

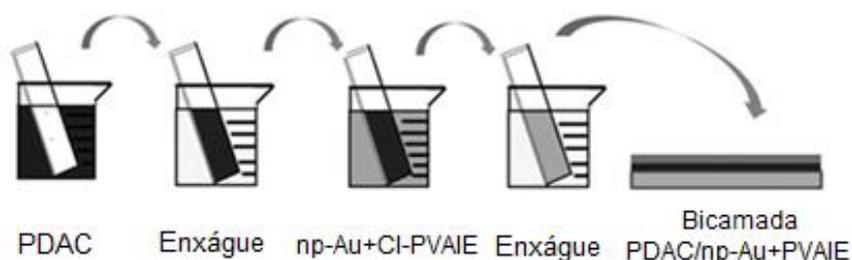


Figura 4.3 Esquema de automontagem dos filmes. Adaptada da referência 60.

4.2.4 Caracterização Eletroquímica dos filmes de np-Au

Os diferentes filmes foram caracterizados por voltametria cíclica (VC) utilizando um potenciostato Autolab PGSTAT 204 da Metrohm. Os experimentos de VC foram conduzidos numa célula eletroquímica contendo três eletrodos; eletrodo de platina (contra-eletrodo), eletrodo Ag/AgCl (eletrodo de referência) e ITO/filme (eletrodo de trabalho). A solução de KCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ foi usada como eletrólito suporte. Para a caracterização do comportamento eletroquímico dos filmes de np-Au foi empregado hexacianoferrato de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) na concentração de 1 mmol.L^{-1} em KCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

4.2.5. Detecção de cisteína

Os três tipos de filmes foram testados como eletrodo de trabalho para a oxidação da cisteína, empregando técnicas voltamétricas, a primeira etapa de desenvolvimento de um sensor para tal analito. O teste inicial para identificar o filme com a melhor resposta para cisteína foi conduzido por VC em solução de cisteína 2 mmol.L^{-1} em NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. O filme escolhido foi então testado para detecção de cisteína via voltametria cíclica (VC). A detecção da resposta analítica do eletrodo foi realizada com soluções de cisteína 0, 2, 4, 6, 8 mmol.L^{-1} .⁵⁷

4.2.6. Ensaio Biológico

Células de tecido conjuntivo humano foram utilizadas como controle de células normais.⁷⁵ As referidas células foram colhidas a partir de polpa dentária de dentes humanos normais e, gentilmente, cedidas pelo Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília-UnB, Brasil. As células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) foram adquiridas na ATCC (American Type Culture Collection). As células humanas normal e tumoral foram cultivadas em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e RPMI1640, respectivamente. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico (100 UI/ml penicilina e 100 µg/ml streptomicina) e mantidos em pH 7,2. Posteriormente as células foram mantidas em incubadora úmida a 37 °C, 5% de CO₂ e umidade de 80%.

As células normal e tumoral foram plaqueadas a densidade de 5×10^3 células em placas de 96 poços e mantidas em estufa úmida por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura das placas foi removido e as células incubadas com 200 µl das soluções contendo np-Au-PEI 5, np-Au-PEI 10 e np-Au-PEI 20 em meio DMEM e RPMI1640, devidamente suplementados. As concentrações utilizadas das nanopartículas foram de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg de Au por mililitro. Cada tratamento foi realizado em quadruplicata e as células mantidas em incubadora úmida a 37 °C com 5% de CO₂ e 80% de umidade pelo período de 72 h.

A viabilidade das células após o tratamento foi mensurada a partir do ensaio colorimétrico de MTT. O meio de tratamento das células foi removido das placas e substituído por 150 µl de solução de meio de cultura contendo (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MTT) (5 mg/ml em 0,15 M de PBS , pH 7,4) por três horas em incubadora úmida. Removida a solução, foram adicionados 200 µl de dimetilsulfóxido para solubilização dos cristais de formazano, produzidos somente pelas células viáveis. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA) utilizando comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices). Para cada amostra, a viabilidade celular foi calculada a partir de dados de quatro poços (n= 4) e expressa como porcentagem, comparada com as células sem tratamento, controle. Os resultados foram mostrados como médias de três experimentos independentes. Todos os dados foram analisados em programa Graphpad Prism 5.0 e submetidos a testes específicos com confiança estatística de 95%. Os dados foram analisados pelo Anova two ways, com pós-testes de Bonferroni. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados por colaboradores do Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese Química de np-Au-PVAIE

5.1.1 Propriedades ópticas/Espectroscopia UV-vis das soluções

A confirmação da formação das np-Au pode ser feita a olho nu, já que a solução resultante apresenta uma cor roxa típica e que é atribuída à banda plasmônica das nanopartículas na faixa de 510-530 nm. Entretanto, uma caracterização mais precisa foi realizada com espectroscopia de absorção UV-vis. Os resultados são apresentados na **Figura 5.1**. Para fins de comparação, são apresentados os espectros das soluções antes da redução com citrato.

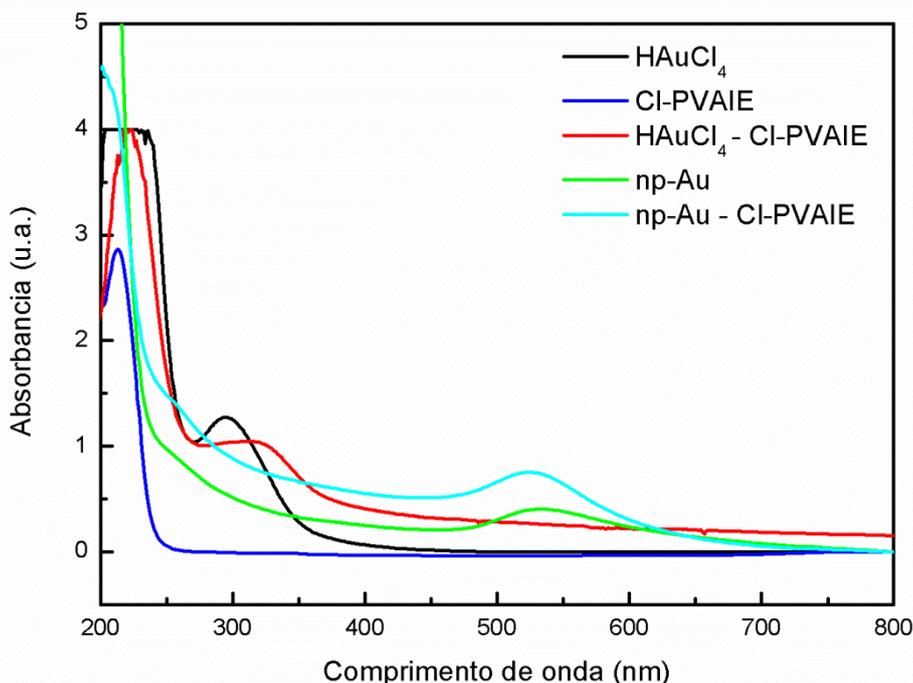


Figura 5.1 - Espectros de absorção UV-vis das soluções antes e após a redução com citrato.

O espectro do Hidrocloreto de poli(1-vinil-3-N-carboximetilimidazólio) (PVAIE) exibe uma banda intensa em 220 nm referente às transições eletrônicas

($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$) no grupo imidazólio. Enquanto isso, a solução de HAuCl_4 apresenta uma banda bem definida em 295 nm atribuída à transição ligante-metal. A mistura das soluções de PVAIE e HAuCl_4 apresenta a banda em 222 nm e em 320 nm atribuídas às mesmas transições das soluções individuais. Após a redução com citrato, os espectros das soluções de HAuCl_4 e misturado com PVAIE passam a exibir uma única banda, a banda plasmônica, por volta de 530 nm. Para a amostra controle, np-Au-cit, o máximo da banda plasmônica situa-se em 533 nm, enquanto para a amostra np-Au-PVAIE esse valor é de 525 nm. Embora relativamente pequeno, esse deslocamento para o azul indica que as np-Au-PVAIE estão mais individualizadas graças à estabilidade eletrostática oferecida pelo PVAIE adsorvido nas nanopartículas. Nota-se também que a absorbância das soluções, após a redução com citrato, são diferentes, sendo maior para a solução de np-Au-PVAIE. Aparentemente, a presença de PVAIE de alguma forma favorece a redução Au^{3+} para Au^0 , e com isso aumenta a taxa de formação de np-Au.⁷⁶

Na **Figura 5.2** são apresentadas fotografias digitais das misturas reacionais, antes e após a redução com citrato. Não há, aparentemente, qualquer diferença significativa devido à presença do polímero.

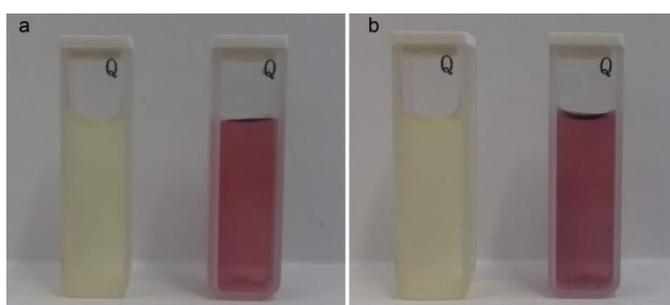


Figura 5.2 – Soluções antes da síntese e depois da síntese. (a) Solução de HAuCl_4 e solução sintetizada de np-Au. (b) Solução de HAuCl_4 com 500 μL de solução de PVAIE e solução sintetizada de np-Au e PVAIE

5.1.2 Morfologia e propriedades dos coloides

Na **Figura 5.3** são apresentadas imagens de MET obtidas para as amostras de np-Au-cit e np-Au-PVAIE-10, cujo 10 é a razão molar Au/PVAIE. As nanopartículas, em ambas as amostras, são aproximadamente esféricas, com diâmetro médio de 15 nm (np-Au-cit) e 12 nm (np-Au-PVAIE-10). Os diâmetros são muito próximos e compatíveis com os valores relatados no trabalho de Wang *et al.*⁸ e cujo procedimento foi adotado aqui. Em ambas as imagens, percebe-se que as partículas não formam agregados, independentemente do uso do PVAIE.⁷⁷

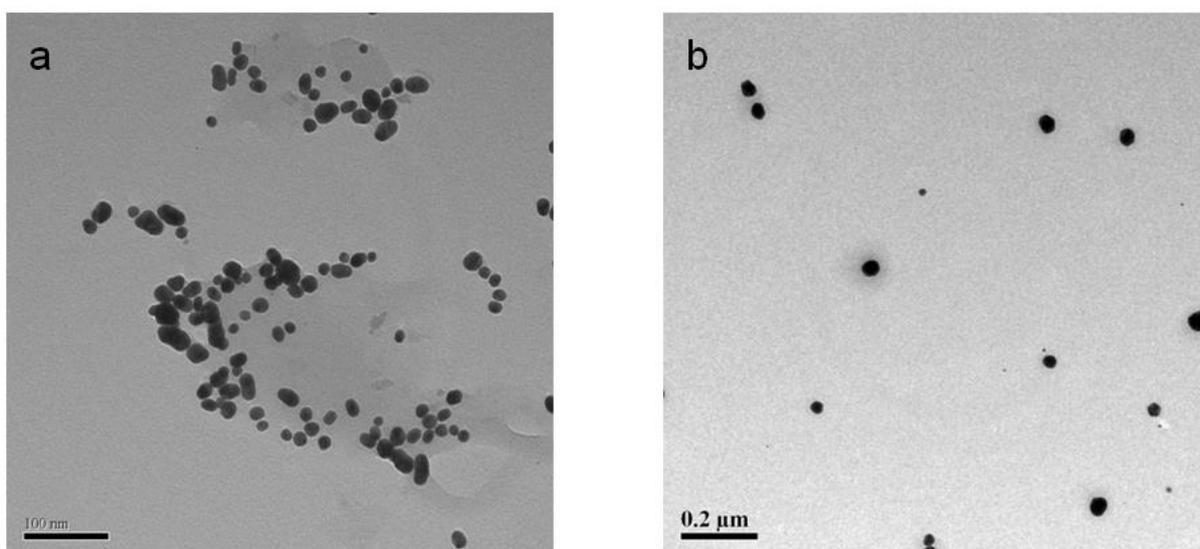


Figura 5.3 - Micrografias obtidas por MET das amostras np-Au-cit (a) e np-Au-PVAIE-10 (b).

Na **Tabela 5.1** são listados os valores do potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e diâmetro medido por MET. A primeira observação a ser feita é da variação do potencial zeta. Ainda que negativo, o potencial das np-Au-PVAIE-10, é muito inferior ao da np-Au-cit, sintetizada na ausência de PVAIE. Sendo inferior a $|30 \text{ mV}|$ esperava-se que fosse instável. No entanto, como a solução de np-

Au-PVAIE-10 é bastante estável, presume-se que a estabilização seja combinada, eletrostática e estérica. De fato, comparando-se os valores de DH e D_{MET} , verifica-se que apenas o valor de DH aumenta com introdução de PVAIE, enquanto D_{MET} permanece praticamente o mesmo. O DH é muito sensível à presença da cobertura sobre as nanopartículas e permite seguramente afirmar que as np-Au estão recobertas pelo PVAIE.

Tabela 5.1 - Potencial zeta (ζ), diâmetro hidrodinâmico (DH) e diâmetro estimado por MET (D_{MET}) dos coloides preparados.

Amostra	ζ (mV)	DH (nm)	D_{MET} (nm)
np-Au-cit	-37,7	18,3	15 ± 0,5
np-Au-PVAIE-5*	-32,7	57,5	-
np-Au-PVAIE-10*	-7,5	28,1	12 ± 0,5

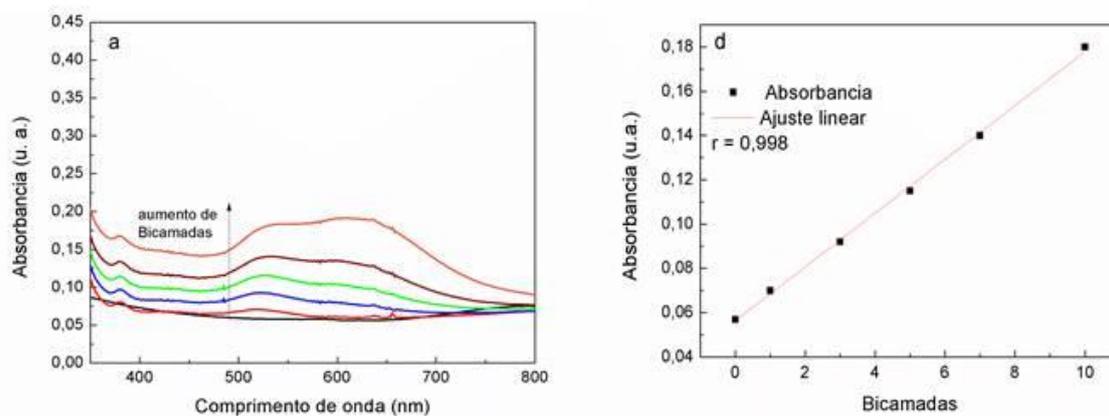
* 5 e 10 representam a razão molar Au/PVAIE

5.2 Filmes de np-Au-PVAIE e detecção de cisteína

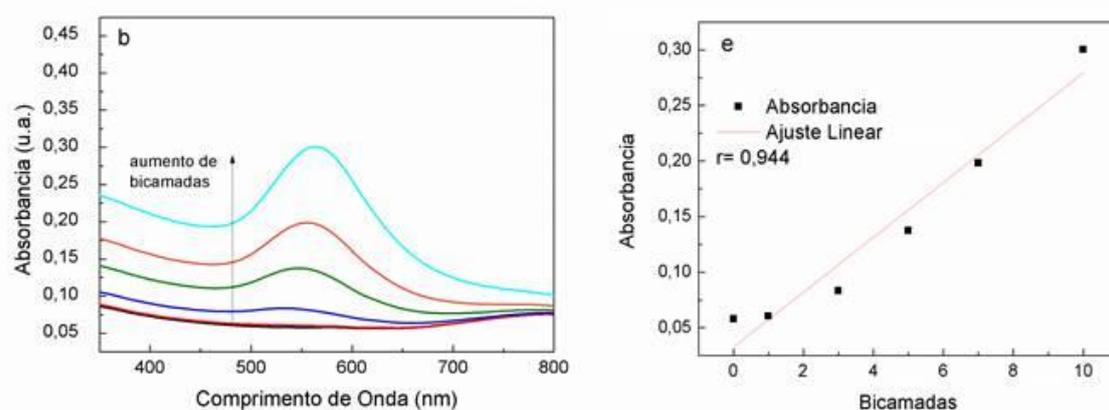
5.2.1. Deposição dos filmes

Os valores de potencial zeta determinados previamente permitiram definir as arquiteturas dos filmes a serem depositados, considerando-se que a adsorção fosse controlada por interação eletrostática entre os materiais. Sendo assim, foram investigadas três arquiteturas de filmes, a saber: filme-I (PVAIE/np-Au-cit) $_n$; filme-II (PVAIE/np-Au-PVAIE); filme-III (PDAC/np-Au-PVAIE) $_n$, com n variando de 1 até 10 bicamadas. A adsorção dos materiais foi monitorada por espectroscopia UV-vis e os resultados são apresentados na **Figura 5.4**.

Filme I - PVAIE / np-Au



Filme II - PVAIE / np-Au +PVAIE



Filme III - PDAC / np-Au +PVAIE

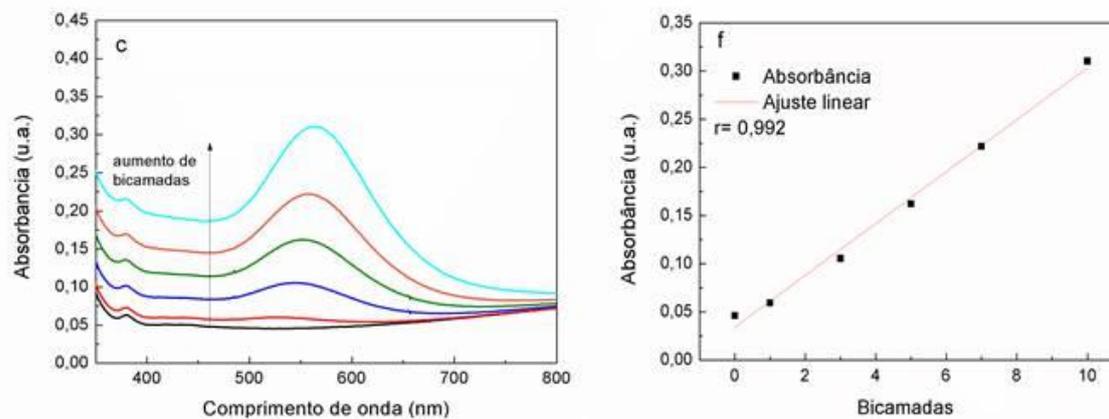


Figura 5.4 Espectros de absorção UV-vis obtidos na deposição do filme-I (a), filme-II (b) e filme-III (c). Os gráficos d, e, f representam a variação da absorbância máxima com o número de bicamadas depositadas dos filmes I, II e III respectivamente.

De um modo geral, observa-se adsorção em todos os sistemas, uma vez que a quantidade de material adsorvido aumenta proporcionalmente ao número de bicamadas (gráficos inseridos em cada conjunto de espectros). No filme-I, **Figura 5.4 a**, os espectros são alargados em relação ao espectro da solução de deposição de np-Au-cit (**ver Figura 5.4**). Isso mostra que há uma agregação maior das np-Au-cit no filme, o que leva à distorção do efeito SPR e consequente alargamento da banda. Já nas outras duas arquiteturas depositadas com np-Au-PVAIE, filme-II e filme-III (**Figura 5.4 b e Figura 5.4 c**), a banda plasmônica é muito similar àquela observada no espectro da solução de deposição de np-Au-PVAIE. O espectro mostra uma banda simétrica, com máximo localizado entre 520 nm e 560 nm. Embora o máximo de absorvância aumente proporcionalmente ao número de bicamadas, o que indica que as nanopartículas estejam gradativamente se agregando, é notável que a banda permaneça relativamente inalterada para um filme multicamadas. Portanto, as np-Au-PVAIE estão individualizadas nos filmes II e III, graças ao polímero PVAIE que impede a aproximação das nanopartículas. Ainda na **Figura 5.4**, nota-se que a quantidade de material adsorvido é maior nos filmes II e III, embora nos três tipos de filmes a quantidade de material adsorvido aumente linearmente com o número de bicamadas (**Figura 5.4 d, e, f**).⁵⁴

\

5.2.2. Comportamento Eletroquímico dos Filmes

O comportamento eletroquímico dos filmes I, II e III depositados sobre substrato de ITO foi investigado por VC em KCl ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) puro e com $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 mmol.L^{-1} em KCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$). Na **Figura 5.5** são apresentados os voltamogramas para os três tipos de filmes, $n= 10$ bicamadas, em KCl puro. Em KCl, os três filmes não mostram qualquer processo eletroquímico no intervalo de 0 V a +1,0 V. Esse resultado é importante, já que o valor do *onset* de oxidação da L-cisteína é +0,2-0,4 V dependendo do eletrólito suporte e pH. O pico que aparece nos voltamogramas dos três filmes, acima de +1,0 V, é atribuído à reação de evolução de O_2 . A repetição dos ciclos voltamétricos ocasiona um estreitamento da área dos ciclos, principalmente aquela compreendida entre 0 V e 1,0 V. Esse estreitamento tem sido atribuído à diminuição no tamanho das np-Au, ocasionado pela sucessão de reações de oxidação de Au(0) e dissolução do óxido formado (p. ex. $\text{Au}(\text{OH})_3$).⁷⁸ Entretanto, o pico de redução do óxido em +0,5 V não é observado no voltamograma de nenhum dos três filmes. Dessa forma, o estreitamento observado aqui está mais relacionado com a limpeza que a varredura do potencial promove, a qual elimina espécies adsorvidas durante a manipulação do filme. É importante destacar que o estreitamento se encerra após poucos ciclos de varredura do potencial, o que mostra que os filmes são eletroquimicamente estáveis.

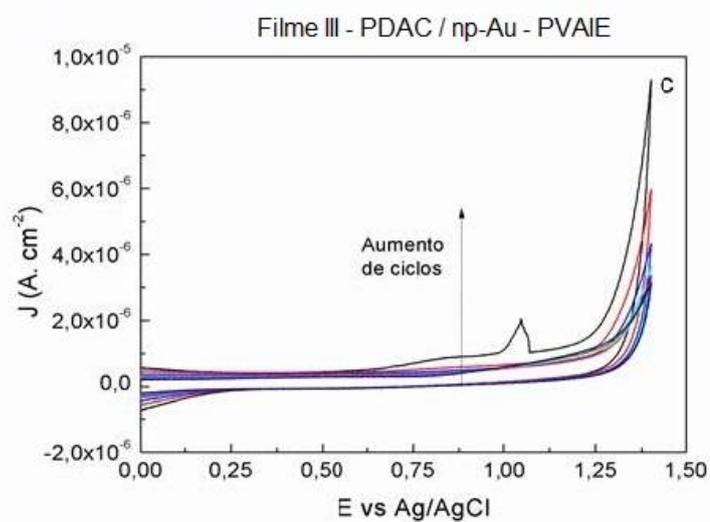
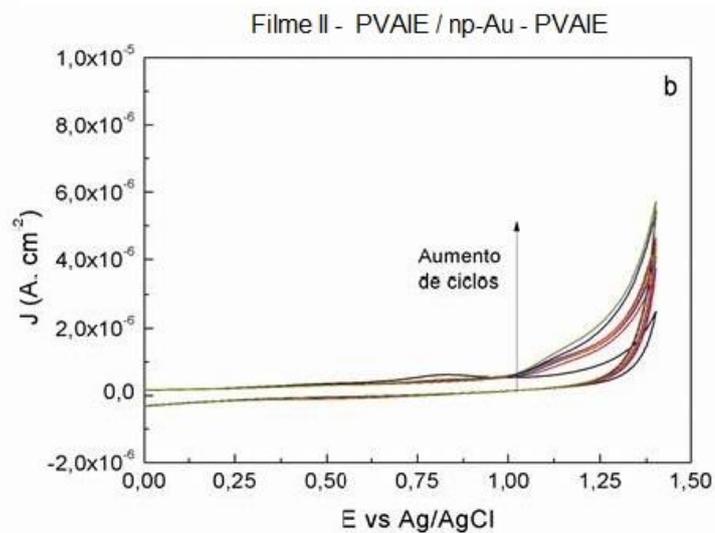
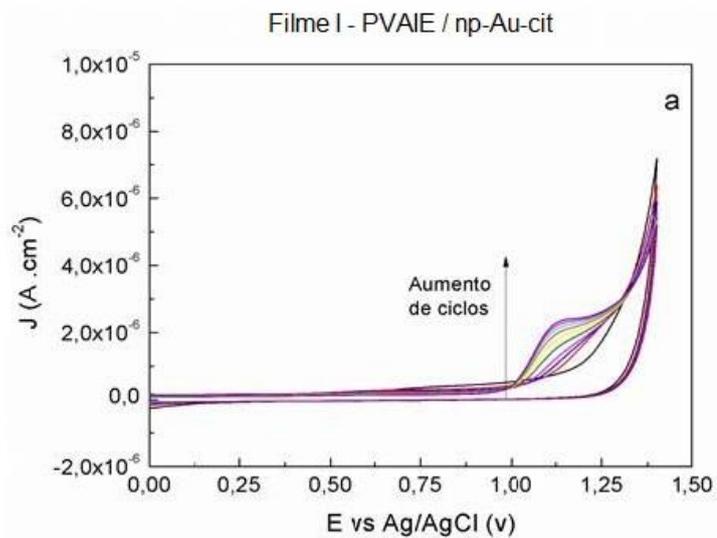
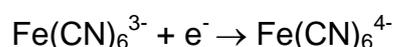


Figura 5.5. Voltamogramas obtidos em $\text{KCl } 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, 100 mV.s^{-1} , com o filme-I (a), filme-II (b) e filme-III (c).

O comportamento eletroquímico dos filmes foi avaliado na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ sob diferentes velocidades de varredura do potencial (v). O $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ tem uma reação quasi-reversível, tal qual:



cujo parâmetros cinéticos e termodinâmicos já são determinados com diferentes eletrodos e podem ser usados como referência para o estudo com novos eletrodos. Os voltamogramas e as respectivas curvas de J (anódico e catódico) *versus* $v^{1/2}$, são apresentados na **Figura 5.6** para os três diferentes filmes. Como pode ser observado nas **Figuras 5.6 a, b e c**, os três filmes são capazes de conduzir a reação redox de interesse. Além disso, as densidades de corrente obtidas para a oxidação (J_{pa}) e redução (J_{pc}) do par redox foram maiores com os filmes contendo np-Au, quer seja np-Au-cit ou np-Au-PVAIE, do que com o eletrodo de ITO sem filme (**ver Tabela 5.2**). Essa observação indica que as np-Au, presentes nos filmes, aumentam a densidade de corrente e, com isso, certamente a sensibilidade dos sensores a serem desenvolvidos. O aumento da densidade de corrente promovido por nanopartículas metálicas em eletrodos modificados é fato recorrente na literatura. Outros parâmetros eletroquímicos são também positivamente influenciados pela presença das nanopartículas. Na **Tabela 5.2** são apresentados os parâmetros eletroquímicos determinados a partir dos voltamogramas apresentados na **Figura 5.6**. No presente caso, verificamos que os filmes com np-Au influenciam positivamente a resposta frente ao par redox, em comparação ao eletrodo de ITO sem filme.

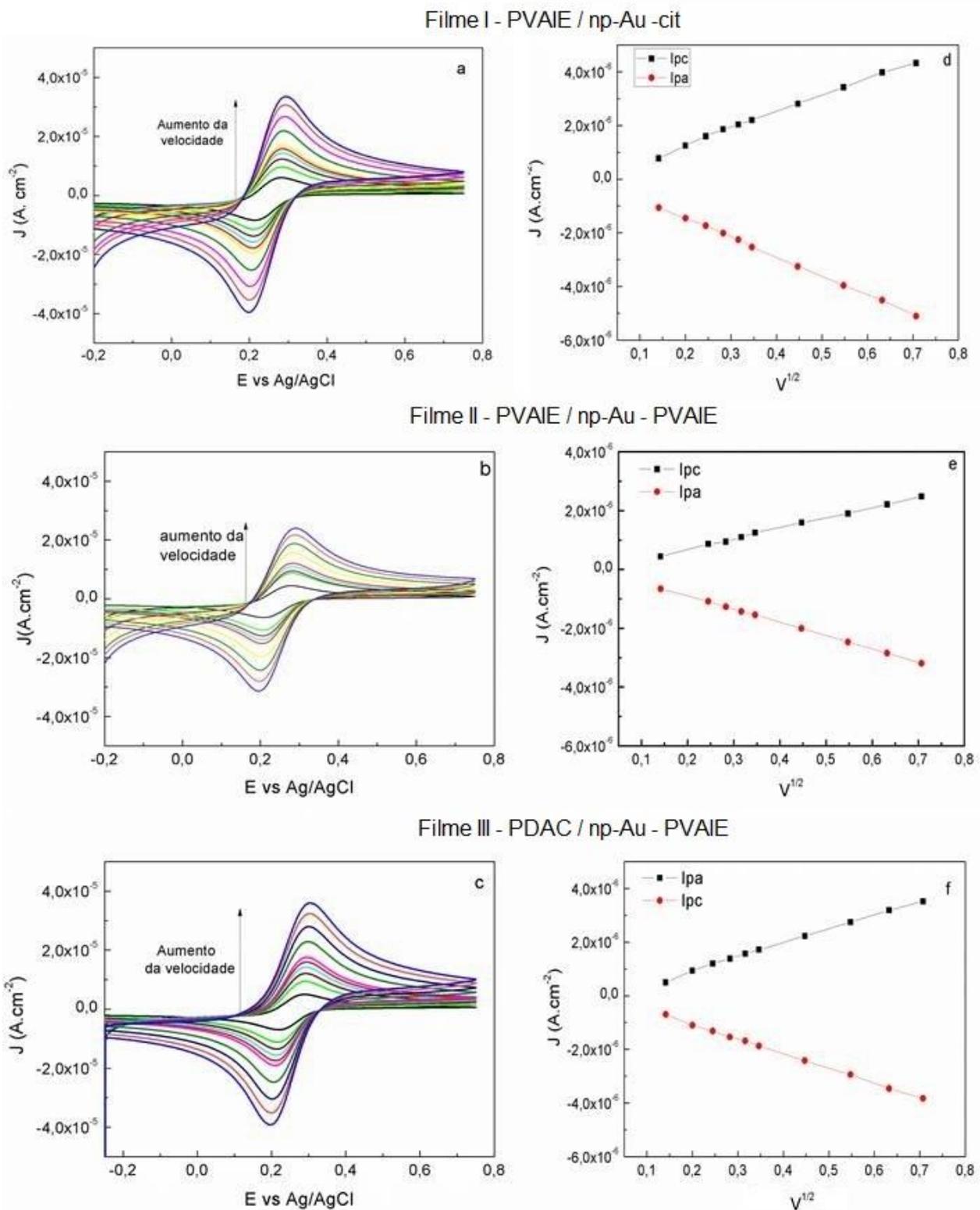


Figura 5.6 - Voltamogramas e curvas de J (anódico e catódico) versus $V^{1/2}$ obtidas em solução de $K_3Fe(CN)_6$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em KCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ com o filme-I (a e d), filme-II (b e e) e filme-III (c e f).

Tabela 5.2 - Parâmetros eletroquímicos para o filme I – PVAIE/np-Au-cit, filme II – PVAIE/np-Au-PVAIE e filme III – PDAC/np-Au-PVAIE e para o controle (ITO sem filme) determinados por voltametria cíclica em $K_3Fe(CN)_6$ 1 mmol.L⁻¹ em KCl 1,0 mol.L⁻¹. Valores determinados a $v = 60$

Amostra	ΔE_p (mV)	$E_{1/2}$ (mV)	J_{pa} (A.cm ⁻²)	k_{ap} (cm.s ⁻¹) [*]
ITO	58	$1,40 \times 10^{-6}$	$2,82 \times 10^{-6}$	0,450
filme-I	76	$1,27 \times 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-5}$	0,354
filme-II	78	$1,07 \times 10^{-5}$	$9,19 \times 10^{-6}$	0,269
filme-III	81	$1,29 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-5}$	0,236

* Cálculo baseado no método de Nicholson.^{79,80}

Outro ponto importante a ser observado é o comportamento quasi-reversível controlado por difusão do par redox sobre os filmes estudados atuando como eletrodos, da mesma forma que é observado com eletrodos tradicionais. Assumindo-se um comportamento quasi-reversível para o par $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, espera-se observar uma relação linear entre a densidade de corrente de pico (j_p) com a raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial ($v^{1/2}$) conforme previsto pela equação de Randles-Sevick modificada (o valor da área eletroativa está embutido na densidade de corrente):

$$j_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} D^{1/2} C v^{1/2}$$

onde j_p é a densidade de corrente de pico (A.cm⁻²), n é o número de mols de elétrons transferidos, D é o coeficiente de difusão do par redox ($7,6 \times 10^{-6}$ cm².s⁻¹), C é a concentração do par redox (1 mmol.L⁻¹) e v é a velocidade de varredura do potencial (mV.s⁻¹). Os gráficos das **Figuras 5.6 d, e e f** mostram

claramente uma dependência linear de j_p com $v^{1/2}$, o que confirma o comportamento quasi-reversível controlado por difusão.

Desse modo, conclui-se que os filmes com np-Au são promissores para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, haja visto que as np-Au proporcionam um aumento na taxa de transferência eletrônica e na densidade de corrente medidos.

5.2.3. Detecção de cisteína

A imobilização de np-Au na forma de filmes teve como objetivo principal aumentar a sensibilidade de um eletrodo frente à cisteína, numa combinação de quimiossorção da cisteína sobre as np-Au via ligação Au-S e aumento da condutividade da superfície do eletrodo. Na **Figura 5.7** são apresentados os voltamogramas obtidos com os diferentes filmes para cisteína em diferentes concentrações (2 mmol.L^{-1} a 8 mmol.L^{-1}), em NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Como se observa nesse estudo preliminar, a simples presença das np-Au (np-Au-cit ou np-Au-PVAIE) já mostra efeito significativo sobre a resposta do ITO puro (**Figura 5.7 a**). Com o ITO puro não se observa um pico definido de oxidação da cisteína, esperado em 300 mV. Este valor pode variar um pouco dependendo do eletrodo de trabalho utilizado e do eletrólito.⁷ Os voltamogramas, para o ITO, apresentam apenas a evolução de O_2 , caracterizada por uma barreira de potencial que se inicia em +0,4 V. Nesse caso, há um deslocamento de todo o voltamograma para maiores densidades de corrente com o aumento da concentração de cisteína. Já com os filmes de np-Au, a oxidação da cisteína é melhor observada, com correntes maiores e com picos melhor definidos.

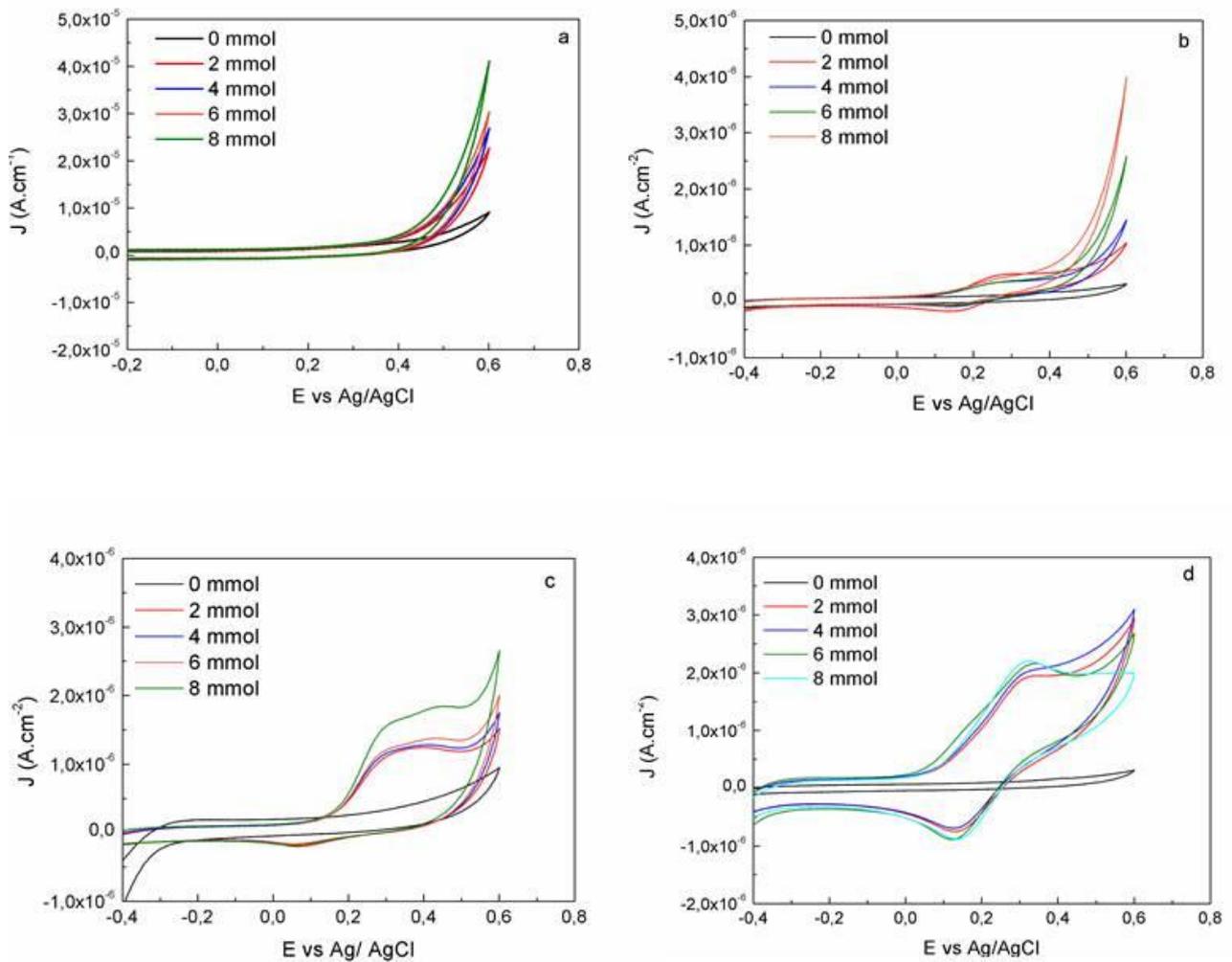


Figura 5.7 - Voltamogramas obtidos em cisteína em diferentes concentrações, $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ com os filmes controle (ITO sem filme) (a), filme I - (PVAIE/np-Au-cit) (b), filme II - (PVAIE/np-Au-PVAIE) (c) e filme III - (PDAC/np-Au-PVAIE) (d).

Os valores de corrente e potencial de pico, juntamente com os valores de *onset* da oxidação da cisteína conduzida com ITO puro e ITO modificado com os três tipos de filmes são apresentados na **Tabela 5.3**. Comparando-se os voltamogramas e os dados da **Tabela 5.3** pode-se concluir que o filme-III é o que melhor responde à cisteína, em termos de densidade de corrente de pico (maior) e menor valor do *onset* da oxidação. Para os experimentos conduzidos com os filmes I, II e III, há uma dependência linear de j_{pa} com a concentração de cisteína na faixa investigada.

Tabela 5.3 - Parâmetros eletroquímicos obtidos para a oxidação-redução da cisteína por VC a 100 mV.s^{-1} com filmes de np-Au.

Amostra	$J_{pa}(\text{A.cm}^{-2})$	$E_{pa} \text{ (mV)}$	Onset(mV)
Filme-I	$3,3 \times 10^{-7}$	+262	+73
Filme-II	$1,2 \times 10^{-6}$	+292	+105
Filme-III	$2,2 \times 10^{-6}$	+338	-19

- filme I - (PVAIE/np-Au-cit), filme II - (PVAIE/np-Au-PVAIE) e filme III - (PDAC/np-Au-PVAIE).

Os valores de sensibilidade, expressos em $\text{A} \cdot (\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cm}^2)^{-1}$, obtidos a partir do ajuste linear dos dados de VC foram: 0,95 filme-I, 0,87 filme-II, 0,96 filme-III.^{81,82}

5.3 Síntese fotoquímica de np-Au-PEI

5.3.1 Propriedades ópticas/Espectroscopia UV-vis das soluções

A caracterização das amostras foi realizada primeiramente por espectroscopia de absorção UV-vis e os resultados são apresentados na **Figura 5.8**. Na **Figura 5.8**, são apresentados os espectros das soluções de partida, antes e depois do tratamento com luz UV por 30 min. Nota-se que a solução de PEI pura não absorve na faixa de comprimento de onda investigado, enquanto a solução de HAuCl_4 absorve em 294 nm (transição ligante-metal do íon AuCl_4^-). Quando PEI é misturado ao HAuCl_4 , a banda referente à absorção do íon AuCl_4^- dá lugar a uma banda larga cuja absorbância diminui com o aumento da razão PEI/Au. No espectro da mistura com maior razão PEI/Au, a absorbância em 294 nm chega ao mínimo enquanto uma nova banda bem definida aparece em 349 nm. Essa banda é atribuída à complexação de Au^{3+} com os grupos amino do PEI. Na **Figura 5.8b** são apresentados os espectros das misturas de HAuCl_4 + PEI, após o tratamento com luz UV por 30 min. Os espectros confirmam a formação de np-Au-PEI com uma banda plasmônica típica, centrada entre 523 e 530 nm. Os espectros são bastante simétricos, o que revela que as np-Au-PEI são individualizadas por conta do revestimento de PEI. A quantidade formada de np-Au-PEI parece aumentar com o aumento da razão PEI/Au na solução de partida. Além disso, o mesmo tratamento com luz UV da solução controle (solução aquosa de HAuCl_4 sem o polímero PEI) não foi capaz de produzir np-Au. Será visto mais adiante que o polímero PEI é capaz de conduzir sozinho a formação das np-Au-PEI sob luz ambiente, embora nessa condição sejam necessárias mais de 5h de reação para a obtenção de uma concentração mínima de nanopartículas.

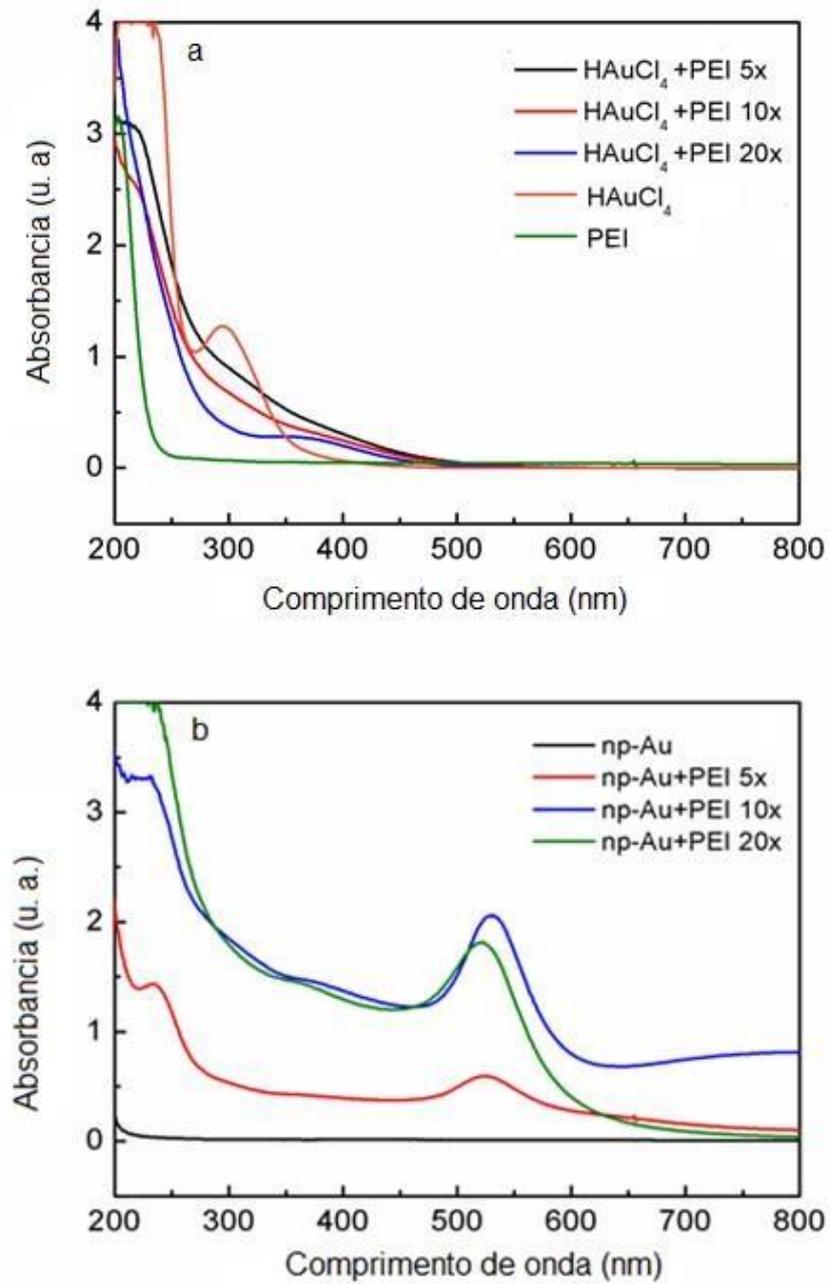


Figura 5.8 - Espectros UV-vis das soluções puras e das misturas (a) antes e (b) depois do tratamento com luz UV.

Na Figura 5.9 são apresentadas fotografias digitais das misturas reacionais, antes e após tratamento com luz UV por 30 min. Como pode ser observado, o tratamento com luz UV leva à formação de soluções de cor roxa, similares àquelas obtidas via síntese química.

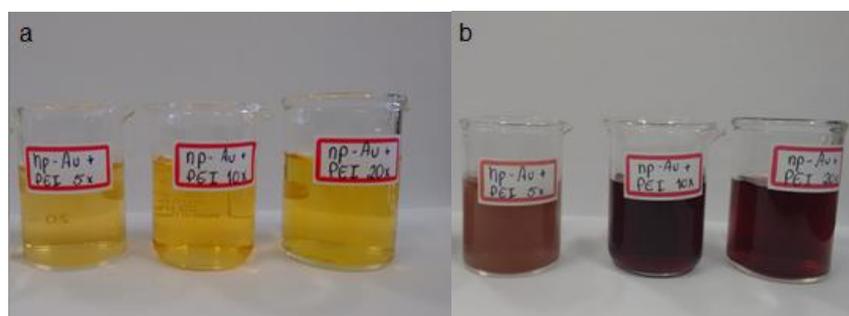


Figura 5.9 – Solução pura de HAuCl_4 e as misturas de HAuCl_4 e PEI antes da redução (a). Solução de np-Au pura e as misturas de np-Au e PEI depois da redução (b).

A cinética de formação das np-Au-PEI foi acompanhada por espectroscopia UV-vis. O experimento foi conduzido com a mistura reacional HAuCl_4 +PEI 10x, sob tratamento com luz UV e luz ambiente. Essa foi escolhida por ser a composição intermediária, com a qual já se observou a formação de nanopartículas. Os espectros UV-vis e a variação da absorbância com o tempo de reação, luz ambiente e UV, são apresentados na Figura 5.10.

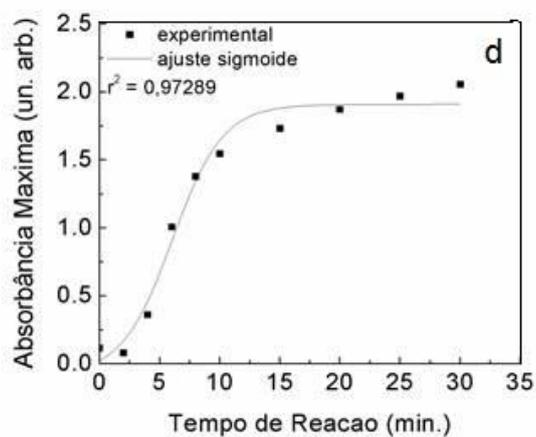
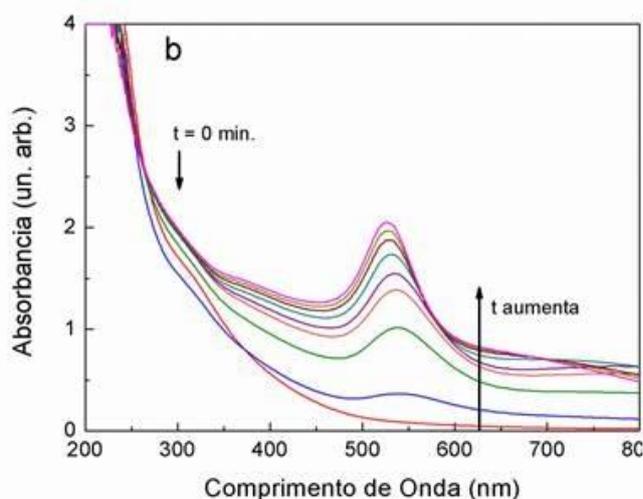
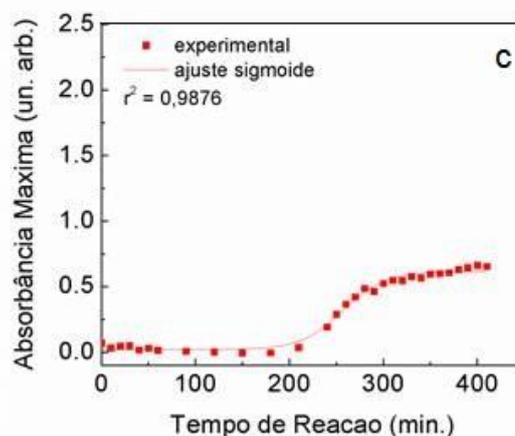
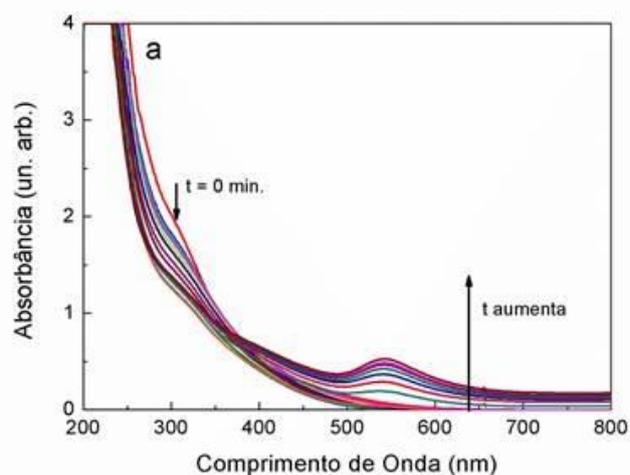


Figura 5.10 - Espectros de absorção UV-vis da mistura HAuCl₄ + PEI-10x obtidos em diferentes tempos de reação conduzida sob luz ambiente (a) e UV (b). Gráfico da formação de nanopartículas por sua absorbância máxima em função do tempo, em luz ambiente (c) e em luz UV (d).

De uma forma geral o que se observa é que em ambas as condições, luz ambiente ou UV, as np-Au-PEI são formadas. Dessa forma, podemos concluir primeiramente que o polímero PEI é capaz de conduzir a reação de redução do precursor, HAuCl_4 , até a formação das nanopartículas. Entretanto, nota-se que sob luz ambiente (**Figura 5.10a**) a cinética é mais lenta e a quantidade de np-Au-PEI formada é bem menor quando comparados àquelas formadas sob luz UV (**Figura 5.10b**). Enquanto são necessários 300 min para a reação atingir o equilíbrio sob luz ambiente, apenas 10 min. são suficientes para a síntese sob luz UV. Logo, o efeito da luz UV é evidente. De qualquer forma, o insucesso na tentativa de síntese com luz UV na ausência do polímero PEI também indica que a participação do polímero na síntese das np-Au-PEI é fundamental.

A forma da curva sigmoidal é referente ao processo auto-catalítico, observada na síntese de nanopartículas metálicas. O processo se inicia com um período de indução (t_0) durante o qual a absorção da partícula é desprezível. A absorção da espécie originária Au^{+3} diminui de acordo com o aumento do tempo, no qual em $t = 0$ o período de indução corresponde à nucleação inicial das partículas.⁶⁶ Assim, a quantidade de nanopartículas formadas é diretamente proporcional ao tempo de reação. É possível observar também pela curva sigmoidal que a quantidade de nanopartículas formadas é diretamente proporcional ao efeito da luz UV sobre o polímero efetivando a redução das espécies.

5.3.2 Morfologia e propriedades coloidais

As propriedades coloidais das np-Au-PEI juntamente com o diâmetro obtido por MET (D_{MET}) são apresentados na **Tabela 5.4**. A primeira observação a ser feita é que todas as amostras exibem potencial zeta positivo. No entanto, esse valor diminui com o aumento da razão PEI/Au. O potencial positivo se deve à protonação dos grupo amino no PEI pelo $HAuCl_4$. À medida que a razão PEI/Au aumenta, também aumenta o número de grupos amino que disputam pelos prótons disponíveis em solução e, por isso, há redução do potencial zeta. O valor de D.H. também diminui com o aumento da razão PEI/Au. À medida que a razão PEI/Au aumenta, o número de cadeias de PEI na forma neutra (não-protonada) também aumenta. Na forma neutra, as cadeias podem se enovelar e então ocupar um volume hidrodinâmico menor que aquele ocupado na forma ionizada (protonada).

Tabela 5. 4 – Proriedades coloidais e D_{MET} das misturas np-Au e PEI.

Amostra	ζ (mV)	D. H. (nm)^a	D_{MET} (nm)^b
np-Au-PEI-05	+ 39,7	109,3	35,6 ± 1,5
np-Au-PEI-10	+ 26,0	55,5	12,9 ± 0,4
np-Au-PEI-20	+ 22,1	29,0	8,6 ± 0,3

Na **Figura 5.11** são apresentadas as imagens de MET e as curvas de distribuição de tamanhos das amostras np-Au-PEI preparadas com diferentes razões PEI/Au. Como pode ser observado, em todas as condições há a formação de nanopartículas esféricas. Entretanto, na menor razão PEI/Au, a amostra é heterogênea, com pequenas nanopartículas esféricas e placas de extensão micrométrica, na forma de hexágonos e triângulos (**Figura 5.11a**). Tal heterogeneidade se reflete na curva de distribuição de tamanhos (**Figura 5.11d**), típica de uma amostra polidispersa. Já as amostras np-Au-PEI-10 (**Figura 5.11b**) e np-Au-PEI-20 (**Figura 5.11c**) são formadas exclusivamente por nanopartículas esféricas. As respectivas curvas de distribuição são mais estreitas. Nota-se, conforme listado na **Tabela 5.4**, que o diâmetro médio das np-Au-PEI diminui com o aumento da razão PEI/Au.

Como foi verificado que PEI e Au^{3+} se complexam, os grupos amino do PEI servem de sítio de nucleação para a formação das nanopartículas. Sendo assim, quanto maior a razão PEI/Au empregada, maior deve ser a taxa de nucleação e, certamente, nanopartículas de tamanho menor serão produzidas. Por sua vez, quando essa razão diminui, a taxa de crescimento aumenta, de modo que poucos núcleos são formados e as partículas formadas são maiores.

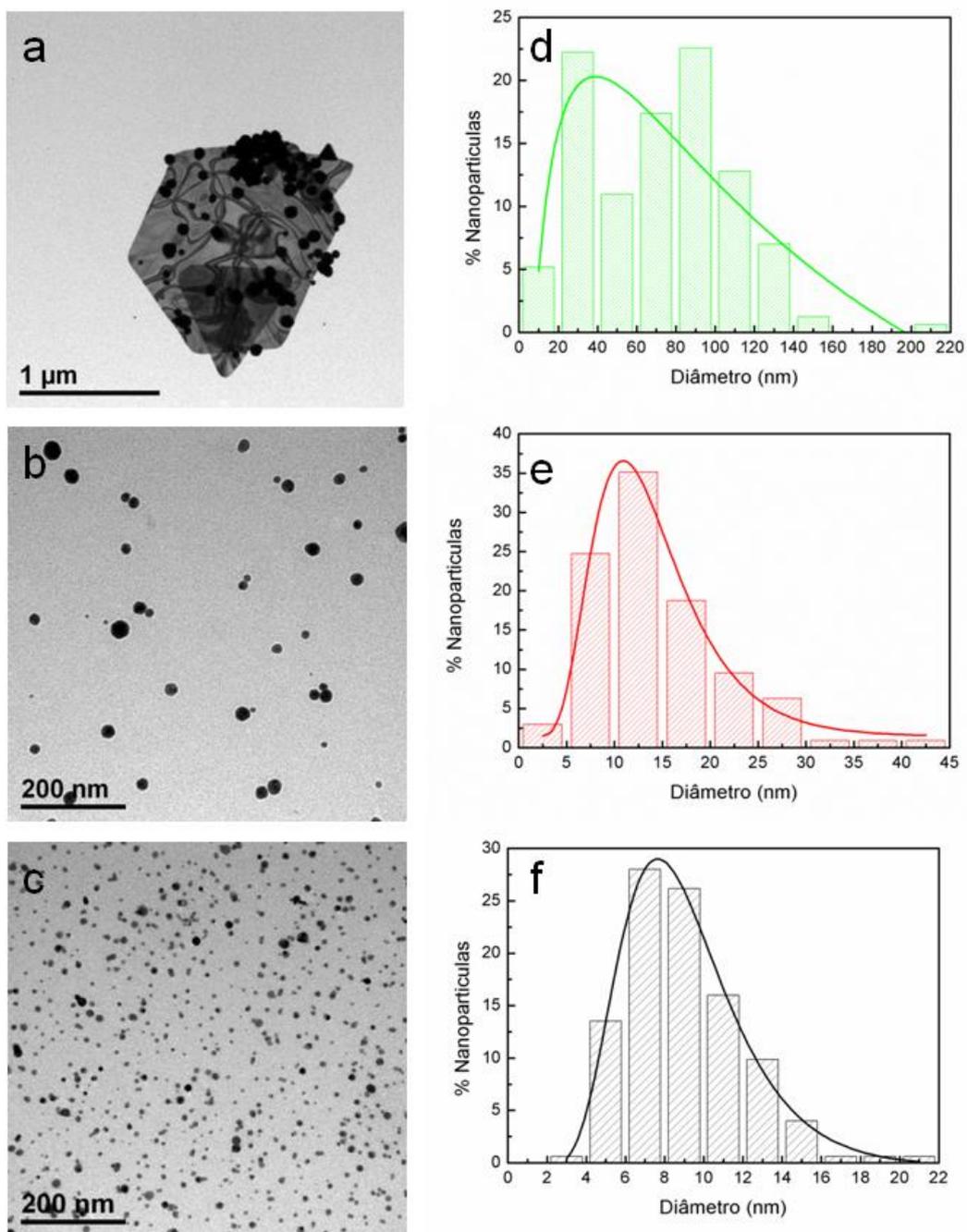


Figura 5.11 - Imagens de MET e curva de distribuição de tamanhos das amostras np-Au-PEI-05 (a,d), np-Au-PEI-10 (b,e) e np-Au-PEI-20 (c,f).

O processo de nucleação pode ser observado pelos resultados obtidos na voltametria cíclica das soluções (**Figura 5.12**), realizada para verificar a oxidação das espécies de Au.

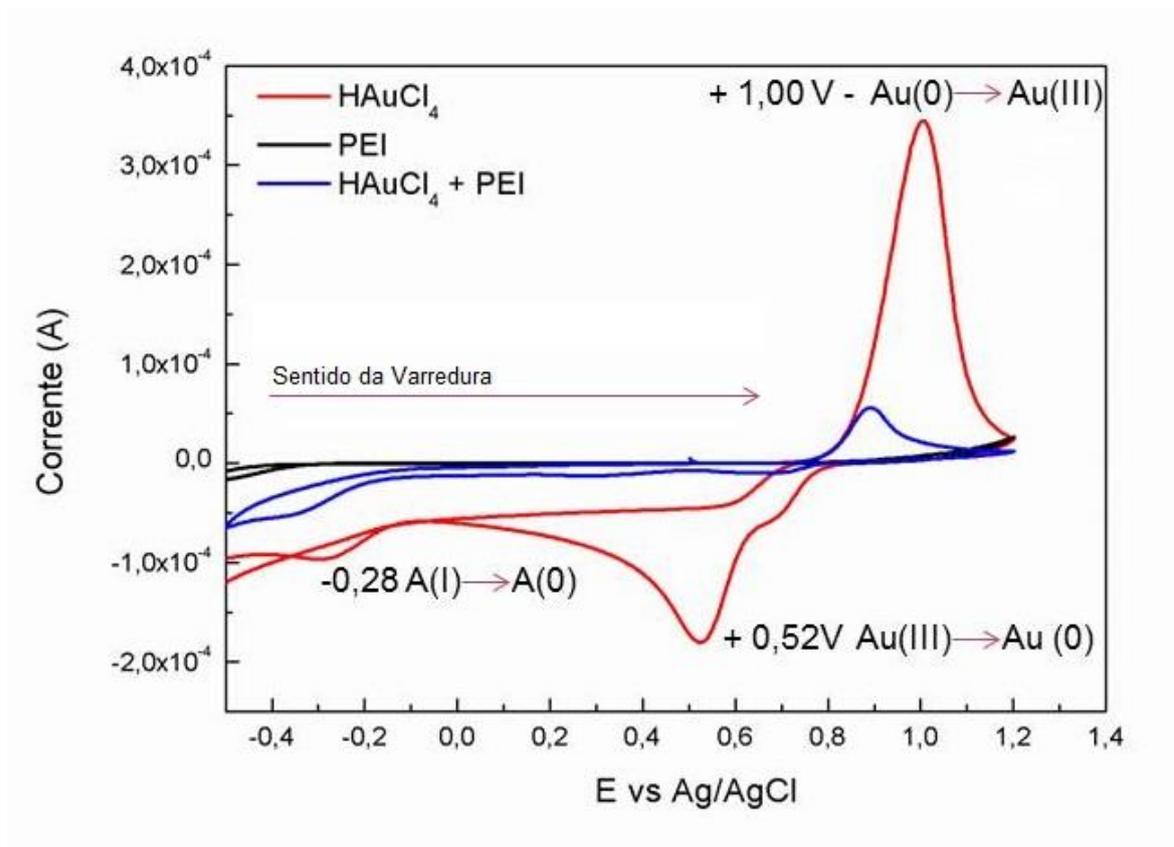


Figura 5.12 – Voltametria cíclica das soluções de HAuCl_4 ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$), PEI (1 g.mol^{-1}) e a mistura das soluções na razão molar PEI / Au 10:1, a velocidade de 50 mV.

Para o procedimento utilizou-se o ITO como eletrodo de trabalho, e as soluções de HAuCl_4 ($6,0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$), PEI (1 g.mol^{-1}) e a mistura entre as duas soluções (PEI - HAuCl_4), como eletrólitos. Na mistura (PEI - HAuCl_4) foi possível verificar que o PEI inibe a oxidação e redução das espécies de Au, observado pela diminuição da corrente e dos eventos característicos da oxidação e redução do Au, isto porque no PEI não é possível observar nenhuma redução ou oxidação nos potenciais relativos aos eventos de oxirredução do Au, ou seja, o PEI não é capaz de por si só, reduzir o ouro, entretanto, interage de forma significativa como

o HAuCl₄. Este resultado é reproduzido de dados recorrentes na literatura, Scaravelli,⁶⁶ mostra tais resultados no estudo de síntese direta de nanopartículas na presença de polímeros com grupos aminados, cuja redução do ouro ocorre no potencial de 0,72 V e a oxidação no potencial de 1,4. Potenciais estes bem próximos aos descritos neste trabalho averiguando que os resultados estão de acordo com dados da literatura.

O mecanismo de reação (**Figura 5.13**) é proposto segundo o mecanismo de Sakamoto.⁸³ Os grupos doadores de e⁻, como os grupos aminados no PEI, participam do processo de nucleação das espécies excitadas do ácido cloroáurico [Au³⁺Cl₄⁻], nas quais, foram excitadas pela absorção dos fótons da luz UV. Os fótons incidentes da luz reduzem as espécies de ouro, de Au⁺³ para Au⁺². Porém, esta última espécie é muito instável e se reduz rapidamente para Au⁺. Uma vez que o meio contém elétrons livres, a espécie Au⁺ adquire um elétron reduzindo a Au⁰. Observa-se também na **Figura 5.13** que a reação PEI – HAuCl₄ é uma reação ácido –base, no qual o PEI se comporta como uma base de Lewis.

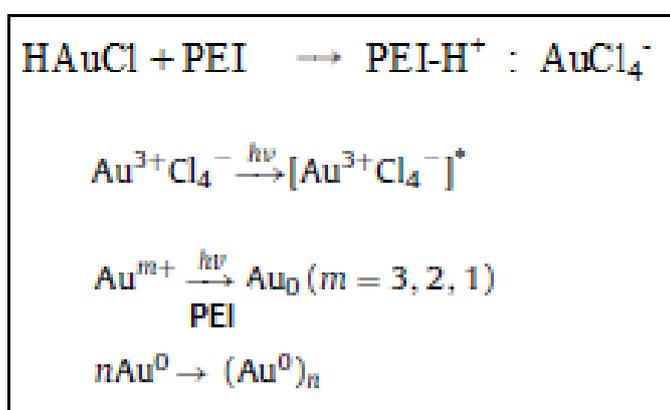


Figura 5.13 – Mecanismo de reação para a redução do ácido cloroáurico, na presença do PEI.

5.3.3 Viabilidade Celular

Os tratamentos com as nanopartículas de ouro cobertas com PEI nas concentrações 12.5, 25, 50, 100 e 200 µg de Au por mililitro, apresentaram efeito significativo sobre a viabilidade das células normais e tumorais (**Figura 5.14**).

Pôde-se observar que em ambas (**Figura 5.14 a e b**) as células estudadas a citotoxicidade deu-se de forma concentração-dependente. Ou seja, quanto maior a concentração de np-Au-PEI 5, 10 e 20 as quais as células foram expostas, maior a redução da viabilidade.

Após tratamento com as diferentes formulações de nanopartículas, com concentrações crescentes de PEI, ambas as células apresentaram padrões de viabilidade semelhantes, não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa entre as três formulações. Ainda que estatisticamente não significativa, o aumento gradual da concentração do polímero PEI nas formulações parece favorecer a manutenção da viabilidade, uma vez que a viabilidade na linhagem MCF-7 é levemente aumentada na concentração de 50 µg/ml, com os seguintes valores de viabilidade $55,7 \% \pm 6,9$, $71,2 \% \pm 6,4$, $79,1 \% \pm 3,4$ para np-Au-PEI 5x, np-Au-PEI 10x e np-Au-PEI 20x, respectivamente (**Figura 5.14 b**). Este comportamento é atribuído ao PEI, o qual é biocompatível, e forma a camada de proteção para np-Au. O revestimento de PEI assegura maior citocompatibilidade de np-Au, que não afeta significativamente a viabilidade de células normais. Portanto, estas partículas poderiam ser exploradas para muitas aplicações biológicas, tais como a entrega de drogas ⁸⁴ e terapia fototérmica contra células tumorais.

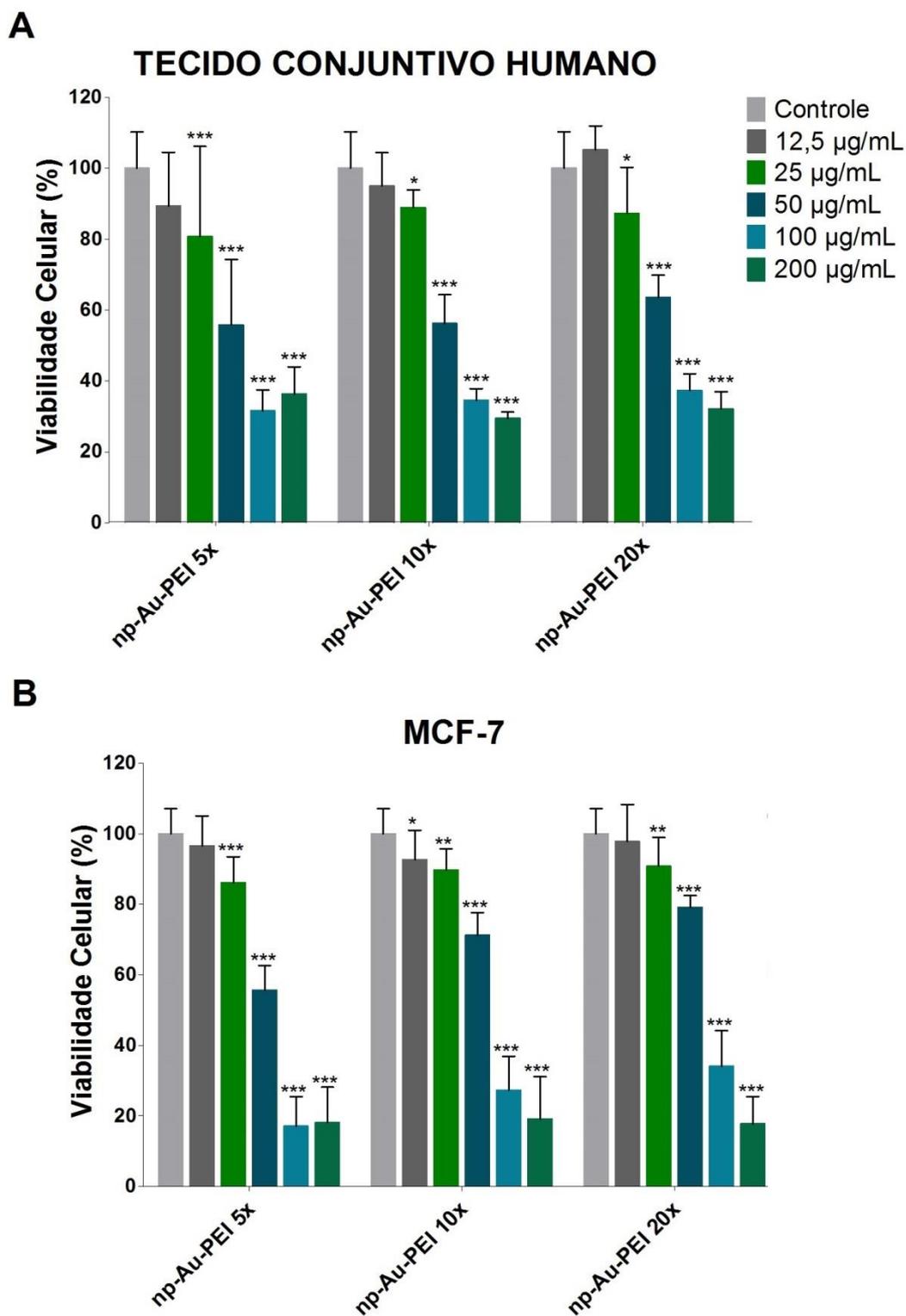


Figura 5.14 Viabilidade celular de tecido conjuntivo humano e adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) após tratamento com np-Au-PEI por 72 horas. Células normais (A) e tumorais (B) tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de ouro cobertas com PEI, como indicado. Os dados são apresentados como porcentagem de células viáveis \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes. * Estatisticamente significante, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$.

6. CONCLUSÕES

Nanopartículas esféricas de ouro podem ser produzidas na presença de polímeros estabilizantes, tanto por método químico quanto fotoquímico, na forma de soluções coloidais estáveis. O tamanho e distribuição de tamanhos dependem da concentração de polímero empregado.

As nanopartículas de ouro sintetizadas na presença do hidrocloreto de poli(1-vinil-3-N-carboximetil imidazólio), np-Au-PVAIE, apresentam diâmetro de 12-15 nm e potencial zeta ligeiramente negativo devido ao pareamento iônico entre as moléculas de citrato e o cátion imidazólio do polímero. Quando depositadas na forma de filmes ultrafinos, as np-Au-PVAIE mantêm estrutura individualizada, graças à cobertura do polímero. Os filmes mostram resposta eletroquímica melhor que do eletrodo sem filme, tanto para caracterização do par redox ferri/ferrocianeto quanto para oxidação da cisteína.

As nanopartículas sintetizadas via fotoquímica da presença de poli(etileno imina), np-Au-PEI, apresentam diâmetros médios variando entre 35,6 nm e 8,6 nm e potencial zeta positivo, dependendo da concentração utilizada de PEI. As np-Au-PEI podem ser obtidas sob luz ambiente, apenas pela ação redutora dos grupos amino do PEI. No entanto, nessa condição são necessárias cerca de 5h de reação. Por outro lado, a luz UV acelera o processo que pode ser concluído num intervalo de 10 minutos. As np-Au-PEI não apresentam toxicidade quando avaliadas em ensaio de viabilidade celular com células de adenocarcinoma da mama humano e células do tecido conjuntivo humano normais.

7. TRABALHOS FUTUROS

i) Desenvolvimento de método analítico para detecção de cisteína.

Empregar voltametria de pulso diferencial e/ou amperometria para calibração e determinação de cisteína em amostras reais com os filmes de nanopartículas.

ii) Síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro na presença de outros polímeros. Empregar polímeros de interesse biomédico, de diferentes massas molares, para a síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro. Avaliar o efeito da massa molar e do tipo de polímero sobre a estrutura e propriedades das nanopartículas obtidas.

iii) Aplicação das nanopartículas de ouro em terapia fototérmica.

Desenvolver formulações de nanopartículas com polímeros biocompatíveis, avaliar viabilidade celular e testar procedimento de terapia com sistemas modelo.

8. REFERÊNCIAS

1. Daniel, M. C. & Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **104**, 293–346 (2004).
2. Alfaya, A. A. S. & Kubota, L. T. a Utilização De Materiais Obtidos Pelo Processo De Sol-Gel Na Construção De Biossensores. *Quim. Nova* **25**, 835–841 (2002).
3. Zarbin, A. J. G. Química de (Nano)materiais. *Quim. Nova* **30**, 1469–1479 (2007).
4. Wan, C. H., Jheng, Y. & Lin, M. T. Mitigating methanol crossover using Pt-Ru catalyst coated on commercial membrane of ethanesulfonyl fluoride through layer-by-layer technique. *Thin Solid Films* **544**, 13–18 (2013).
5. Mirmoghtadaie, L., Ensafi, A. A., Kadivar, M. & Shahedi, M. Highly Selective , Sensitive and Fast Determination of Folic Acid in Food Samples Using New Electrodeposited Gold Nanoparticles by Differential Pulse Voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 3755–3767 (2013).
6. Addison, C. J. & Brolo, A. G. Nanoparticle-containing structures as a substrate for surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir* **22**, 8696–8702 (2006).
7. Arrigan, D. W. M. & Bihan, L. Le. A study of L-cysteine adsorption on gold via electrochemical desorption and copper(II) ion complexation. *Analyst* **124**, 1645–1649 (1999).
8. Wang, F., Liu, X., Lu, C.-H. & Willner, I. Cysteine-Mediated Aggregation of Au Nanoparticles: The Development of a H₂O₂ Sensor and Oxidase-Based Biosensors. *ACS Nano* **7**, 7278–7286 (2013).
9. Kato, M. *et al.* L-Cysteine As a Regulator for Arsenic-Mediated Cancer-Promoting and Anti-Cancer Effects. *Toxicol. Vitr.* **25**, 623–629 (2011).
10. Chen, S. *et al.* Combined detection of breast cancer biomarkers based on plasmonic sensor of gold nanorods. *Sensors Actuators B Chem.* **221**, 1391–1397 (2015).

11. Kuo, W.-S. *et al.* Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials* **33**, 3270–3278 (2012).
12. Hu, X., Wang, T. & Dong, S. Thermal annealing of Au nanorod self-assembled nanostructured materials: Morphology and optical properties. *J. Colloid Interface Sci.* **316**, 947–953 (2007).
13. Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17–R71 (2007).
14. Corredor, C., Borysiak, M. D., Wolfer, J., Westerhoff, P. & Posner, J. D. Colorimetric Detection of Catalytic Reactivity of Nanoparticles in Complex Matrices. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 3611–3618 (2015).
15. Santos, J. G. M. *et al.* Iron Oxide Nanostructured Electrodes for Detection of Copper (II) Ions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14**, 1–10 (2014).
16. Dong, S.-A. & Zhou, S.-P. Photochemical synthesis of colloidal gold nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. B* **140**, 153–159 (2007).
17. Noguez, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. *J. Phys. Chem. C* **111**, 3806–3819 (2007).
18. Hutter, E. & Fendler, J. H. Exploitation of localized surface plasmon resonance. *Adv. Mater.* **16**, 1685–1706 (2004).
19. Toma, H. E., Zamarion, V. M., Toma, S. H. & Araki, K. The Coordination Chemistry at Gold Nanoparticles. *J. Braz. Chem. Soc.* **21**, 1158–1176 (2010).
20. Uechi, I. & Yamada, S. Photochemical and analytical applications of gold nanoparticles and nanorods utilizing surface plasmon resonance. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2411–2421 (2008).
21. Li, F. *et al.* Ultrasensitive and selective detection of copper (II) and mercury (II) ions by dye-coded silver nanoparticle-based SERS probes. *Biosens. Bioelectron.* **39**, 82–87 (2013).
22. Smith, B. L. & Hutchison, J. E. Transformations during Sintering of Small (D. *J. Phys. Chem. C* **117**, 25127–25137 (2013).
23. Omidfar, K., Khorsand, F. & Darziani Azizi, M. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. *Biosens. Bioelectron.* **43**, 336–347 (2013).

24. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hiller, J. a Study of the Nucleation and Growth Processes I N the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
25. Wang, J., Bian, C., Tong, J., Sun, J. & Xia, S. L-Aspartic acid/L-cysteine/gold nanoparticle modified microelectrode for simultaneous detection of copper and lead. *Thin Solid Films* **520**, 6658–6663 (2012).
26. Kuo, P. L., Chen, C. C. & Jao, M. W. Effects of polymer micelles of alkylated polyethylenimines on generation of gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **109**, 9445–9450 (2005).
27. Ryu, H. J., Sanchez, L., Keul, H. a., Raj, A. & Bockstaller, M. R. Imidazolium-based ionic liquids as efficient shape-regulating solvents for the synthesis of gold nanorods. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 7639–7643 (2008).
28. Isaeva, E. I., Kiryukhina, S. N. & Gorbunova, V. V. Photochemical synthesis of silver and gold nanoparticles in polyhydric alcohols. *Russ. J. Gen. Chem.* **83**, 619–623 (2013).
29. Pal, A. Photochemical synthesis of gold nanoparticles via controlled nucleation using a bioactive molecule. *Mater. Lett.* **58**, 529–534 (2004).
30. Marin, M. L., McGilvray, K. L. & Scaiano, J. C. Photochemical strategies for the synthesis of gold nanoparticles from Au(III) and Au(I) using photoinduced free radical generation. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16572–16584 (2008).
31. Wang, L. *et al.* Photochemical synthesis and self-assembly of gold nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **312**, 148–153 (2008).
32. Huang, W. C. & Chen, Y. C. Photochemical synthesis of polygonal gold nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **10**, 697–702 (2008).
33. Boufi, S., Vilar, M. R., Ferraria, A. M. & Botelho do Rego, A. M. In situ photochemical generation of silver and gold nanoparticles on chitosan. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **439**, 151–158 (2013).
34. Hamaguchi, K., Kawasaki, H. & Arakawa, R. Photochemical synthesis of glycine-stabilized gold nanoparticles and its heavy-metal-induced aggregation behavior. *Colloids Surfaces A ...* **367**, 167–173 (2010).

35. Walden, P. et al. Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bull. Acad. Imper. Sci. (St. Petersburg)* **8**, 405–422 (1914).
36. Dupont, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.* **15**, 341–350 (2004).
37. Giernoth, R., Brühl, A., Brehm, M. & Lingscheid, Y. Interactions in ionic liquids probed by in situ NMR spectroscopy. *J. Mol. Liq.* **192**, 55–58 (2013).
38. Yuan, J. & Antonietti, M. Poly(ionic liquid)s: Polymers expanding classical property profiles. *Polymer (Guildf)*. **52**, 1469–1482 (2011).
39. Dupont, J. From molten salts to ionic liquids: A ‘nano’ journey. *Acc. Chem. Res.* **44**, 1223–1231 (2011).
40. Dupont, J. & Scholten, J. D. On the structural and surface properties of transition-metal nanoparticles in ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1780–1804 (2010).
41. Mecerreyes, D. Polymeric ionic liquids: Broadening the properties and applications of polyelectrolytes. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 1629–1648 (2011).
42. Prabhu Charan, K. T. et al. Poly(ionic liquids) as ‘smart’ stabilizers for metal nanoparticles. *Eur. Polym. J.* **60**, 114–122 (2014).
43. Lee, S., Cummins, M. D., Willing, G. a. & Firestone, M. a. Conductivity of ionic liquid-derived polymers with internal gold nanoparticle conduits. *J. Mater. Chem.* **19**, 8092 (2009).
44. Li, J.-B. et al. One-dimensional assembly of polymeric ionic liquid capped gold nanoparticles driven by electrostatic dipole interaction. *RSC Adv.* **5**, 7994–8001 (2015).
45. Barros, A. D. E. Campus Sorocaba ARGILA PARA APLICAÇÃO EM SENSORES AMBIENTAIS Sorocaba. (2011).
46. Ji, Q. et al. Layer-by-layer films of graphene and ionic liquids for highly selective gas sensing. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 9737–9739 (2010).
47. Nassar, E. J., Ciuffi, K. J., Gonçalves, R. R., Messaddeq, Y. & Ribeiro, S. J. L. Filmes de titânio-silício preparados por ‘spin’ E ‘dip-coating’. *Quim. Nova* **26**, 674–677 (2003).
48. Zou, L., Li, Y., Cao, S. & Ye, B. A new voltammetric sensor for sensitive and selective determination of xanthine based on DNA and polyaniline composite Langmuir-Blodgett film. *Talanta* **129**, 346–351 (2014).

49. Trigueiro, J. P. C., Silva, G. G., Pereira, F. V. & Lavall, R. L. Layer-by-layer assembled films of multi-walled carbon nanotubes with chitosan and cellulose nanocrystals. *J. Colloid Interface Sci.* **432**, 214–220 (2014).
50. Paterno, L. G. & Soler, M. a G. Layer-by-Layer enabled nanomaterials for chemical sensing and energy conversion. *Jom* **65**, 709–719 (2013).
51. Zhang, D., Tong, J., Xia, B. & Xue, Q. Ultrahigh performance humidity sensor based on layer-by-layer self-assembly of graphene oxide/polyelectrolyte nanocomposite film. *Sensors Actuators B Chem.* **203**, 263–270 (2014).
52. Decher, G., Hong, J. D. & Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **210-211**, 831–835 (1992).
53. Liu, Y., Wang, Y. & Claus, R. O. Layer-by-layer ionic self-assembly of Au colloids into multilayer thin-films with bulk metal conductivity. *Chem. Phys. Lett.* **298**, 315–319 (1998).
54. Schlenoff, J. B. & Dubas, S. T. Mechanism of polyelectrolyte multilayer growth: Charge overcompensation and distribution. *Macromolecules* **34**, 592–598 (2001).
55. Raoufi, N., Surre, F., Rajarajan, M., Sun, T. & Grattan, K. T. V. Optical sensor for pH monitoring using a layer-by-layer deposition technique emphasizing enhanced stability and re-usability. *Sensors Actuators, B Chem.* **195**, 692–701 (2014).
56. Bhagat, D. J. & Dhokane, G. R. UV–VIS spectroscopic studies of one pot chemically synthesized polyindole/poly(vinyl acetate) composite films. *Mater. Lett.* **136**, 251–253 (2014).
57. Xu, H., Xiao, J., Liu, B., Griveau, S. & Bedioui, F. Enhanced electrochemical sensing of thiols based on cobalt phthalocyanine immobilized on nitrogen-doped graphene. *Biosens. Bioelectron.* **66**, 438–444 (2015).
58. Tung, T. T., Castro, M., Kim, T. Y., Suh, K. S. & Feller, J.-F. Graphene quantum resistive sensing skin for the detection of alteration biomarkers. *J. Mater. Chem.* **22**, 21754 (2012).

59. Zhang, Y. *et al.* Highly selective and sensitive biosensor for cysteine detection based on in situ synthesis of gold nanoparticles/graphene nanocomposites. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **436**, 815–822 (2013).
60. Tung, T. T., Castro, M., Kim, T. Y., Suh, K. S. & Feller, J.-F. High stability silver nanoparticles–graphene/poly(ionic liquid)-based chemoresistive sensors for volatile organic compounds' detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 3995–4004 (2014).
61. Bohnenberger, T., Rafailovic, L. D., Weilach, C., Hubmayr, D. & Schmid, U. Thin films from functionalized carbon nanotubes using the layer-by-layer technique. *Thin Solid Films* **551**, 68–73 (2014).
62. Wang, L. *et al.* Hierarchical nanocomposites of Co₃O₄/polyaniline nanowire arrays/reduced graphene oxide sheets for amino acid detection. *Sensors Actuators B Chem.* **203**, 864–872 (2014).
63. Lee, S., Yoo, M., Kim, S. & Shin, D. Identification and quantification of S-allyl-l-cysteine in heated garlic juice by HPLC with ultraviolet and mass spectrometry detection. *LWT - Food Sci. Technol.* **57**, 516–521 (2014).
64. Xu, F., Wang, F., Yang, D., Gao, Y. & Li, H. Electrochemical sensing platform for L-CySH based on nearly uniform Au nanoparticles decorated graphene nanosheets. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **38**, 292–8 (2014).
65. G.A. Mabbott. An Introduction to Cyclic Voltametry. *J. Chem. Educ.* **60**, 697–702 (1983).
66. Scaravelli, R. C. B. *et al.* Direct synthesis of coated gold nanoparticles mediated by polymers with amino groups. *J. Colloid Interface Sci.* **397**, 114–21 (2013).
67. P. T. Kissinger; W. R. Heineman. Cyclic Voltammtry. *J. Chem. Educ.* **60**, 702–706 (1983).
68. J. J. Van Benschoten; J. Y. Lewis; W. R. Heineman; D. A. Roston; P. T. Kissinger. Cyclic Voltametry Experiment. *J. Chem. Educ.* **60**, 772–776 (1983).
69. Anton, N., Benoit, J. P. & Saulnier, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J. Control. Release* **128**, 185–199 (2008).

70. Cho, D., Lee, S. & Frey, M. W. Characterizing zeta potential of functional nanofibers in a microfluidic device. *J. Colloid Interface Sci.* **372**, 252–260 (2012).
71. Wang, N., Hsu, C., Zhu, L., Tseng, S. & Hsu, J. P. Influence of metal oxide nanoparticles concentration on their zeta potential. *J. Colloid Interface Sci.* **407**, 22–28 (2013).
72. Alessandra Luiza Da Róz, Fabio de Lima Leite, M. F. e O. N. de O. J. *Nanoestruturas - Princípios e aplicações.* (Elsevier, 2015).
73. Zhang, H. & Cui, H. Synthesis and characterization of functionalized ionic liquid-stabilized metal (gold and platinum) nanoparticles and metal nanoparticle/carbon nanotube hybrids. *Langmuir* **25**, 2604–12 (2009).
74. Kern, W. & Puotinen, D. a. Cleaning solutions based on hydrogen peroxide for use in silicon semiconductor technology. *Rca Rev.* **31**, 187–206 (1970).
75. Amici, J., Sangermano, M., Celasco, E. & Yagci, Y. Photochemical synthesis of gold–polyethyleneglycol core–shell nanoparticles. *Eur. Polym. J.* **47**, 1250–1255 (2011).
76. Safavi, A. & Zeinali, S. Synthesis of highly stable gold nanoparticles using conventional and geminal ionic liquids. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **362**, 121–126 (2010).
77. Dong, M. *et al.* Two-phase synthesis of hydrophobic ionic liquid-capped gold nanoparticles and their application for sensing cholesterol. *Electrochim. Acta* **132**, 465–471 (2014).
78. Y. Rhieu, S. & Reipa, V. Tuning the Size of Gold Nanoparticles with Repetitive Oxidation-reduction Cycles. *Am. J. Nanomater.* **3**, 15–21 (2015).
79. Nicholson, R. S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for the Measurement of Electrode Reaction Kinetics. *Anal. Chem.* **37**, 1351–1355 (1965).
80. Jin, W. *et al.* Modulated Cr(III) oxidation in KOH solutions at a gold electrode: Competition between disproportionation and stepwise electron transfer. *Electrochim. Acta* **56**, 8311–8318 (2011).
81. Wang, S. F. & Du, D. Differential pulse voltammetry determination of ascorbic acid with ferrocene-L-cysteine self-assembled supramolecular film modified electrode. *Sensors and Actuators B-Chemical* **97**, 373–378 (2004).

82. Liu, X. *et al.* Differential Pulse Voltammetric Determination of L-Cysteine After Cyclic Voltammetry in Presence of Catechol with Glassy Carbon Electrode. *Anal. Lett.* **45**, 2246–2256 (2012).
83. Sakamoto, M., Fujistuka, M. & Majima, T. Light as a construction tool of metal nanoparticles: Synthesis and mechanism. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **10**, 33–56 (2009).
84. Ariga, K., Lvov, Y. M., Kawakami, K., Ji, Q. & Hill, J. P. Layer-by-layer self-assembled shells for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 762–771 (2011).