



**EFEITO DA FOTOEXCITAÇÃO NA SÍNTESE DE
NANOCOMPÓSITOS BIOCOMPATÍVEIS DE
OURO/PLURONIC**

DEIZILENE DE SOUZA BARBOSA GOMES

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA GODOY SOLER

COORIENTADOR: LEONARDO GIORDANO PATERNO

Brasília – DF
Dezembro/2018



EFEITO DA FOTOEXCITAÇÃO NA SÍNTESE DE NANOCOMPÓSITOS BIOCOMPATIVOS DE OURO/PLURONIC

DEIZILENE DE SOUZA BARBOSA GOMES

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília - DF
Dezembro/2018

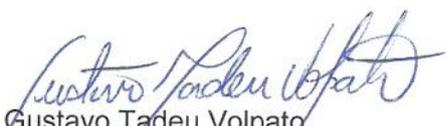
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA
E NANOBIOTECNOLOGIA

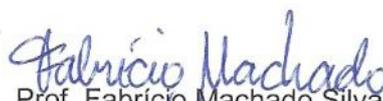
**EFEITO DA FOTOEXCITAÇÃO NA SÍNTESE DE NANOCOMPÓSITOS
BIOCOMPATIVOS DE OURO/PLURONIC**

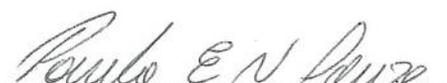
POR DEIZILENE DE SOUZA BARBOSA GOMES

Aprovado em 07 de dezembro de 2018.


Prof^a. Maria Aparecida Godoy Soler
(Orientadora - Instituto Física/Unb)


Prof. Gustavo Tadeu Volpato
(Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFMT)


Prof. Fabrício Machado Silva
(Instituto Química/UnB)


Prof. Paulo Eduardo Narcizo de Souza
(Instituto Física/Unb)

Prof. Sebastião Willian da Silva
(Instituto Física/Unb) - suplente

*Aos meus pais, Tremi e Laudelino,
ao meu esposo Adilson e à minha filha Giulia.*

AGRADECIMENTO

À Deus, pela vida. Por me conceder sabedoria, paciência e acima de tudo forças para permanecer firme nos meus ideais.

Ao meu esposo Adilson por acreditar nos meus sonhos e me incentivar a torná-los realidade.

À minha filha Giulia por ser minha fonte de inspiração e por dividir a mamãe com o “trabalho dela”. Princesinha amada que sentiu na pele os efeitos de ter uma mãe doutoranda. Um dia você entenderá!

Aos meus pais pelo amor incondicional e apoio em todos os meus projetos.

Aos amigos e irmãos Eneas e Darlene pela acolhida em Brasília e por serem minha base nos momentos difíceis. Obrigada pelas orações.

A todos da ICCO-Taguatinga e ICCO-Ji-Paraná pelas orações e amizade.

À minha querida professora Maria Aparecida, por ter me guiado na elaboração deste trabalho. O carinho com que me recebeu, a confiança depositada em mim e a sua autenticidade marcaram esses anos trabalhando juntas.

Ao professor Leonardo Paterno pelas discussões que abrilhantaram esse trabalho e pelo espírito científico.

À Professora Sônia Freitas pelo profissionalismo com que sempre me atendeu e por liberar o uso do Laboratório de Biofísica no Instituto de Biologia da UnB. Pela valiosa contribuição nesse trabalho.

Ao professor Aisel do Laboratório de Biofísica (IB-UnB) pelas medidas de ITC e ultracentrifugação analítica e pelo exemplo de competência e dedicação. Pelos vários momentos de discussão sobre este trabalho, muito obrigada!

Aos muitos companheiros desta jornada nano integrantes do grupo de pesquisa da Professora Maria Aparecida pela amizade: Camila Letti, Rafael, Jaqueline, Antônia, Deise Coelho, Larissa e Luísa. Em especial, ao amigo Luís Miguel pelos diversos auxílios com experimentos e tratamento de dados; à Luana Afiune pela ajuda na estatística dos dados de MTT e por ser minha amiga-irmã; à Débora e à Aline pelas diversas discussões sobre química; e a Aline por me auxiliar em todas as necessidades (experimentais ou não), e por dar sequência a este trabalho. E as demais amigadas que conquistei durante esses anos de UnB, entre elas, a Lucélia, Isis e Fermin.

A todos do Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais do Instituto de Química da UnB pela amizade. Em especial, a Priscila Rios pelas medidas de voltametria cíclica e por me acompanhar nas primeiras sínteses.

Ao Hermano pela amizade e pelo auxílio nos equipamentos do Laboratório “Cnano” do Instituto de Física da UnB e pelas inúmeras discussões matemáticas.

A todos do Laboratório de Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia da UnB pela amizade. Em especial, a Karen e Diogo pelo apoio para a realização de experimentos.

Ao professor Ricardo Bentes Azevedo do Instituto de Biologia da UnB pelo apoio para a realização dos ensaios biológicos.

À Laíse Andrade pela amizade e pelos ensaios *in vitro* de citotoxicidade.

Ao Dr. Damien Mertz do Instituto de Físico-Química da Universidade de Estrasburgo-França e Tatiane do LabMic da Universidade de Goiás pelas micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao reitor professor Uberlando Tiburtino Leite do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO) por implementar os afastamentos integrais para capacitação que permitiram o meu acesso ao doutorado e pelo apoio recebido.

Ao pró-reitor de Pesquisa, Inovação e Pós-Graduação (PROPESP) do IFRO professor Gilmar Alves pela amizade e apoio durante todo o período de afastamento.

Aos colegas professores do IFRO pela amizade, incentivo e diversas trocas de datas de aulas para que eu pudesse viajar a Brasília.

Aos meus ex-alunos por vibrarem com cada conquista deste pequeno ser. Por fazerem parte da minha motivação em buscar novos conhecimentos.

Às fontes de fomento FAPERO (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Rondônia) e FAP-DF pelos auxílios financeiros recebidos durante o desenvolvimento deste projeto.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

RESUMO

Este trabalho apresenta uma nova alternativa para a síntese de nanopartículas de ouro a partir da mistura reacional de soluções do copolímero Pluronic F127 (PLU) e ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), catalisada por fotoexcitação com radiação UV 254 nm. A radiação UV promove a excitação dos íons tetracloroaurato AuCl_4^- que se desproporcionam sucessivamente até o estado de valência zero. O copolímero PLU reduz os íons tetracloroaurato e estabiliza as nanopartículas de ouro (AuNPs) em meio aquoso, dando origem ao nanocompósito híbrido AuNP-PLU. O estudo foi realizado variando-se a concentração de PLU na faixa de 0,1 a 10 mmol L⁻¹, enquanto a concentração de HAuCl_4 variou de 1 a 4 mmol L⁻¹. Os dados do monitoramento da absorção óptica da banda de ressonância plasmônica de superfície localizada das AuNPs, em função do tempo de reação, sugerem uma cinética de reação de 1° ordem com a constante de taxa $\sim 0,40 \text{ s}^{-1}$ para os nanocompósitos sintetizados com concentrações de PLU > 1 mmol L⁻¹ e tempo de reação de 10 min. As micrografias dos nanocompósitos obtidas por MET revelaram AuNPs quase-esféricas e cristalinas, com diâmetro médio de 12 nm, enquanto o diâmetro hidrodinâmico (D_H) médio obtido por espalhamento dinâmico de luz foi de 37 nm. Amostras controle sintetizadas sem radiação UV têm diâmetro médio das AuNPs de 19 nm e formato poligonal, com $D_H \sim 50$ nm. As análises da distribuição do coeficiente de sedimentação aparente obtidas por meio de ultracentrifugação analítica mostraram que a síntese fotoexcitada possui um único pico associado ao coeficiente de sedimentação para absorbância em 260 e 530 nm, indicando a presença de distribuição de tamanho de nanopartículas estreita, enquanto a amostra controle apresentou vários picos indicando a elevada polidispersão de tamanhos. Voltamogramas cíclicos mostraram que na síntese sob fotoexcitação ocorre a redução completa dos íons de ouro em todas as concentrações de PLU estudadas, enquanto que, no caso da amostra controle esse efeito ocorre apenas para concentrações de PLU > 2 mmol L⁻¹. Análises termogravimétricas e de absorção atômica dos nanocompósitos permitiram estimar a quantidade de PLU nos nanocompósitos, mostrando que nas amostras fotoexcitadas é 5 vezes menor do que no AuNP-PLU controle, sem influenciar a estabilidade dos respectivos coloides (~ 60 dias). Os dados de espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR) e de Raman indicaram que as AuNPs estão ligadas, via coordenação, aos grupos éter do PLU. O tamanho dos nanocompósitos e das nanopartículas de ouro variou com a concentração de PLU, e permaneceu constante com a variação da concentração do precursor metálico. A mistura reacional otimizada para a formação das AuNPs foi a de razão molar $\text{HAuCl}_4/\text{PLU}=1$. Ensaio biológicos in vitro em células NIH-3T3 mostraram que os nanocompósitos são biocompatíveis para tempos de incubação de até 24h, para concentrações de PLU < 0,18 mmol L⁻¹ e de $\text{Au}^0 < 0,34$ mmol L⁻¹.

Palavras-chave: nanopartículas de ouro, Pluronic F127, banda plasmônica, nanocompósitos, cinética, viabilidade celular.

ABSTRACT

This work presents a new alternative for the synthesis of gold nanoparticles catalyzed by photoexcitation with 254 nm UV radiation from a reaction mixture prepared from triblock copolymers (Pluronic F127 or PLU) and tetrachloroauric acid (HAuCl_4). UV radiation promotes the excitation of tetrachloroaurate ions AuCl_4^- which disproportionate successively to the zero-valence state. The PLU copolymer also reduces the tetrachloroaurate ions and exerts the steric stabilizer function of the gold nanoparticles (AuNPs) formed to form the AuNP-PLU hybrid nanocomposite. The monitoring of the optical absorption of the localized surface plasmon resonance band (LSPR) of the AuNPs as a function of the reaction time suggests a first order reaction kinetics with the rate constant $\sim 0.40 \text{ s}^{-1}$ for the nanocomposites synthesized with UV light at concentrations of $\text{PLU} > 1 \text{ mmol L}^{-1}$ where the reaction time is estimated to be 10 min. Micrographs of the nanocomposites obtained by MET reveal quasi-spherical and highly crystalline AuNPs with a mean diameter of 12 nm for the metallic core and a hydrodynamic diameter of 37 nm due to PLU shell. Control samples synthesized without UV radiation have AuNPs with an average diameter of 19 nm and a polygonal shape, with $D_H \sim 50 \text{ nm}$. The analysis of the apparent sedimentation coefficient distribution ($l\text{-}g^*(S)$) obtained by analytical ultracentrifugation (SV-AUC) showed that the photoexcited synthesis has a single peak associated with the sedimentation coefficient $S_{20,w}$ of 947,10 S for absorbance at 260 and 530 nm indicating the presence narrow size distribution of nanoparticles, while the control sample showed several peaks indicating the high polydispersion of sizes. Cyclic voltammograms showed that in the synthesis under photoexcitation the complete reduction of the gold ions in all concentrations of PLU studied is observed, whereas in the case of the control sample this effect occurs only at concentrations of $\text{PLU} > 2 \text{ mmol L}^{-1}$. The thermogravimetric and atomic absorption analyzes of the nanocomposites allowed us to estimate that the amount of PLU in nanocomposites obtained with photoexcitation is 5 times lower than in the AuNP-PLU control, without influencing the stability of the respective colloids (~ 60 days). Infrared spectroscopy (FTIR-ATR) and Raman spectroscopy data indicate that AuNPs are linked, via coordination, to the ether groups of PLU. The size of the nanocomposites and the gold nanoparticles were altered with the PLU concentration, and remained constant when the concentration of the metal precursor was varied. The optimized reaction mixture for AuNP formation was the molar ratio $\text{HAuCl}_4/\text{PLU}=1$. In vitro biological assays in NIH-3T3 cells have shown that nanocomposites are biocompatible for incubation times of up to 24 hours for concentrations of $\text{PLU} < 0,18 \text{ mmol L}^{-1}$ and $\text{Au}^0 < 0,34 \text{ mmol L}^{-1}$.

Keywords: gold nanoparticles, Pluronic F127, plasmon band, nanocomposites, kinetics, cell viability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração da interação da luz com uma nanoesfera metálica ($d \ll \lambda$). O campo elétrico produz a oscilação coletiva de elétrons livres na superfície da nanopartícula.....7
- Figura 2. Modificações na banda plasmônica devido: (a-d) tamanho; (e) formato e em (f) meio. Imagens adaptadas das referências .. Modificações na banda plasmônica devido: (a-d) tamanho; (e) formato e em (f) meio. Imagens adaptadas das referências [1,25,27,28].9
- Figura 3. Modelo estrutural de uma nanopartícula de ouro. Adaptado da referência [1]. 11
- Figura 4. (a) Estrutura química do Pluronic F127 (PLU) sendo EO o óxido de etileno (hidrofílico) e PO o óxido de propileno (hidrofóbico); (b) Ilustração do regime não micelar (concentrações abaixo da CMC) e micelar (concentrações de PLU acima da CMC). 14
- Figura 5: Ilustração das etapas de síntese dos nanocompósitos: preparo da mistura reacional com as soluções de PLU e HAuCl_4 ; em seguida, essa mistura é fotoexcitada com radiação UV (254nm, 16W) na câmara de reação (25°C) ou deixada sob a bancada com ou sem iluminação ambiente à 23°C. Após um certo intervalo de tempo observa-se a alteração de cor da solução. 19
- Figura 6: Câmara utilizada na síntese fotoexcitada dos nanocomplexos AuNP-PLU. (a) parte interna revestida com papel laminado e com duas lâmpadas UV (254 nm e 8 W cada); (b) ventilador fixado na lateral na parte lateral (c) termopar para monitorar a temperatura a mostra.....20
- Figura 7: Espectros de Uv-vis das amostras: soluções aquosas de PLU e HAuCl_4 , ambas na concentração de 2 mmol L^{-1} antes e depois de 10 minutos de fotoexcitação; o nanocompósito AuNP-PLU:5F em $t=0$ (após a mistura dos precursores) e $t=10 \text{ min}$ de fotoexcitação; e as amostras controle AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5E após 60 min da mistura, sob iluminação ambiente e sem luz, respectivamente.28
- Figura 8: Micrografias com escala de $0,5 \mu\text{m}$ e, *inset* com escala de 5 nm, para as amostras: (a) AuNP-PLU:5F e (b) AuNP-PLU:5A. Micrografias de MET em alta resolução com indicação dos planos cristalinos: c) AuNP-PLU:5F e em (d) AuNP-PLU:5A 30
- Figura 9. Curvas termogravimétricas (linha preta) e termogravimétricas derivadas (linha vermelha) dos nanocompósitos: (a) AuNP-PLU:5F e (b) AuNP-PLU:5A; e do PLU puro em (c).....32

Figura 10. Perfis de distribuição da Intensidade de luz espalhada em função do diâmetro hidrodinâmico dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F (linha preta) e AuNP-PLU:5A (linha vermelha). <i>Inset</i> : imagens digitais das dispersões coloidais.	33
Figura 11. (a) Espectros de infravermelho obtido por ATR para soluções aquosas de PLU nas concentrações de 0,5; 2 e 4 mmol L ⁻¹ . Em (b) a identificação da posição das principais bandas e suas atribuições [49,58].....	35
Figura 12. Espectros de infravermelho obtidos por ATR para (a) solução de PLU na concentração de 2 mmol L ⁻¹ após 10 min de fotoexcitação e o nanocompósito AuNP-PLU:5F; inset: a larga banda indicando a presença dos produtos de oxidação no nanocompósito sintetizado por fotoexcitação. (b) comparação da posição da banda $\nu(\text{C-O-C})$ próxima a 1100 cm ⁻¹ para a solução de PLU na concentração de 2 mmol L ⁻¹ após 10 min de fotoexcitação; solução de PLU sem irradiar adicionado AICIPc (corante hidrofóbico) e os nanocompósitos: AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5F.	36
Figura 13. Espectros Raman do PLU e do nanocompósito AuNP-PLU:5F secos.....	37
Figura 14. Painéis superiores: varreduras radiais a 530 nm da análise SV-AUC das nanopartículas presentes nos nanocompósitos (a) por fotoexcitação (AuNP-PLU:5F) e (b) controle (AuNP-PLU:5A). Painéis inferiores: a distribuição aparente do coeficiente de sedimentação $Is-g^*(S)$ a 260 nm (preto) e 530 nm (vermelho) obtidos para AuNP-PLU:5F (d) e AuNP-PLU:5A (e). Os picos correspondem às diferentes populações de nanopartículas e estão indicadas por algarismos romanos.....	38
Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos das soluções de PLU e H ₂ AuCl ₄ , ambos a 2 mmol L ⁻¹ preparadas em solução de KCl a 0,1 mol L ⁻¹	41
Figura 16. Monitoramento da banda plasmônica na região entre 450 e 600 nm do espectro de UV-Vis durante a fotoexcitação mistura reacional para a formação do nanocompósito AuNP-PLU:5F (2mmol L ⁻¹ de PLU e de H ₂ AuCl ₄). <i>Inset</i> : dados de absorbância máxima em função do tempo de fotoexcitação (pontos) com ajuste exponencial (linha); e imagens digitais da mistura reacional em t = 0 min (a), antes da fotoexcitação, e em t = 10 min de fotoexcitação (b).	45
Figura 17. A constante de taxa observada (<i>k_{obs}</i>) em função da concentração dos precursores (Tab.1). Em (a) nanocompósitos do conjunto I com variação da concentração de PLU para a síntese fotoexcitada (linha preta) e para as amostras controle (linha pink); (b) nanocompósitos do conjunto II com variação da concentração de H ₂ AuCl ₄	46
Figura 18. Espectros de UV-vis para os nanocompósitos AuNP-PLU: (a) com a concentração de H ₂ AuCl ₄ fixa em 2 mmol L ⁻¹ e a concentração de PLU variando de 0,3 mmol L ⁻¹ (2F), 0,5 mmol L ⁻¹ (3F), 1,0 mmol L ⁻¹ (4F) e	

2,0 mmol L⁻¹ (5F); *Inset*: os valores de absorvância máxima (pontos pretos) dos nanocompósitos sintetizados nas concentrações de PLU: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0, 8,0 e 10,0 mmol L⁻¹; a linha é um guia visual. Em (b) a concentração de PLU permaneceu em 2,0 mmol L⁻¹ e a concentração de HAuCl₄ variou de 1,0 mmol L⁻¹ (10F), 2,0 mmol L⁻¹ (5F), 3,0 mmol L⁻¹ (11F) e 4,0 mmol L⁻¹ (4F); *inset*: os valores de absorvância máxima (pontos pretos) desses nanocompósitos e o ajuste linear (linha vermelha).48

Figura 19. Diâmetro hidrodinâmico: (a) da cadeia de PLU em solução aquosa (pontos azuis) e dos nanocompósitos AuNP-PLU (pontos pretos) sintetizados com fotoexcitação em função da concentração de PLU. (b) dos nanocompósitos sintetizados por fotoexcitação com aumento da concentração de HAuCl₄ com a concentração de PLU fixa em 2 mmol L⁻¹.49

Figura 20. Diâmetro médio (D_M) das nanopartículas de ouro (AuNPs) obtidos por meio de histogramas de distribuição de tamanho para os nanocompósitos AuNP-PLU sintetizados nas concentrações de PLU de: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mmol L⁻¹ (pontos em preto) com a concentração de HAuCl₄ em 2 mmol L⁻¹. E nas concentrações de HAuCl₄ : 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mmol L⁻¹ (pontos em vermelho) com a concentração de PLU fixa em 2 mmol L⁻¹.51

Figura 21. Micrografias de MET dos nanocompósitos AuNP-PLU variando-se concentração de PLU de: (a) 0,3 mmol L⁻¹ (2F), (b) 0,5 mmol L⁻¹ (3F), (c) 1,0 mmol L⁻¹ (4F); (d) 2,0 mmol L⁻¹ (5F); (e) 4 mmol L⁻¹ (6F); e (f) 8 mmol L⁻¹ (8F). Escala de 50 nm.51

Figura 22. Micrografias de MET dos nanocompósitos AuNP-PLU sintetizados com concentração de HAuCl₄ de: (a) 1 mmol L⁻¹ (10F); (b) 2 mmol L⁻¹ (5F); (c) 3 mmol L⁻¹ (11F) e (d) 4 mmol L⁻¹ (12F). A concentração de PLU permaneceu fixa em 2 mmol L⁻¹. Escala de 50 nm.52

Figura 23. (a) Voltamogramas cíclicos dos nanocompósitos AuNP-PLU sintetizados por fotoexcitação AuNP-PLU:1F (0,1 mmol L⁻¹ de PLU e 2 mmol L⁻¹ de HAuCl₄) e AuNP-PLU:12F (2 mmol L⁻¹ de PLU e 4 mmol L⁻¹ de HAuCl₄) e pelo método controle AuNP-PLU:3A (0,5 mmol L⁻¹ de PLU e 2 mmol L⁻¹ de HAuCl₄); *Inset*: voltamogramas cíclicos dos nanocompósitos AuNP-PLU:1F (linha preta), AuNP-PLU:3A (linha vermelha) e AuNP-PLU:12F (linha azul). (b) Espectros de UV-vis dos nanocompósitos apresentados em (a).53

Figura 24. Tempo médio de reação de formação dos nanocompósitos em função da concentração de PLU (pontos vermelhos) e da concentração de HAuCl₄ (pontos pretos). A linha é um guia visual.54

- Figura 25. Espectro de UV-vis dos nanocompósitos crescidos identificados por: AuNP-PLU:4F-*grown* e AuNP-PLU:5F-*grown* tendo como sementes as AuNPs dos nanocompósitos AuNP-PLU:4F e 5F, respectivamente. *Inset*: deslocamento da banda LSPR de 528 para 542 nm (AuNP-PLU: 4F para o AuNP-PLU:4F-*grown*) e de 526 para 537 nm (AuNP-PLU: 5F para AuNP-PLU:5F-*grown*).55
- Figura 26. Crescimento sucessivo das AuNPs via adição de íons de ouro na dispersão coloidal AuNP-PLU:4F (a) e AuNP-PLU:5F (b), aqui consideradas como sementes, indicadas por 4F e 5F, respectivamente. Após crescimento as novas AuNPs foram nomeadas por 4F-grow e 5F-grow, respectivamente. As linhas pontilhadas é para facilitar a visualização do tamanho original da semente na parte mais densa da figura. Escala de 5 e 100 nm.....56
- Figura 27. Espectros de absorvância UV-vis do nanocompósito AuNP-PLU:5F após a síntese, com 30 e 60 dias de armazenamento a 10°C, conforme indicação. *Inset*: Imagem digital após 60 dias.58
- Figura 28. (a) Espetros de absorvância no UV-vis do nanocompósito AuNP-PLU:5F centrifugado e ressuspendido em solução de PBS: 1:1 e 1:4, conforme indicação e *inset* imagens digitais da dispersão coloidal. (b) Micrografia MET do nanocompósito diluído em 1:4 em PBS. Escala 100 nm e *inset*: imagem alta resolução com escala de 5 nm.58
- Figura 29. Viabilidade celular dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A e para a solução de PLU puro (sem AuNPs) em função da diluição seriada no tempo de incubação de 15min (a) e 24h (b). Como controle foram utilizadas células sem tratamento (adição de PLU ou nanocompósitos). As concentrações relativas referem-se à percentagem de diluição da concentração inicial de cada amostra. As barras representam a média \pm desvio padrão. Os asteriscos referem-se a uma diferença estatística com significância de $p < 0,05$, e sua cor é para facilitar a comparação: vermelho com o grupo controle e preto entre as amostras e as amostras com o PLU.61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Identificação dos nanocompósitos AuNP-PLU: X preparados neste trabalho, em que “X” representa um número de 1 a 12. No conjunto I (amostras de 1 a 9) a concentração de PLU variou de 0,1 a 10 mmol L⁻¹ com HAuCl₄ fixo em 2 mmol L⁻¹. No conjunto II a concentração de PLU permaneceu constante e a concentração de HAuCl₄ variou de 1,0 a 4,0 mmol L⁻¹. A indicação “F”, “A” e “E” foi utilizada para diferenciar as amostras fotoexcitadas e amostras controle (ambiente e escuro), respectivamente.21
- Tabela 2. Identificação dos picos da Fig. 14 (b) e os valores do coeficiente de sedimentação aparente para as nanopartículas produzidas pelo método controle e fotoexcitado.39
- Tabela 3. Valores das concentrações dos solutos em cada diluição empregada no ensaio de MTT: a concentração do PLU puro (solução aquosa); a concentração de PLU nas dispersões coloidais, a concentração de ouro coloidal (Au₀) e de nanopartículas (AuNP-PLU) para os nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuCl₄⁻: íons de tetracloroaurato

Abs_{MAX}: absorvância máxima

AICIPc: cloreto de ftalocianina de alumínio

Au⁰: ouro metálico (estado oxidação zero)

Au¹⁺: íon de ouro no estado de oxidação +1

Au³⁺: íon de ouro no estado de oxidação +3

AuNP: Nanopartícula de ouro

AuNP-PLU: Nanopartícula de ouro revestida com PLU

CMC: concentração micelar crítica

C-O-C: grupo éter

D_H: diâmetro hidrodinâmico

D_M: diâmetro médio

E vs Ag/AgCl: potencial medido em relação ao eletrodo de referência (prata/cloreto de prata)

EDL: espalhamento dinâmico de luz

FTIR-ATR: espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier com aquisição por refletância total atenuada.

HAuCl₄: ácido tetracloroáurico

[HAuCl₄]: concentração do ácido tetracloroáurico

hf: energia de um fóton de luz; h é a constante de Planck e f a frequência

I: intensidade da corrente

Is-g*: perfil de sedimentação aparente

KCl: cloreto de potássio

K_{OBS}: constante de taxa observada

LMCT: transferência de carga ligante metal

LSPR: ressonância plasmônica de superfície localizada

MET: microscopia eletrônica de transmissão

PEO: Poli(óxido de etileno)

PEO-PPO-PEO: copolímero tribloco anfifílico

PLU: Pluronic F127

[PLU]: concentração de F127

PPO: Poli(óxido de propileno)

S: Svedberg, em que $1S=1 \times 10^{-13}$ segundos

S_{20,w}: coeficiente de sedimentação normalizado

SU-AUC: ultracentrifugação analítica por análise da velocidade de sedimentação.

TG: termogravimetria

UV-vis: região do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético

VC: voltametria cíclica

σ: índice de polidispersão

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	5
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Nanoestruturas de ouro.....	6
2.2 Aplicações	16
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Materiais.....	18
3.2 Síntese dos nanocompósitos AuNP-PLU	19
3.3 Crescimento das AuNPs via sementes de Au(0).....	22
3.4 Técnicas de Caracterização	22
3.5 Ensaio biológico	26
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Formação dos nanocompósitos	27
4.1.1 Estudo do mecanismo de reação	40
4.1.2 Cinética de formação dos nanocompósitos.....	44
4.2 Efeito da concentração dos precursores na formação do nanocompósito	47
4.3 Crescimento sucessivo AuNps via sementes de Au ⁰	55
4.4 Estabilidade do Nanocompósito	57
4.5 Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade	59
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE	73
ANEXO: ARTIGO PUBLICADO	80

Capítulo 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

O fascínio pelo ouro é uma história que se estende por milênios e este metal já desempenhou um papel importante em quase todas as áreas da existência humana. Já foi símbolo de riqueza, devoção religiosa, amor, e até mesmo motivo de guerras [1]. Esses significados prevalecem até hoje. No entanto, nos últimos anos surgiu um novo tipo de interesse pelo ouro na comunidade científica. Cientistas descobriram que na escala nanométrica (< 100 nm) [2], as nanopartículas de ouro, apresentam propriedades únicas que são diferentes daquelas observadas para o ouro em escala macroscópica. A cor, a resistividade elétrica, a temperatura de fusão, a atividade catalítica, de transporte, as propriedades ópticas, entre outros, podem ser alteradas com a morfologia (tamanho e formato) e funcionalização da superfície das nanopartículas. Isso ocorre porque nessa nova escala efeitos quânticos, relativísticos e de superfície passam a predominar. Por exemplo, com relação às propriedades ópticas exibidas por elas, o efeito plasmônico característico de sistemas nanométricos metálicos é muito sensível a mudanças no ambiente e à estrutura das nanopartículas.

A biocompatibilidade do ouro, aliada às rotas químicas para a sua produção, tem possibilitado a sua aplicação em várias áreas da nanomedicina [1,3]. Em sensores, as nanopartículas de ouro podem fazer parte de uma estrutura automontada (filmes) ou ser dispersas em uma matriz polimérica [4]. Quando o máximo de absorção da banda plasmônica se localiza na região de 700 a 900 nm [1], as nanopartículas de ouro (AuNPs) podem converter a radiação incidente em calor quando iluminadas com luz correspondente (NIR). Este é o princípio da hipertermia

utilizado na terapia fototérmica plasmônica para inativação de células tumorais [5]. Em outra abordagem, se funcionalizadas com polímeros ou proteínas elas podem atuar como agente de entrega direcionada de fármacos (*drug delivery*) a um receptor tumoral específico [1]. Em muitos casos, a nanoestrutura de ouro forma um sistema conjugado com fármacos (hidrofílicos ou hidrofóbicos) e substâncias auxiliares (corantes, marcadores) podendo realizar imagens para obter o diagnóstico, ou monitoramento e tratamento da patologia, e por isso, são chamados de agentes teranósticos.

As nanopartículas de ouro também exibem grande capacidade de atenuação de raios X, sendo indicadas para melhorar o contraste em imagens de Microtomografia Computadorizada (micro-CT). Esta característica se deve à combinação do seu número atômico elevado ($Z=79$) e à facilidade de ejetar elétrons da camada mais interna (camada K) na presença de raios X (indicado pelo valor de K-edge). Portanto, o ouro apresenta uma vantagem em relação aos agentes de contraste tradicionais, como o Iodo ($Z=53$), ampliando os horizontes de aplicação de sistemas contendo esse metal [6].

Todas as aplicações requerem a produção de sistemas estáveis e biocompatíveis e de baixo custo, o que pode ser obtido por meio de rotas de síntese química. Por exemplo, os métodos de síntese úmida mediante a redução dos íons de ouro (Au^{3+} para Au^0) na presença de um agente redutor seguida da estabilização coloidal são os mais utilizados. Nanopartículas de ouro em solução aquosa podem ser obtidas pelo método de Turkevich [7] que utiliza o ácido tetracloroáurico, HAuCl_4 (fonte de íons de ouro) e o citrato de sódio (agente redutor e estabilizador). Este processo de síntese necessita de aquecimento e constante agitação. Os parâmetros que influenciam na morfologia e tamanho da nanopartícula são a proporção dos reagentes [8] e sua forma de adição [9], bem como a temperatura. Seguindo o protocolo original obtém-se nanoestruturas de 10 a 20 nm com tempo de síntese que varia de 40 min a 270 min. Porém, o tamanho das nanopartículas pode alcançar até 200 nm de acordo com modificações no protocolo de síntese [1].

A síntese das nanopartículas em meio orgânico (tolueno) pode ser obtida empregando-se o método Brust-Schiffrin. Neste processo utilizam-se o surfactante TOAB (brometo de tetraoctilamônio) para transferir os íons de ouro da fase aquosa para a fase orgânica e o boroidetro de sódio (NaBH_4) como agente redutor na presença de dodecanotiol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$). As nanopartículas são estabilizadas com

grupos tióis (-SH) e devido à forte interação ouro-tiol podem ser secas e ressuspendidas em outros solventes. Essa síntese é realizada a temperatura ambiente e mantida sob agitação durante um longo período de tempo (*overnight*) produzindo nanopartículas na faixa de tamanho de 1 a 5 nm [10].

Em outra abordagem, Sakai et al. [11] realizaram a síntese de nanopartículas de ouro utilizando apenas HAuCl_4 e um polímero como agente redutor e estabilizador coloidal. Este método tem se mostrado como uma alternativa promissora, quando comparada aos demais, pois fornece como produto da síntese uma dispersão coloidal pronta para uso. O procedimento de síntese consiste na mistura de soluções aquosas contendo polímeros (normalmente copolímeros em bloco do tipo poli(óxido de etileno)-poli(óxido propileno)-poli(óxido etileno) indicados por PEO-PPO-PEO) e HAuCl_4 à temperatura ambiente. Os autores empregaram uma proporção de mistura (10:1) para ocorrer a reação redox e a concentração do copolímero de 2 mmol L^{-1} que serve de referência para muitos trabalhos. Nesta concentração as AuNPs são formadas após 60 min do preparo da mistura. A proposta do mecanismo de formação das nanopartículas de ouro que foi apresentada teve como base a complexação dos íons de ouro com os blocos hidrofílicos (PEO) e a sua redução concomitantemente à oxidação do copolímero. O modelo foi desenvolvido a partir da análise de dados de espectroscopia de absorção no UV-vis e de microscopia eletrônica de transmissão. A análise dos espectros de UV-vis foi feita por meio do monitoramento da banda de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) na região próxima a 500 nm e a banda de transferência de carga entre ligante e metal (LMCT), associada aos íons de ouro, em 220 nm. Posteriormente, Sakai e Alexandridis investigaram o processo de síntese de nanopartículas com dimensões na faixa de 10-20 nm variando a concentração do copolímero ou do HAuCl_4 [12]. Também estudaram a influência da massa molar e das diferentes razões PEO/PPO na formação das nanopartículas (nucleação e crescimento) [13]; investigaram a participação do bloco hidrofóbico na estabilização das nanopartículas e na redução dos íons de ouro [14]; e também o tipo de solvente e o efeito da temperatura na morfologia das nanopartículas [15].

Um avanço na síntese das nanopartículas de ouro utilizando copolímeros é a incorporação da radiação UV na reação. A técnica de fotoativação oferece uma maneira simples de produzir nanopartículas quase monodispersas (estreita faixa de distribuição de tamanhos) com garantia da sua reprodutibilidade [16] devido a participação da radiação UV como catalisador da reação.

A síntese fotoquímica de AuNPs tem sido realizada empregando-se como agente redutor e estabilizador das nanopartículas surfactantes [17], homopolímeros [18,19] e copolímeros [20,21]. As condições de síntese: potência e comprimento de onda da luz empregada, tempo de exposição, temperatura, concentração, pH, entre outros, variam de acordo com as características desejadas para cada tipo de nanoestrutura.

Recentemente, Santos et al. [20] testaram a possibilidade de sintetizar AuNPs na presença de Pluronic F127 por fotoredução (25W e com $320 < \lambda < 400$). Neste estudo preliminar com modificações no método Sakai, empregou-se menor concentração HAuCl_4 e de proporção da mistura, e gotear o precursor metálico na solução copolímero e mantendo-a sob agitação por 120 min. A formação das NPs foi observada por meio de espectroscopia de UV-Vis. Com este procedimento a completa formação das nanopartículas com excitação por radiação UV ocorreu em 60 min e apresentou o mesmo comportamento da banda LSPR (~ 540 nm) obtido no processo de síntese sem irradiação UV. O processo de síntese realizado a 60°C apresentou um pequeno deslocamento da banda LSPR para 554 nm, indicando a influência da temperatura na formação das AuNPs.

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas empregando-se o método de síntese simples e ambientalmente limpo proposto por Sakai et al. [11], que utiliza o HAuCl_4 na presença de copolímeros. Neste caso, foi empregado o Pluronic F127 e a reação foi ativada com a incidência de radiação UV à temperatura ambiente. A caracterização dos nanocompósitos sintetizados foi realizada em detalhes, empregando-se pela primeira vez técnicas de caracterização como a voltametria cíclica e a espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR) e a ultracentrifugação analítica, para monitorar o processo de formação das NPs de ouro, bem como as características dos coloides obtidos. Os dados das amostras sintetizadas com fotoexcitação, foram comparados com os de amostras controle sintetizadas seguindo-se o protocolo desenvolvido por Sakai [11] (sem irradiação UV). A cinética e a termodinâmica de formação das AuNPs em amostras controle foram determinadas por meio da espectroscopia de UV-vis e de calorimetria de titulação isotérmica [22], contribuindo para a elucidação do mecanismo proposto por Sakai e Alexandridis [13]. Foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* com os coloides sintetizados incubados com células NIH-3T3 empregando-se o protocolo MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium).

1.2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar um nanocompósito estável e biocompatível contendo nanopartículas de ouro e o copolímero anfifílico (Pluronic F127) utilizando excitação com radiação UV 254 nm à temperatura ambiente, durante o processo de síntese.

Como objetivos específicos foram abordados:

- i. O processo de síntese e caracterização dos nanocompósitos;
- ii. A investigação da influência da radiação UV no processo de formação dos nanocompósitos tendo como controle a síntese em iluminação ambiente e sem iluminação.
- iii. A avaliação da cinética e proposição de um mecanismo de formação dos nanocompósitos;
- iv. O estudo da influência da concentração dos precursores na morfologia das nanopartículas de ouro e na estabilidade do nanocompósito;
- v. Estudo do crescimento das nanopartículas de ouro via técnica de crescimento sucessivo mediado por sementes de Au(0);
- vi. A avaliação *in vitro* da biocompatibilidade dos nanocompósitos em células NIH-3T3;

O trabalho desenvolvido está organizado como: A primeira parte (Capítulos 2 e 3) compreende os conceitos básicos sobre a formação e propriedades ópticas das nanopartículas de ouro fundamentada em uma revisão bibliográfica. Em seguida, no Capítulo 3 serão detalhados os materiais e o processo de síntese das nanopartículas de ouro desenvolvido, bem como o protocolo adotado para o crescimento sucessivo das nanopartículas. Também serão descritas as condições experimentais utilizadas em cada técnica de caracterização.

Na segunda parte (Capítulos 4 e 5) serão abordados os resultados científicos decorrentes desse trabalho sobre a formação dos nanocompósitos híbridos, enquanto, no Capítulo 5 serão apresentadas as conclusões gerais e perspectivas.

Nos Apêndices serão apresentados alguns dados e informações complementares, e o trabalho publicado com as caracterizações das amostras controle.

Capítulo 2

REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo será abordado o efeito plasmônico responsável pelas propriedades ópticas das nanopartículas e os fatores que alteram a sua resposta. Em seguida, será detalhado o processo de síntese úmida, bem como a síntese fotoexcitada quando se utiliza copolímeros.

2.1 Nanoestruturas de ouro

O ouro possui uma combinação única de propriedades físicas e químicas em relação aos outros metais nos estados macro e microscópico. Na macroescala o ouro é conhecido pela sua cor amarela, pela estabilidade química e alto potencial redox. Essas características são consequência da sua estrutura eletrônica cuja compreensão se origina na química quântica acoplada a teoria da relatividade de Einstein [1]. Na nanoescala, sua configuração eletrônica incomum é combinada com os efeitos de dimensão em virtude do aumento da razão área/volume, fazendo com que suas propriedades dependam dos efeitos de superfície.

A configuração eletrônica do ouro ($[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^1$) mostra que ele possui o orbital 5d completo e um elétron desemparelhado no orbital 6s. Como ele possui elétrons de valência no orbital 6s (mais externo) ocorrem efeitos relativísticos [1,23]. Isso significa que seus elétrons devem orbitar a uma velocidade próxima à da luz para equilibrar a forte atração do seu grande núcleo. Esses elétrons agem como se tivessem uma massa muito maior; assim, de acordo com a teoria especial da relatividade de Einstein se a massa aumenta o comprimento L (neste caso, o raio da órbita) deve diminuir. Esse efeito é conhecido como contração relativística aplicado a

todos os elementos que possuem Z (número atômico) > 50 [1]. Como consequência, a transição interbandas é favorecida devido ao estreitamento do *gap* de energia entre a banda 5d e o nível de Fermi (1,84 eV). O mesmo não ocorre com a prata ($Z=47$, $[kr]4d^{10}5s^1$), que não possui efeitos relativísticos ($Z=47$) e a transição interbanda ($4d \rightarrow 5s$) não é favorecida porque a energia do *gap* é maior (3,9 eV). Isso significa que na região do visível o ouro bulk já sofre excitação (e absorção da luz), enquanto a prata sofrerá esse efeito apenas no UV (ultravioleta) o que justifica sua aparência prateada e o amarelo do ouro bulk [1].

Ao diminuir a escala de tamanho essas diferenças se mantêm e se tornam mais especiais por conta do elétron desemparelhado do orbital s da banda de condução. Ele fica mais susceptível à ação do campo elétrico externo e, por conta disso, eles serão considerados como elétrons livres. Nessa condição, uma nuvem de elétrons se moverá deslocando-se sob influência do campo elétrico, ocorrendo a formação de um plásmon com o centro fixo. Se considerarmos a condição quase-estática e sem a propagação dessa excitação por uma superfície denomina-se plásmon de superfície localizada [24].

A Figura 1 representa uma nanopartícula metálica esférica, homogênea e isotrópica sob ação do campo elétrico da luz em um momento t e $t+T/2$, onde T é o período de uma oscilação. Essa esfera é muito menor que o comprimento de onda da luz ($d \ll \lambda$).

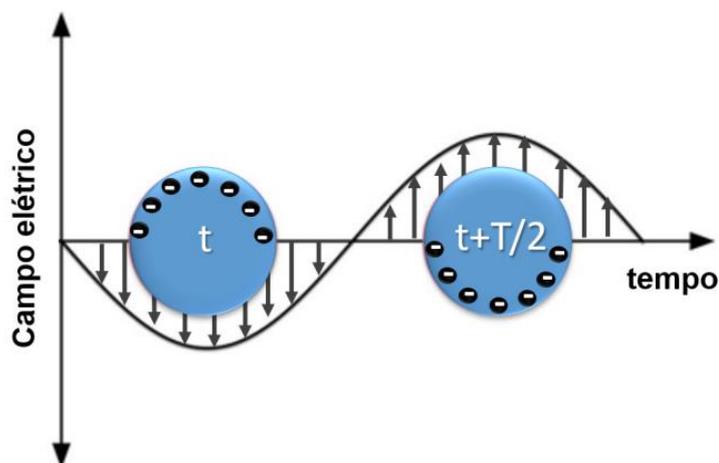


Figura 1. Ilustração da interação da luz com uma nanoesfera metálica ($d \ll \lambda$). O campo elétrico produz a oscilação coletiva de elétrons livres na superfície da nanopartícula.

O campo elétrico em uma certa frequência induz a oscilação ressonante e coerente dos elétrons livres do metal. Esta oscilação é conhecida como ressonância plasmônica de superfície localizada (*Localized surface plasmon resonance-LSPR*). Nessa condição a absorção é máxima e pode ser visualizada espectralmente na forma de uma banda (banda plasmônica) na região do UV-Vis. Como esse efeito ocorre em frequências específicas ele fornece informações importantes sobre o sistema nanoparticulado. A cor das dispersões coloidais, por exemplo, está associada a essa frequência de ressonância (região de absorção) e o que é visto é a cor complementar daquela absorvida. Se uma dispersão coloidal possui coloração vermelha suas nanopartículas necessariamente absorvem radiação em aproximadamente 520 nm (verde), ou seja, a frequência de ressonância da banda LSPR é de 576 THz.

Os principais fatores que alteram a frequência de ressonância plasmônica de superfície estão apresentados na Fig. 2, tais como, o tamanho (a-d) e o formato (e) da nanopartícula, além das características do meio em que ela se encontra (f). A interação entre partículas também altera o efeito plasmônico.

Quando a nanopartícula assume tamanhos da ordem do comprimento de onda da luz visível a absorção deixa de ser a única contribuição do efeito plasmônico. O aumento do tamanho da partícula provocará uma mudança de fase da onda incidente no interior das nanopartículas promovendo efeitos de retardamento. Isso causará uma inomogeneidade da polarização e excitações multipolares [1,25]. Como resultado, a frequência de ressonância plasmônica será menor (maior comprimento de onda) devido ao efeito de extinção da luz, ou seja, uma contribuição da absorção e espalhamento da luz como mostrado na Fig. 2(a-d). Visualmente observa-se a alteração de cor da dispersão coloidal de pink-avermelhado para roxo como mostrado em (a-b).

No caso de nanopartículas anisotrópicas tais como bastões, elas apresentam duas frequências de ressonância de plásmom: uma devido à oscilação transversal (semelhante a uma esfera) em frequências maiores; e outra longitudinal em menores frequências (maior comprimento de onda), como mostrado na Fig. 2(e), com dependência da razão de aspecto (comprimento x largura) [26]. Os motivos que promovem esse deslocamento para regiões com baixas frequência é análogo ao discutido anteriormente.

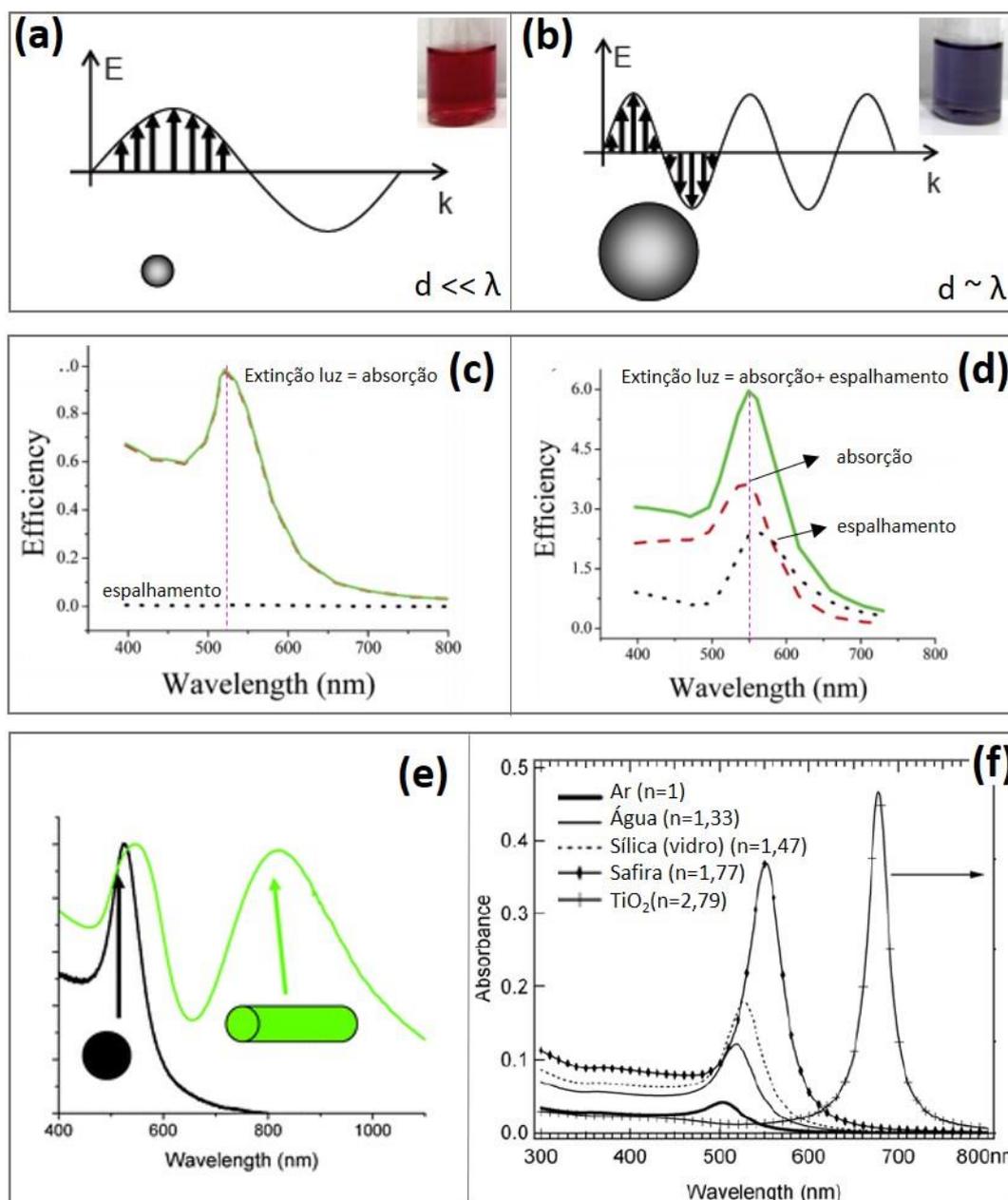


Figura 2. Modificações na banda plasmônica devido: (a-d) tamanho; (e) formato e em (f) meio. Imagens adaptadas das referências .. Modificações na banda plasmônica devido: (a-d) tamanho; (e) formato e em (f) meio. Imagens adaptadas das referências [1,25,27,28].

Para nanopartículas de ouro de mesmo tamanho imersas em meios diferentes, suas propriedades tais como o índice de refração (n) e a permissividade dielétrica (ϵ_{diel}) dependem do meio como exemplificado na Fig. 2(f). Por exemplo, nanopartículas com 14 nm dispersas em água com $n = 1,33$ e $\epsilon_{\text{diel}} = 1,77$ apresentam um λ_{plasmon} em 519 nm segundo estudo teórico realizado por H. Arvin [1]. A mesma nanopartícula imersa em filmes na matriz de sílica ($n = 1,47$, $\epsilon_{\text{diel}} = 2,16$) apresenta o λ_{plasmon} em

527 nm. Desta forma, o modelo eletrostático (Teoria de Mie) que considera este sistema como um dipolo quase-estático prevê que o meio influenciará na resposta da nanopartícula ao campo elétrico incidente. A formação do dipolo prevista nesse modelo e, portanto, a sua oscilação terá uma dependência direta com a permissividade dielétrica ($\epsilon_{\text{diel}} = n^2$)[1,24].

Portanto, as variáveis apresentadas acima mostram que através do efeito plasmônico (LSPR) é possível controlar as propriedades ópticas das nanopartículas, que por sua vez, podem ser definidas na síntese das nanopartículas.

Síntese das nanopartículas de ouro

Dentre os métodos para a síntese de nanopartículas metálicas, a síntese química em fase líquida é versátil e de baixo custo, quando se compara a outros métodos de produção como a litografia de elétrons [27] e o crescimento epitaxial [29]. A reação na síntese química ocorre em geral em uma fase líquida, necessita de um precursor que fornece o material para a formação das nanopartículas, o sal de ouro, sendo o mais comum o HAuCl_4 ; de um agente redutor que tem a função de fornecer elétrons durante a reação química (diretamente ou sob efeito de algum agente externo) para reduzir os íons de ouro (Au^{3+}) para a forma metálica (Au^0); e a um agente estabilizante para dispersar as partículas no meio desejado. Essa estabilização pode ser feita com a incorporação de moléculas carregadas na superfície da nanopartícula que as mantêm afastadas por repulsão eletrostática; ou estérica, quando a nanopartícula é recoberta com moléculas de cadeia longa (polímeros ou surfactantes) que devido a sua extensão impede a aproximação das nanopartículas. A razão entre precursor metálico e o agente redutor define a morfologia da nanopartícula

Em geral, o mecanismo mais aceito para a formação das nanopartículas metálicas envolve as etapas de nucleação e de crescimento. No caso das nanopartículas de ouro, a nucleação ocorre quando a concentração de íons em solução ultrapassa uma certa concentração crítica levando à formação de pequenos aglomerados de átomos de ouro (Au^0) denominados de núcleos ou sementes [30]; as sementes mais próximas podem coalescer e formar *clusters* (~ 2 nm) em solução. Uma vez que os íons de ouro são reduzidos a sua concentração no meio diminui (abaixo concentração crítica) e não há formação de novos núcleos; a partir deste ponto ocorre somente o crescimento dos núcleos já existentes, favorecendo o crescimento

da nanopartícula. Muitos fatores podem influenciar os processos de nucleação e de crescimento das nanopartículas metálicas alterando a sua morfologia como a escolha do agente redutor, o metal precursor, o solvente, a concentração dos precursores, a temperatura, o tempo de reação, entre outros [31]. O controle do tamanho das nanopartículas de ouro pode ser obtido adicionando-se o precursor metálico em uma dispersão contendo nanopartículas. Neste caso, as nanopartículas atuam como sementes e catalisam a redução dos íons de ouro em solução [32,33].

A Fig. 3 apresenta uma ilustração da estrutura de uma nanopartícula de ouro sintetizada em fase líquida onde se observam três partes: os átomos internos compactados em uma estrutura cristalina, outra composta pelos átomos mais externos (átomos de superfície) e uma camada protetora formada por um ligante orgânico ou surfactante [1].

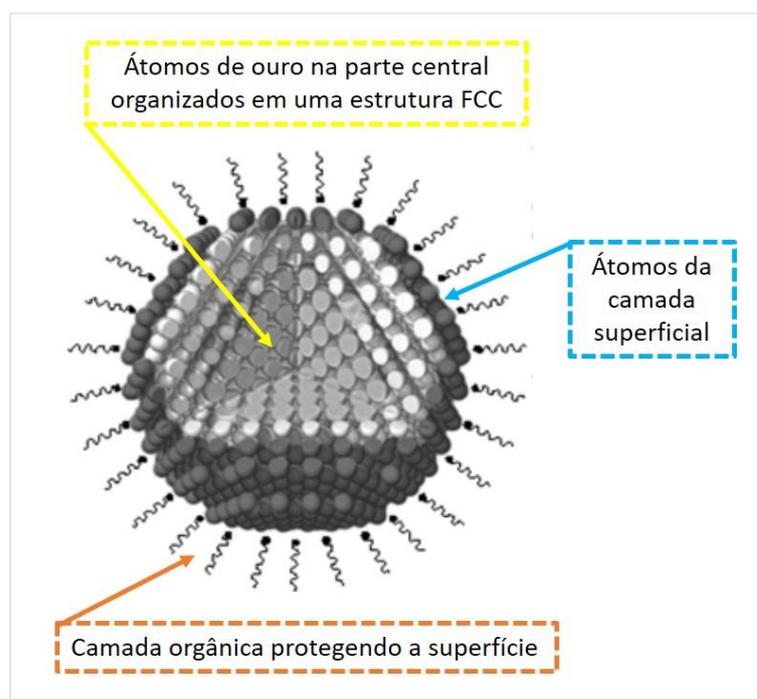


Figura 3. Modelo estrutural de uma nanopartícula de ouro. Adaptado da referência [1].

No caso das nanopartículas de ouro, quando se considera um arranjo-ideal com mínima energia, a estrutura cúbica de face centrada (FCC) com orientação dos planos cristalinos em $\{111\}$ é mais favorável, resultando numa nanoestrutura de formato quase-esférico. Como os metais possuem a estrutura cristalina bem definida, a energia de superfície depende da direção cristalográfica na sequência $\{111\} < \{100\}$

< {110} de modo que o formato da nanoestrutura pode não ser esférico, uma vez que o surgimento de pequenas arestas se faz necessário para diminuir a energia de superfície [1,30]. Portanto, para obter nanopartículas pequenas com simetria esférica é preciso expor planos cristalinos de altos índices na superfície externa, o que resulta em um aumento substancial na energia de superfície [30].

Com relação à estabilização das nanoestruturas, os ligantes ancorados nos átomos da superfície são responsáveis pela estabilização e biocompatibilidade, além de atuarem, em alguns casos, no controle do tamanho e formato da nanoestrutura quando adicionados durante a reação redox. A escolha da molécula ideal para a funcionalização da nanopartícula bem como a forma de incorporação depende das características requeridas e tipo de aplicação.

Dentre os métodos de síntese aquosa de nanopartículas de ouro o protocolo de Turkevich é um dos mais antigos e vem sendo aprimorado ao longo do tempo [9,34]. Esta abordagem utiliza o citrato de sódio como agente redutor dos íons de ouro e estabilizador das nanopartículas sintetizadas, em geral na faixa de 10-20 nm [1]. As nanopartículas coloidais são estabilizadas por meio de repulsão eletrostática devido ao citrato de sódio, mas à medida que a redução ocorre as partículas pequenas tendem a se agregar devido a “falta” de citrato para estabilizá-las aumentando a dispersão de tamanho. A incorporação de outro agente redutor, como o ácido ascórbico resulta em aumento de tamanho da nanopartícula (20-50 nm) e com menor polidispersão [1,35].

O método de Turkevich foi aprimorado por meio da incorporação de moléculas orgânicas (CTAB, PEG [35] ou copolímeros anfifílicos [36]) para introduzir uma repulsão estérica entre nanopartículas, resultando em um sistema híbrido adequado para aplicação em sistemas biológicos. Apesar dos progressos alcançados, este processo de síntese tradicional possui algumas desvantagens, como a liberação de subprodutos do agente redutor, exigência de altas concentrações de agentes protetivos e múltiplas etapas de síntese; aliado a isso, o aumento da estabilidade promovida pela ligação química (ligação covalente) do ligante na superfície da nanopartícula pode modificar a densidade eletrônica alterando a sua propriedade óptica [14]. Um método simples em uma única etapa, que permite controlar o tamanho e o formato das nanoestruturas, promove a sua estabilização e fornece nanoestruturas coloidais que podem ser biocompatíveis foi desenvolvido por Sakai e Alexandridis [11].

O método desenvolvido por Sakai e Alexandridis [11] mistura os íons de ouro AuCl_4^- ao produto da linha comercial Pluronic® que engloba a família de copolímeros em blocos com a estrutura do tipo PEO-PPO-PEO, sendo PEO: Poli(óxido de etileno) e PPO: Poli(óxido de propileno). É utilizado como agente redutor dos íons de ouro, ao mesmo tempo que produz a estabilização do coloide. Em adição, no método proposto a síntese é realizada em solução aquosa, à temperatura ambiente e sem a necessidade de produtos químicos adicionais.

Vários estudos foram realizados sobre o método proposto por Sakai e Alexandridis, de modo que o processo de formação das nanopartículas de ouro apresentado considera três eventos sequenciais. Primeiramente, os íons de ouro AuCl_4^- são complexados com a cadeia do polímero por meio das pseudo “coroas” de éter onde são reduzidos para a forma metálica (Au^0) mediante a oxidação do polímero; nesse momento, a contribuição dos blocos hidrofílicos (PEO) é mais significativa. Uma vez que núcleos de ouro metálico (menos polares) são formados em solução, os blocos hidrofóbicos (PPO) adsorvem em sua superfície e a redução dos íons circundantes se dá preferencialmente nessa região; desta forma, ocorre o crescimento das nanopartículas. A competição entre a redução dos íons de ouro na solução e na superfície das sementes determina a morfologia da nanopartícula. O resultado da competição é influenciado pelas características do copolímero em bloco (solubilidade, formação de micela, estrutura micelar) e pelas características do meio (tipo solvente e temperatura) [37]. Considerando-se o meio aquoso e a temperatura ambiente, a dinâmica de formação das nanopartículas depende, principalmente, da massa molar do copolímero e da razão entre os blocos PEO/PPO. Consequentemente, os diferentes tipos de Pluronic tendem a favorecer a redução dos íons de ouro e a formação das nanopartículas na seguinte ordem $\text{P103} < \text{P105} < \text{F127} < \text{F108}$ que apresentam massa molar e razão molar entre os blocos de 4950 g mol⁻¹ e 0,56; 6500 g mol⁻¹ e 1,36; 12600 g mol⁻¹ e 3,07; e 14600 g mol⁻¹ e 5,28, respectivamente [14]. Quanto maior a massa molar e o comprimento dos blocos hidrofílicos mais forte será a interação íon-dipolo entre os íons de ouro e o par de elétrons isolado dos átomos de oxigênio do PEO; mais íons de ouro poderão ser reduzidos o que leva ao aumento do tamanho da nanopartícula. Uma vez escolhido o tipo de copolímero, o tamanho da nanopartícula também pode ser controlado variando-se a concentração do copolímero e a do íon metálico. Por outro lado, alterando-se as condições de síntese, como por exemplo a temperatura, haverá um aumento da hidrofobicidade do

copolímero devido à desidratação dos blocos de PEO e PPO diminuindo a concentração micelar crítica (CMC) do copolímero. Como consequência, a redução dos íons de ouro na superfície das sementes já formadas é favorecida em relação à redução no meio (*bulk*) e, portanto, as nanopartículas tendem a ser maiores [37].

Entre as diversas opções de copolímeros em bloco do tipo PEO-PPO-PEO disponíveis no mercado o Pluronic F127 possui algumas características importantes, tais como: não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de ser aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) o que permite a sua aplicação em humanos [38]. Tem sido amplamente utilizado na administração e liberação controlada de fármacos ou fotossensibilizadores [39] por ter uma estrutura química anfifílica e formar estruturas auto organizadas [40,41].

A estrutura química do Pluronic F127 consiste em um arranjo linear composto por 100 unidades repetitivas de óxido de etileno (EO) nas extremidades e 65 unidades de óxido de propileno (PO) no centro, conforme a ilustração da Fig. 4(a). É um copolímero tribloco neutro e a grande quantidade de grupos de óxido de etileno garante a sua solubilidade em água [40]. A Fig. 4(b) apresenta o arranjo da cadeia anfifílica do F127 (PLU) em solução aquosa com a concentração menor ou maior do que a CMC igual a $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ a 25°C [42].

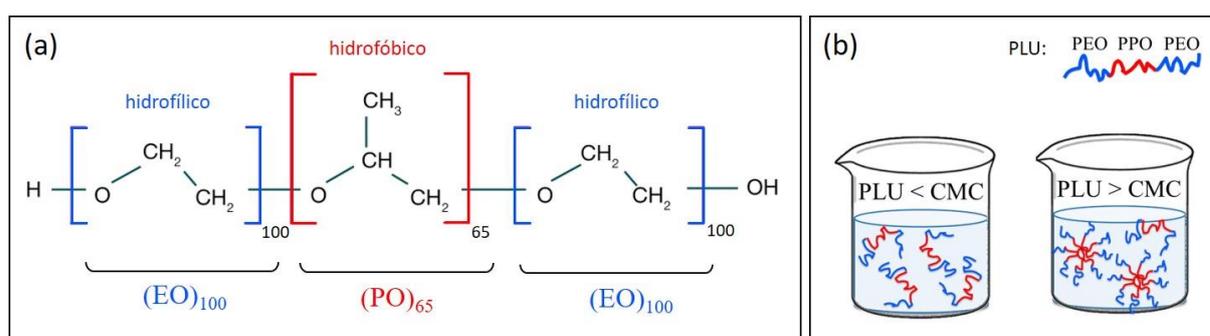


Figura 4. (a) Estrutura química do Pluronic F127 (PLU) sendo EO o óxido de etileno (hidrofílico) e PO o óxido de propileno (hidrofóbico); (b) Ilustração do regime não micelar (concentrações abaixo da CMC) e micelar (concentrações de PLU acima da CMC).

As cadeias do copolímero PLU, em concentrações abaixo da CMC, se dispersam em solução com ordenamento preferencialmente na superfície do líquido devido à forte aversão à água sofrida pelos blocos hidrofóbicos. Com o aumento da concentração de PLU ($> \text{CMC}$) a interface ar-água fica saturada de moléculas e

estruturas auto organizadas (micelas) se formam espontaneamente para minimizar a energia do sistema. Esse arranjo é causado pela aproximação dos blocos hidrofóbicos (apolares - PPO) que não possuem afinidade com a água, mas possuem afinidade entre si, e pela exposição da parte hidrofílica (PEO) ao meio aquoso promovendo a estabilidade do sistema [43]. O resultado é a formação de uma estrutura “*core-shell*” (núcleo-casca) formada pelos blocos PPO e PEO, respectivamente, conforme a ilustração da Fig. 4(b). Esse arranjo micelar favorece à incorporação de outras moléculas (corantes, fármacos e entes biológicos) bem como facilita a formação de nanopartículas, por exemplo as de ouro, que foram sintetizadas neste trabalho.

Nanopartículas de ouro podem ser preparadas com diversos tipos de polímeros com a síntese fotoassistida [17,18]. Neste caso, a radiação UV ativa a reação redox permitindo o controle da reação (nucleação e crescimento) [32], garantindo a reprodutibilidade e facilitando a produção em larga escala. Em adição, as nanopartículas tendem a ser monodispersas com uma diminuição considerável do tempo de síntese.

O estudo realizado por Teixeira et al. [18] mostrou que é possível sintetizar AuNPs esféricas utilizando a polietilenimina (PEI) como agente de nucleação e estabilizador das nanopartículas com a síntese impulsionada por radiação UV (254 nm, 16W). O grupo amina (-NH₂) presente nesse polímero em condições normais de temperatura e iluminação apresentam poder de redução muito baixo e por isso, a presença da radiação UV na reação redox é fundamental para a reação ocorrer em 30 min. Variando-se a razão molar entre PEI/ HAuCl₄ é possível obter nanopartículas entre 100 e 8 nm.

Soluções contendo surfactantes iônicos (aniônicos: SDBS e SDS e catiônicos: DTAB e CTAB) e não-iônico (Triton-X-100) foram utilizados por Shang et al. [17] para reduzir os íons tetracloroáurico AuCl₄⁻ com a síntese sob irradiação UV (300 W) a temperatura ambiente por 12h. Mantendo-se a mesma concentração dos reagentes e alterando-se o tipo de surfactante observou-se que nanopartículas de ~5 nm são formadas quando se utiliza o surfactante aniônico. A repulsão eletrostática entre a superfície negativa das micelas de SDS e SDBS repelem os íons AuCl₄⁻ dificultando a sua redução. Por outro lado, surfactantes catiônicos (DTAB e CTAB) promovem a atração entre o surfactante e os íons de ouro facilitando a interação e redução. O resultado são AuNPs com diâmetro médio de ~ 20 nm. E com o surfactante não iônico os íons são atraídos para o núcleo hidrofóbico do sistema micelar onde são reduzidos,

e o tamanho adquirido é intermediário. Por outro lado, Mallick et al. [32] mostrou que é possível sintetizar maiores AuNps (~ de 80 nm) utilizando o surfactante Triton-TX-100 por sucessivas etapas de adição de íons de ouro e 60 min irradiação UV (15W, 254 nm).

Com o copolímero tribloco Pluronic F127, Santos et al. [20] mostraram que AuNPs de 4 nm podem ser preparadas com irradiação da mistura reacional por 2h a 60°C. Esta reação ocorre sob agitação. Isso facilita a difusão dos íons ao mesmo tempo que impede o crescimento das AuNPs.

2.2 Aplicações

As nanoestruturas de ouro podem ser empregadas em diversas áreas da nanomedicina devido a presença de propriedades únicas exibidas pelas AuNPs nessa escala. Elas podem atuar como sensores químicos ou biológicos quando suspensas em um meio líquido ou dispersas em uma matriz polimérica; e a interação das AuNPs com a substância que se deseja produz um sinal detectável que pode ser pela alteração das suas propriedade ótica (banda LSPR e/ou cor dispersão) ou eletrônicas (condutividade)[44,45].

Por outro lado, as AuNPs podem atuar no diagnóstico, como por exemplo, agente de contraste. Devido ao seu elevado número atômico e ao maior tempo de circulação no organismo o ouro coloidal tem se mostrado como uma alternativa promissora na Microtomografia computadorizada (micro-CT)[6]. Elas também podem atuar como agente de contraste na imagem fotoacústica guiada por ultrassonografia como mostra o trabalho de Nam et al. [46].

As AuNPs também podem ser utilizadas na terapia fototérmica onde a absorção da radiação incidente é convertida em calor promovendo um efeito chamado de hipertermia. Este aquecimento localizado causa a citotoxicidade da região tumoral contribuindo para o tratamento de diversas patologias. Para isto, a banda plasmônica (LSPR) das AuNPs devem estar localizadas na janela biológica (~ 700 nm)[47].

Recentemente, Simon et al. [48] utilizaram um nanocompósito híbrido multifuncional, formado por nanopartículas de ouro e PLU para aplicação na terapia fotodinâmica. O nanocompósito combina o sinal SERS (Espalhamento Raman de

Superfície Intensificada) produzido pelas nanopartículas e a fluorescência de moléculas de azul de metileno adicionadas na cadeia do PLU.

A funcionalização das AuNPs com polímeros podem formar um nanocompósito híbrido que possibilita a incorporação de fármacos ou entes biológicos. Neste caso, as AuNPs podem atuar como um agente de entrega direcionado (*drug delivery*) e atuar simultaneamente no diagnóstico e tratamento de doenças[45].

E, nanopartículas de ouro pequenas (< 5 nm) possuem atividade catalítica podendo promover reações químicas, tais como, a produção de espécies de oxigênios reativos (ROS). Isso se deve a elevada área superficial que altera a estrutura eletrônica dos átomos de superfície em AuNPs menores.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e os procedimentos experimentais empregados na síntese dos nanocompósitos e as configurações de cada técnica utilizada na caracterização dos nanomateriais produzidos serão descritos neste capítulo.

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados neste trabalho, fornecidos pela Sigma-Aldrich e usados sem purificação adicional foram: o ácido tetracloroáurico tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $393,83 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) como fonte de íons de ouro Au^{3+} ; o copolímero tribloco poli(óxido etileno)₁₀₀-poli(óxido propileno)₆₅-poli(óxido de etileno)₁₀₀ comercialmente disponível como *Pluronic F-127* ($12.600 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$); e o cloreto de ftalocianina de alumínio - AICIPc ($\text{C}_{32}\text{H}_{16}\text{AlClN}_8$, $574,96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). As soluções foram preparadas com água ultra-pura de resistividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ fornecida por um purificador Millipore (Mili-Q). A solução de AICIPc foi preparada em solvente orgânico (etanol) e dissolvida na solução aquosa de PLU seguindo o protocolo estabelecido por Py-Daniel et al. [41] com concentração de AICIPc igual a $5 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente limpas com solução de HCl/HNO_3 (água régia) preparadas numa proporção em volume de 3:1, enxaguadas várias vezes com água ultra pura.

3.2 Síntese dos nanocompósitos AuNP-PLU

Inicialmente as soluções estoque de copolímero *Pluronic* F-127 (PLU) e de HAuCl_4 foram preparadas com água ultra-pura e deixadas *overnight* a 10 °C, a partir das quais foram obtidas nove soluções de PLU com as concentrações: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mmol.L^{-1} e quatro concentrações de HAuCl_4 com as concentrações: 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mmol.L^{-1} . A faixa de concentrações de PLU adotada abrange pontos acima e abaixo da CMC do copolímero [42].

O protocolo utilizado para a síntese dos nanocompósitos AuNP-PLU consiste no preparo de misturas reacionais (3 mL) a partir das soluções aquosas de PLU e HAuCl_4 na proporção em volume de 10:1 [11]. Cada mistura foi preparada em um béquer de vidro borossilicato e agitada manualmente por 10 s. Em seguida, a solução foi transportada para a câmara de reação com exposição à radiação UV (254 nm, 16W) a 25° C (Apêndice E), permanecendo por um período de até 50 min necessário para a formação das nanopartículas.

Dois tipos de amostras controle foram preparados de modo análogo, porém sem a presença da radiação UV. Essas amostras foram deixadas sobre a bancada com exposição à luz e temperatura ambientes (23 °C). No segundo caso, as soluções foram mantidas em local escuro (sem luz e à temperatura de 23 °C). Nestes dois procedimentos, o período necessário para a formação das nanopartículas foi de até 300 min.

A Fig. 5 apresenta a ilustração dos procedimentos adotados para a síntese dos nanocompósitos preparados neste trabalho.

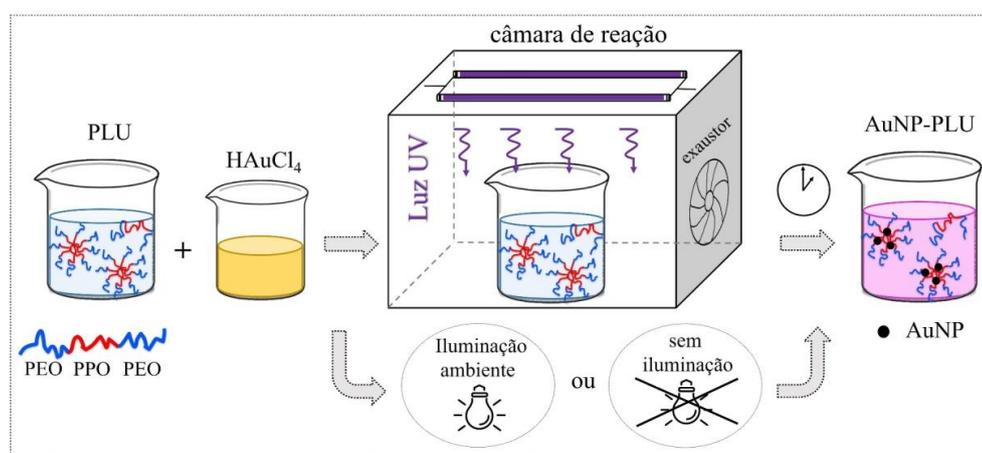


Figura 5: Ilustração das etapas de síntese dos nanocompósitos: preparo da mistura reacional com as soluções de PLU e HAuCl_4 ; em seguida, essa mistura é fotoexcitada com radiação UV (254nm, 16W)

na câmara de reação (25°C) ou deixada sob a bancada com ou sem iluminação ambiente à 23°C. Após um certo intervalo de tempo observa-se a alteração de cor da solução.

A Fig. 6 apresenta a câmara de reação construída para a síntese fotoexcitada. Ela consiste em uma caixa com dimensões de 31x16x12 cm revestida internamente com material refletor. Na parte superior há uma fonte de radiação UV composta por duas lâmpadas de vapor de Hg (Osran), 254 nm, cada uma com potência de 8 W, localizadas a 10 cm da amostra. Em um dos lados foi fixado um exaustor para evitar o aquecimento interno (Fig. 6b) e uma sonda (termômetro) foi colocada dentro da câmara para monitorar a temperatura durante o processo de síntese fotoexcitada (Fig. 6c).

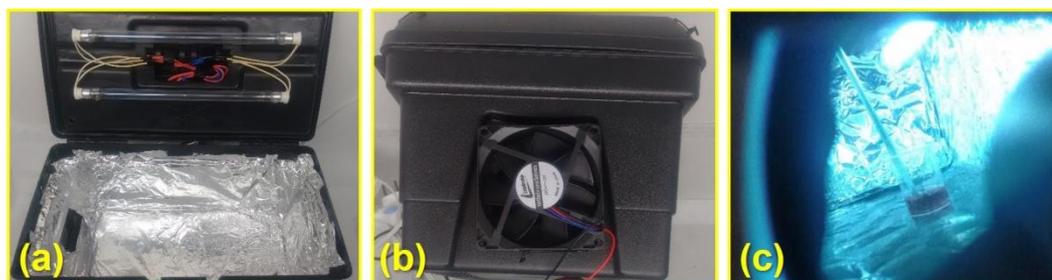


Figura 6: Câmara utilizada na síntese fotoexcitada dos nanocomplexos AuNP-PLU. (a) parte interna revestida com papel laminado e com duas lâmpadas UV (254 nm e 8 W cada); (b) ventilador fixado na lateral na parte lateral (c) termopar para monitorar a temperatura a mostra.

Os dois conjuntos (I e II) de amostras sintetizadas neste trabalho estão descritos na Tab. 1. No conjunto I avaliou-se o efeito da concentração de PLU (0,1 a 10 mmol L⁻¹) na formação dos nanocompósitos mantendo-se fixa a concentração do precursor metálico em 2 mmol L⁻¹. Essas amostras foram nomeadas, sequencialmente de 1 a 9, de acordo com o aumento da concentração de PLU. Dentro desse conjunto também se avaliou o efeito da radiação UV na formação dos nanocompósitos. Para isso, amostras controle foram preparadas nas mesmas concentrações e mantidas à luz e temperatura ambientes (23 °C). Essas amostras foram identificadas com a mesma sequência numérica seguida da indicação “A”, ambiente, portanto foram sintetizadas as amostras AuNP-PLU:1A, AuNP-PLU:2A, AuNP-PLU:3A, AuNP-PLU:4A, AuNP-PLU:5A, AuNP-PLU:6A, AuNP-PLU:7A, AuNP-PLU:8A e AuNP-PLU:9A. Enquanto as amostras que foram expostas à radiação UV

foram indicadas por “F”, de fotoexcitação, e nomeadas como AuNP-PLU:1F, AuNP-PLU:2F, AuNP-PLU:3F, AuNP-PLU:4F, AuNP-PLU:5F, AuNP-PLU:6F, AuNP-PLU:7F, AuNP-PLU:8F e AuNP-PLU:9F. Conforme foi mencionado, outra amostra controle foi preparada sem a presença de luz, indicada por “E”, de escuro, apenas a AuNP-PLU:5E. Resumindo, os nanocompósitos nomeados por AuNP-PLU:5F, AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5E correspondem às amostras com 2 mmol L⁻¹ de PLU e de HAuCl₄ sintetizados com radiação UV (fotoexcitação), com luz ambiente e no escuro, respectivamente.

Tabela 1. Identificação dos nanocompósitos AuNP-PLU: X preparados neste trabalho, em que “X” representa um número de 1 a 12. No conjunto I (amostras de 1 a 9) a concentração de PLU variou de 0,1 a 10 mmol L⁻¹ com HAuCl₄ fixo em 2 mmol L⁻¹. No conjunto II a concentração de PLU permaneceu constante e a concentração de HAuCl₄ variou de 1,0 a 4,0 mmol L⁻¹. A indicação “F”, “A” e “E” foi utilizada para diferenciar as amostras fotoexcitadas e amostras controle (ambiente e escuro), respectivamente.

AuNP-PLU:X	UV (Fotoexcitação - F)		Luz ambiente (Ambiente - A)		Sem Luz (Escuro - E)		
	[PLU]	[HAuCl ₄]	[PLU]	[HAuCl ₄]	[PLU]	[HAuCl ₄]	
	(mmol L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)	
Conjunto I	1	0,1	2,0	0,1	2,0	-	-
	2	0,3	2,0	0,3	2,0	-	-
	3	0,5	2,0	0,5	2,0	-	-
	4	1,0	2,0	1,0	2,0	-	-
	5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	6	4,0	2,0	4,0	2,0	-	-
	7	6,0	2,0	6,0	2,0	-	-
	8	8,0	2,0	8,0	2,0	-	-
	9	10,0	2,0	10,0	2,0	-	-
Conjunto II	10	2,0	1,0	-	-	-	-
	11	2,0	3,0	-	-	-	-
	12	2,0	4,0	-	-	-	-

O conjunto II, que se refere apenas às amostras fotoexcitadas, a concentração de PLU foi fixa igual a 2 mmol L⁻¹ e variou-se a concentração de HAuCl₄ no intervalo

de 1 a 4 mmol L⁻¹. Essas amostras foram nomeadas AuNP-PLU:10F, AuNP-PLU:11F e AuNP-PLU:12F e estão listadas na Tab. 1.

A remoção do excesso de PLU dos nanocompósitos foi realizada por meio de centrifugação, (MiKro 22R, Hettich zentrifugen) a 12.000 rpm por 120 min a 10°C. Um volume fixo (1840 µL) de sobrenadante incolor de PLU foi coletado e o corpo de fundo, quando necessário, ressuspendido em água ultrapura.

3.3 Crescimento das AuNPs via sementes de Au(0)

Uma alíquota dos nanocompósitos AuNP-PLU:4F e AuNP-PLU:5F foi empregada no processo de crescimento das NPs, fazendo-se uma adaptação do protocolo utilizado por Mallick et al. [32]. As AuNPs presentes nos nanocompósitos serviram como centros de nucleação para o crescimento de novas AuNPs. Foram adicionados íons de ouro Au(III) a 0,1 mmol L⁻¹ (HAuCl₄) na proporção em volume de 1:1, para um volume final de 3 mL, obtendo-se a razão Au(III)/Au(0) = 0,5 às amostras AuNP-PLU:4F e AuNP-PLU:5F. A nova mistura reacional de cada amostra foi fotoexcitada por 40 min até a formação dos novos nanocompósitos identificados por AuNP-PLU:4F-*grown* e AuNP-PLU:5F-*grown*, respectivamente.

3.4 Técnicas de Caracterização

Espectroscopia no ultravioleta e visível [49,50]. Os espectros de absorção no UV-vis (intervalo de 185 a 900 nm) foram obtidos empregando-se o espectrofotômetro Shimadzu UV-2600, com resolução de 0,1 nm, a uma taxa de varredura de 600 nm/min (0,1 s de integração por 1 nm) em cubetas de quartzo com passo de 10 mm. Para o estudo cinético da formação das nanopartículas os espectros foram adquiridos da seguinte forma: Inicialmente a cada 1 min de exposição à luz UV por até 5 min; em seguida, a cada 5 min até 30 min de irradiação; e por fim, a cada 10 min até 50 min de fotoexcitação, totalizando 13 espectros. As amostras controle (sob luz ambiente ou no escuro) tiveram a mesma sequência de medidas até 50 min após a mistura. Como a reação é mais lenta, os espectros foram adquiridos em 60 min e em intervalos de 30 min até atingir 300 min a partir do instante da mistura dos

reagentes, totalizando 22 espectros. Esta técnica também foi utilizada para monitorar a reprodutibilidade e a estabilidade dos coloides ao longo do tempo após a síntese.

Espectroscopia no infravermelho [49,51]. Os espectros de infravermelho foram adquiridos por meio de refletância total atenuada (ATR) no espectrômetro Novotex 70, Bruker com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 1 varredura/min durante 27 min. Volumes de $10\ \mu\text{L}$ da dispersão coloidal AuNP-PLU ou da solução de PLU puro foram gotejados sobre o cristal de ATR e deixados secar. Nesse intervalo espectros sucessivos foram registrados monitorando a faixa de estiramento da hidroxila da água (vO-H) para confirmar que a amostra foi seca antes de registrar seu espectro característico.

A técnica FTIR-ATR foi utilizada para estudar o comportamento estrutural da cadeia do PLU e as modificações que foram causadas devido à presença das AuNPs.

Espectroscopia Raman [52]. Os espectros Raman das amostras secas foram adquiridos à temperatura ambiente com configuração micro-Raman (objetiva com aumento 50X) utilizando-se o espectrômetro triplo Jobin Yvon Model T64000 equipado com um detector CCD (*charge coupled device*) refrigerado com nitrogênio líquido. A linha de 633 nm do laser de He-Ne foi utilizado para excitar a amostra com intensidade de aproximadamente 1,7 mW. Esta técnica foi utilizada para obter informações acerca da localização das AuNPs na cadeia do PLU.

Microscopia eletrônica de transmissão [53]. A morfologia das AuNPs foi observada em micrografias obtidas no microscópio JEOL JEM-2100 a 200 keV. O diâmetro médio (D_M) e o índice de polidispersão (σ) dos nanocompósitos foi determinado por meio da construção de histogramas de tamanho ajustados com uma função de distribuição log-normal. O diâmetro de aproximadamente 900 partículas medidos com o auxílio do software ImageJ em diferentes imagens de microscopia foram usados para construir os histogramas. O excesso de PLU das amostras analisadas foi removido por centrifugação, conforme descrito anteriormente.

Espalhamento dinâmico de luz - EDL [54]. O tamanho hidrodinâmico (D_H) dos nanocompósitos foi determinado por meio de medidas EDL, e de mobilidade eletroforética, respectivamente, realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS® - Malvern Instruments. As análises foram realizadas em um ângulo de espalhamento de 173° a 25°C utilizando o laser He-Ne de 4mW operado a 632,8 nm. As medidas foram realizadas após a síntese dos AuNP-PLU sem diluição ou remoção do excesso

de PLU. Para a determinação do D_H a viscosidade da solução de PLU foi inserida no software Zetasizer-Malvern.

Ultracentrifugação analítica [55]. Os nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A, sintetizados por fotoexcitação e luz ambiente, respectivamente, foram caracterizados pela metodologia da velocidade de sedimentação na ultracentrifugação analítica usando uma ultracentrífuga *Proteome-Lab XL-A / XL-I* (Beckman Coulter, EUA) equipada com um rotor de titânio *An-60 Ti* de 4 furos, células com 12 mm de comprimento e peça central de duplo canal e janelas de quartzo (Beckman, EUA). O setor de referência de cada célula foi preenchido com 425 μL de água deionizada e o setor de amostra com 400 μL do nanocompósito sem o excesso de PLU. O ensaio foi realizado a 2500 rpm a 20°C em um sistema a vácuo. A absorbância foi medida em dois comprimentos de onda (260 e 530 nm) em intervalos de 2 min com resolução radial de 0,007 cm. Cerca de 50 varreduras foram coletadas para cada comprimento de onda analisado antes da completa sedimentação das nanopartículas no interior da célula. As varreduras radiais foram analisadas usando o modelo de distribuição de tamanho $Is-g^*(s)$ empregando o software *SEDFIT v14.7* com 95% de confiabilidade. Por meio desta técnica estudou-se a uniformidade de tamanho dos coloides sintetizados com radiação UV (AuNP-PLU:5F) e o controle (AuNP-PLU:5A) obtendo-se o coeficiente de sedimentação e a abundância relativa das nanopartículas.

Análise termogravimétrica [51]. As curvas TG foram obtidas utilizando-se o DTG 60 systems, Shimadzu, com taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de N_2 a partir da temperatura ambiente até 600 °C. Para obtenção do material sólido a dispersão coloidal foi centrifugada e o corpo de fundo contendo AuNP-PLU foi seco utilizando SpeedVac Concentrator, SPD121P, com Refrigerated Vapor Trap, RVT400, Savant por 4 horas. Esta técnica foi utilizada para estimar o teor orgânico contido no nanocompósito AuNP-PLU. Uma vez que o ponto de fusão do ouro ocorre a altas temperaturas ($\sim 1000^\circ\text{C}$) [1] considerou-se que somente a fusão do PLU ocorre no intervalo analisado.

Voltametria cíclica [51]. Os voltamogramas cíclicos foram registrados com o potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT 204 numa célula de configuração de três eletrodos (eletrodo de referência Ag/AgCl, contra eletrodo de Pt e o eletrodo de trabalho ITO com área ativa de 0,60 cm^2) preenchido com as misturas de HAuCl_4 , PLU ou amostras de AuNP-PLU diluídas em KCl (0,1 mol L^{-1}) (eletrólito suporte) na

proporção de 1:1 v/v. As varreduras foram realizadas a 25°C a uma taxa de 50 mV s⁻¹ no intervalo de 0,5 a 1,2 V sentido anódico. Antes de cada medida a cela foi purgada com fluxo de N₂ por 5 min. Os experimentos de voltametria cíclica foram utilizados para obtenção dos potenciais de oxidação e redução do PLU e do HAuCl₄ e para verificar a presença de íons de ouro não reduzidos na dispersão coloidal porque esta técnica é muito mais sensível à presença de íons do que a espectroscopia de UV-Vis comumente utilizada para este fim.

Espectrometria de absorção atômica [56]. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas da SED-Mineração do estado de Goiás, e usadas para determinar a concentração de ouro (Au) nas amostras sintetizadas.

Calorimetria de titulação isotérmica [57]. O nanocompósito AuNP-PLU: 5A sintetizado sob luz ambiente foi analisada por meio da técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) com o objetivo de obter os parâmetros termodinâmicos do processo de formação das nanopartículas de ouro na presença do PLU. As medidas de ITC foram realizadas no calorímetro MicroCal VP-ITC (GE Healthcare Corporation). Inicialmente, as soluções de PLU e HAuCl₄ foram completamente desgaseificadas por agitação suave sob vácuo por 10 min. Em seguida, foi realizada a titulação do HAuCl₄ e do PLU em água destilada para determinar os calores de mistura e de diluição para ser subtraído do calor encontrado na titulação do HAuCl₄ em PLU. Posteriormente, a célula amostra (1,44 mL) foi preenchida com solução de PLU a 2 mmol L⁻¹ e a célula de referência com água deionizada. A célula amostra foi mantida a 25°C em agitação constante de 242 rpm pela rotação da seringa. A solução de HAuCl₄ a 2 mmol L⁻¹ (titulante) foi colocada na seringa, de modo que a solução foi injetada na célula amostra em 29 vezes. Na primeira etapa foram injetados 2 µL, enquanto as injeções subsequentes foram de 10 µL a uma taxa de 0,5 µL/s com intervalos de injeção de 462 s. O calor de cada injeção foi determinado pela integração da área de cada pico correspondente ao calor liberado por segundos em função da razão molar [HAuCl₄]/[PLU].

Antes da realização dos experimentos de titulação isotérmica foi realizado um experimento preliminar utilizando espectroscopia de UV-vis, para verificar se a reação entra em equilíbrio no intervalo estabelecido entre cada adição fracionada do HAuCl₄ e se o nanocompósito produzido pela adição de volume fracionado de HAuCl₄ ao PLU não altera a formação do nanocompósito e, conseqüentemente, as suas características óticas. O procedimento empregado consistiu das seguintes etapas: o

volume de 300 μL de HAuCl_4 (2 mmol L^{-1}) foi dividido para obter 20 adições de 15 μL em uma solução de 2700 μL de PLU (2 mmol L^{-1}), enquanto o espectro de UV-vis foi adquirido após 4 min e após 8 min da adição de HAuCl_4 . Os dados obtidos indicaram que as condições necessárias para a realização do estudo termodinâmico por ITC não alterariam as características do nanocompósito produzido.

3.5 Ensaio biológico

A avaliação da biocompatibilidade dos nanocompósitos produzidos foi realizada *in vitro* com a linhagem celular de fibroblastos murinos (NIH-3T3, ATCC® CRL-1658TM) que foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco® LifeTechnologies, Ltd., USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (Gibco® Invitrogen™, USA) e 100 U mL^{-1} penicilina e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estreptomicina (Sigma–Aldrich) em uma incubadora com 5% CO_2 e humidade 80% à 37 °C. Para a avaliação da citotoxicidade, 5×10^3 células/poço foram semeadas em placas de 96 poços. Após 24 h, as células foram expostas às soluções de cultura contendo PLU ou AuNP-PLU em diferentes concentrações, em percentagem da concentração inicial de PLU de 0,4 a 25,0%, e incubadas por 15 min ou 24 h. Para 15 min de exposição, foi feita a remoção das soluções de tratamento, lavagem com PBS (2x) e restabelecimento das condições de cultivo por 24 h. A citotoxicidade foi determinada por meio do ensaio MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). A solução MTT (0,5 mg/mL, 150 μL /poço) foi adicionada aos poços e as células incubadas por 2 h a 37 °C e 5% de CO_2 . O produto colorimétrico (cristais de formazan) foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e quantificado no espectrofotômetro (Molecular Devices SpectraMax, USA) a 595 nm. Foram realizados três ensaios independentes e, em cada ensaio, as concentrações foram testadas em triplicata. Os dados foram normalizados em relação ao grupo controle (células sem tratamento). A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 5 com análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey com significância de $p < 0,05$.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos sobre a formação e caracterização dos nanocompósitos (fotoexcitação e controle) formados por nanopartículas de ouro dispersas em Pluronic F127 (PLU) produzidos neste trabalho.

4.1 Formação dos nanocompósitos

Com o objetivo de avaliar o efeito da radiação UV na formação dos nanocompósitos de ouro/pluronic, amostras controle foram preparadas a partir do protocolo de síntese disponível na literatura que emprega PLU para reduzir e dispersar as AuNPs formadas [11,13,14].

As amostras AuNP-PLU:1A, AuNP-PLU:2A, AuNP-PLU:3A, AuNP-PLU:4A, AuNP-PLU:5A, AuNP-PLU:6A, AuNP-PLU:7A, AuNP-PLU:8A e AuNP-PLU:9A, foram sintetizadas em ambiente, enquanto a amostra AuNP-PLU:5E foi sintetizada à temperatura ambiente e no escuro, cujas características estão listadas na Tab. 1. Esses nanocompósitos foram caracterizados por várias técnicas (descritas na seção 3.5) cujos resultados permitiram estudar o processo de formação dos nanocompósitos controle e obter um parâmetro de referência para a síntese fotoexcitada.

Para a síntese dos nanocompósitos sob irradiação UV, o primeiro passo foi obter os espectros UV-vis para identificar as transições eletrônicas, características das soluções de HAuCl₄ e PLU, com e sem fotoexcitação. Em seguida, a mistura reacional (HAuCl₄ + PLU) foi preparada e levada à câmara de reação com fotoexcitação pelo mesmo intervalo de tempo.

A Fig. 7 apresenta os espectros Uv-vis das soluções precursoras de PLU e HAuCl_4 , ambos na concentração de 2 mmol L^{-1} , após serem fotoexcitadas por 10 min. A mistura reacional preparada nessas concentrações no instante da mistura ($t=0\text{min}$) e depois ($t=10 \text{ min}$) da fotoexcitação que originou o nanocompósito AuNP-PLU:5F escolhido como referência. Como controle, duas amostras foram preparadas nas mesmas concentrações e deixadas sob iluminação ambiente (AuNP-PLU:5A) e sem a presença de luz (AuNP-PLU:5E). Neste caso, o espectro foi adquirido após 60 min da mistura reacional.

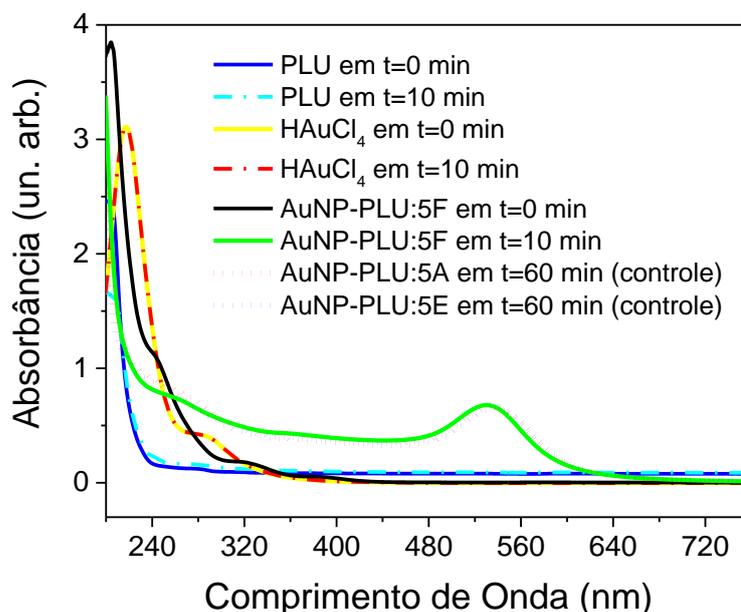


Figura 7: Espectros de Uv-vis das amostras: soluções aquosas de PLU e HAuCl_4 , ambas na concentração de 2 mmol L^{-1} antes e depois de 10 minutos de fotoexcitação; o nanocompósito AuNP-PLU:5F em $t=0$ (após a mistura dos precursores) e $t=10 \text{ min}$ de fotoexcitação; e as amostras controle AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5E após 60 min da mistura, sob iluminação ambiente e sem luz, respectivamente.

Observa-se nos espectros da Fig. 7 que as soluções de PLU e HAuCl_4 irradiadas individualmente apresentam o mesmo espectro da condição sem irradiação, indicando que o processo de fotoexcitação não promove mudanças na estrutura eletrônica desses precursores. Observa-se no espectro da solução de HAuCl_4 uma banda intensa na região de 220 nm relativa à transição de transferência de carga entre ligante e metal ($\pi \rightarrow \sigma^*$) conhecida como banda LMCT (*ligand to metal charge transfer transition*) associada à presença dos íons de ouro AuCl_4^- no meio aquoso. A solução de PLU não apresenta nenhuma transição eletrônica na faixa do

UV-vis investigada. Quando a mistura reacional é preparada ($t=0$ min) observa-se um deslocamento da banda LMCT de 220 nm para 322 nm provavelmente devido à coordenação dos íons de ouro com a cadeia do PLU. Quando a mistura é irradiada por 10 min observa-se a banda LSPR (ressonância plasmônica de superfície localizada) em 526 nm, associada às nanopartículas de ouro formadas, presentes no nanocompósito AuNP-PLU. Por outro lado, amostras controle sintetizadas com luz ambiente e no escuro (AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5E) apresentam espectros idênticos com banda LSPR em 536 nm após 60 min, tempo necessário para a redução do AuCl_4^- e formação das nanopartículas de ouro. Quando a reação ocorre na presença da luz UV, o espectro de UV-vis apresenta um pequeno deslocamento da banda plasmônica (LSPR) em relação às amostras controle para menores comprimentos de onda (de 536 para 526 nm) indicando a formação de AuNPs menores.

A morfologia dos nanocompósitos sintetizados com e sem fotoexcitação foi investigada por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). A Fig. 8 apresenta imagens de MET e os histogramas de distribuição de tamanho obtidos, ajustados com uma função de distribuição log-normal, dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F (a) e AuNP-PLU:5A (b). Os diâmetros médios obtidos (D_M) foram de $12,2 \pm 0,2$ nm ($\sigma=0,2$) e $18,5 \pm 0,2$ nm ($\sigma=0,3$) para os nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A, respectivamente. Observa-se ainda que o nanocompósito AuNP-PLU:5F (Fig. 8(a)) sintetizado sob fotoexcitação (10 min) apresenta formato quase esférico, enquanto o controle AuNP-PLU:5A (Fig. 8(b)) que foi deixado sobre a bancada por 60 min apresenta um formato poligonal predominante, e diâmetro maior. Nanopartículas de ouro com diâmetro médio entre 20 e 30 nm preparadas pelo método padrão utilizando citrato de sódio (método Turkevich) exibem banda LSPR em 525 nm. A amostra controle AuNP-PLU:5A que possui diâmetro médio semelhante possui a banda LSPR em 536 nm. Esta diferença é atribuída a presença de polímero na superfície das AuNPs que induz o deslocamento para o vermelho da banda plasmônica devido ao aumento do índice de refração ao redor das AuNPs[48].

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução mostram os planos cristalinos das nanopartículas de ouro (Fig. 8(c) e (d)). As distâncias interplanares $d \sim 2,37$ Å correspondem aos planos cristalinos {111} da estrutura fcc (cúbica de face centrada) (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*).

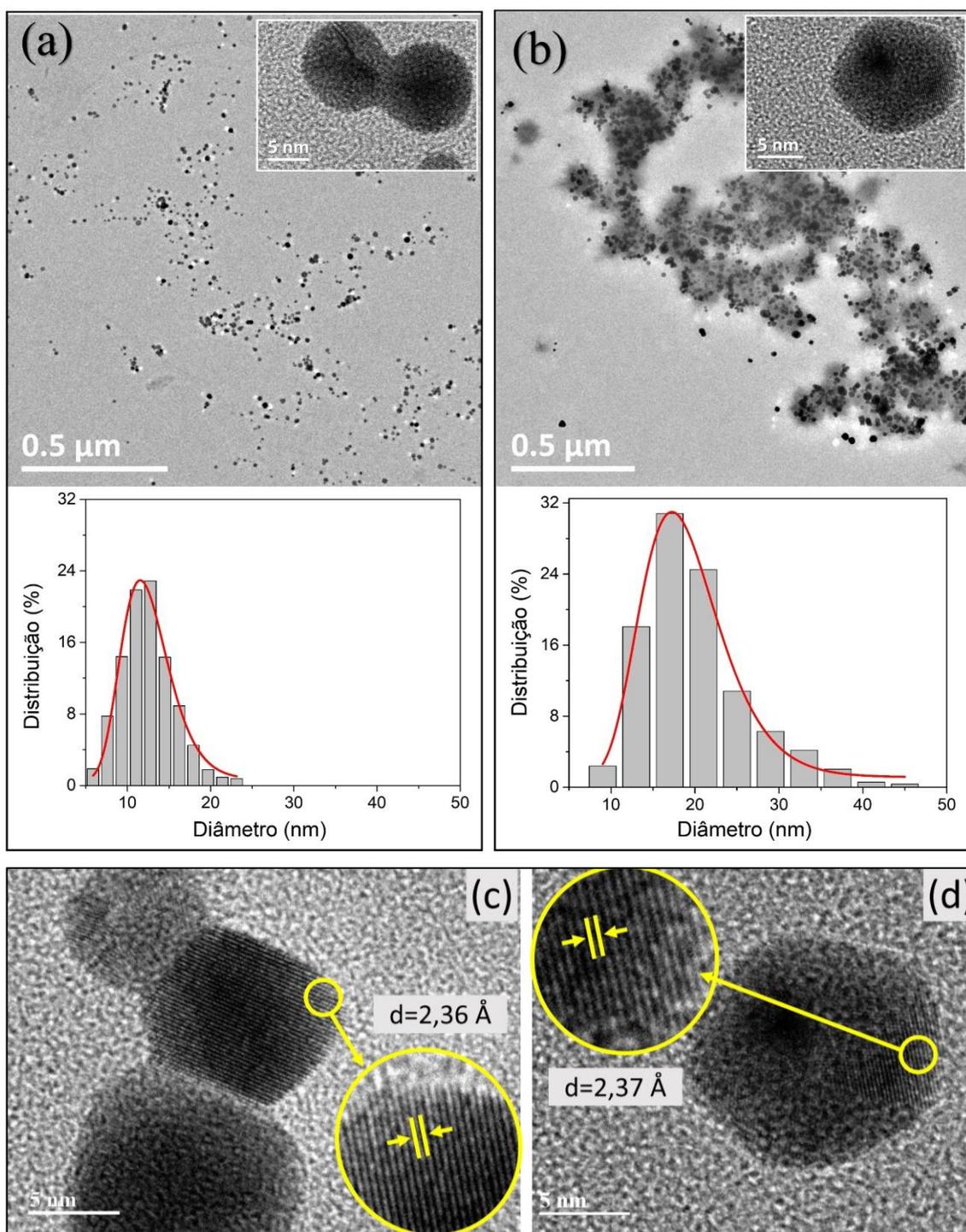


Figura 8: Micrografias com escala de 0,5 μm e, *inset* com escala de 5 nm, para as amostras: (a) AuNP-PLU:5F e (b) AuNP-PLU:5A. Micrografias de MET em alta resolução com indicação dos planos cristalinos: (c) AuNP-PLU:5F e em (d) AuNP-PLU:5A

Em resumo, observa-se nas imagens da Fig. 8 que as AuNPs sintetizadas sob fotoexcitação apresentam um tamanho menor do que as AuNPs controle, assim como uma polidispersividade menor. Estes resultados podem indicar que o processo de

nucleação seja favorecido pela radiação UV permitindo que mais nanopartículas sejam formadas, enquanto, a fase de crescimento predomina na síntese nas condições de ambiente. Como a reação é catalisada pela radiação UV não se observa as pequenas facetas visualizadas nas AuNPs controle criadas para diminuir a energia superficial (veja seção 2.1.1).

Observa-se também nas micrografias da Fig. 8 (a) e (b), que uma quantidade menor de polímero é adsorvida no nanocompósito fotoexcitado, quando se compara à amostra controle. Para estimar a quantidade de polímero presente em cada um desses sistemas, foram realizadas análises de termogravimetria do precursor PLU e dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A. As curvas TG da variação de massa (M) em função da temperatura e a sua primeira derivada em relação ao tempo (dM/dt) gravados em função da temperatura estão apresentados na Fig. 9.

Todas as curvas TG da Fig. 9 exibem uma única perda de massa acentuada próxima a 400 °C. O mesmo ocorre quando esses dados são analisados em função da sua primeira derivada em relação a temperatura, mais sensível a pequenas variações, onde também observou-se apenas um pico. Este comportamento dos termogramas indica que ocorreu um único evento durante essa faixa de aquecimento, que foi atribuído à degradação térmica do composto orgânico, neste caso o PLU. Estabelecendo-se a variação de massa do PLU puro como padrão (99,98% obtido a partir da Fig. 9(c)) foi possível estimar a variação de massa orgânica nos nanocompósitos durante este intervalo de aquecimento. Dessa forma, obteve-se a percentagem em massa de PLU que permanece no nanocompósito após a remoção do excesso de PLU por centrifugação (veja seção 3.2). O valor encontrado foi de 7% e 9% para os nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A, respectivamente. Conhecendo-se o volume da amostra correspondente a essa massa de PLU foi possível estimar a concentração orgânica em cada sistema coloidal, igual a 1,58 mmol L⁻¹ e 1,90 mmol L⁻¹, para as amostras AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A, respectivamente. A maior quantidade de PLU presente no nanocompósito AuNP-PLU:5A (Fig. 9(b)) pode explicar o pequeno aumento da estabilidade térmica (curva DTGA) desse nanocompósito em relação ao nanocompósito sintetizado por fotoexcitação.

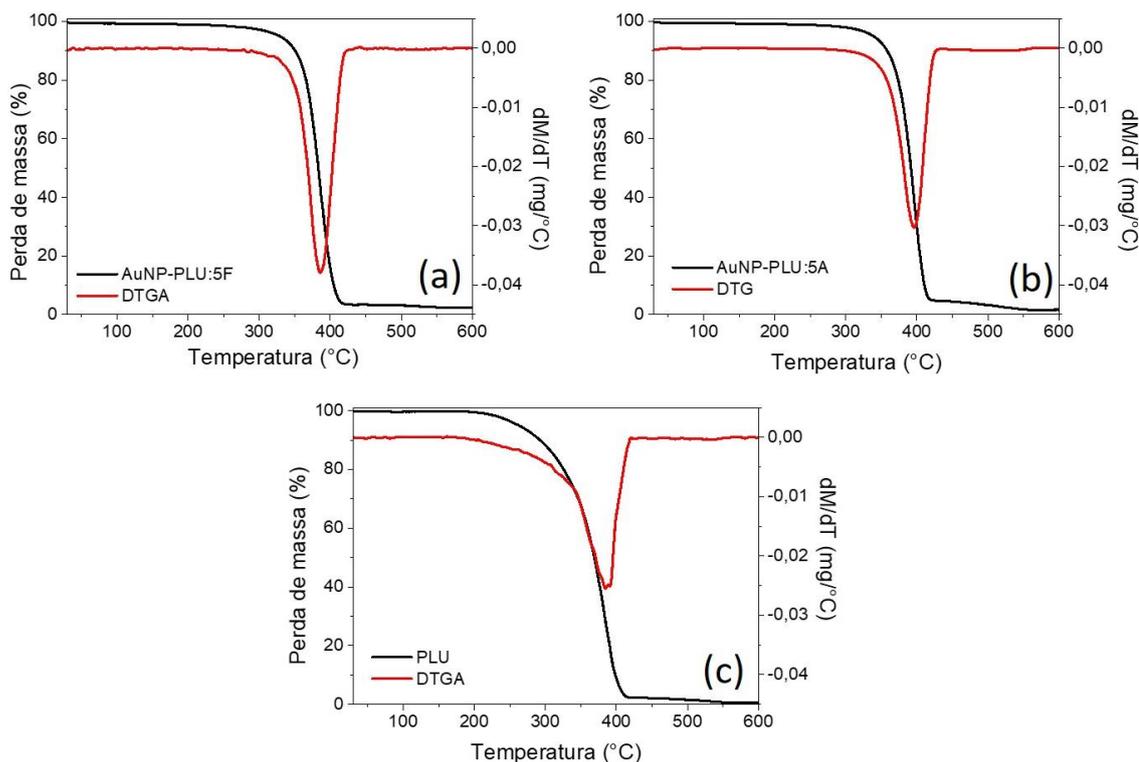


Figura 9. Curvas termogravimétricas (linha preta) e termogravimétricas derivadas (linha vermelha) dos nanocompósitos: (a) AuNP-PLU:5F e (b) AuNP-PLU:5A; e do PLU puro em (c).

A concentração de ouro dos nanocompósitos sintetizados foi determinado por meio da técnica de absorção atômica, obtendo-se valores iguais a $3,12 \text{ mmol L}^{-1}$ e $2,77 \text{ mmol L}^{-1}$, para as amostras AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A respectivamente. Esses valores mostram que a síntese fotoexcitada tem rendimento maior, pois consegue reduzir uma quantidade maior de íons AuCl_4^- , a partir das mesmas concentrações dos precursores (AuCl_4^- e PLU).

A concentração de nanopartículas de ouro (C_{AuNPs}) pode ser estimada para esses nanocompósitos mediante os dados de diâmetro médio obtidos nos histogramas da Fig. 8 e com os valores da concentração de ouro determinados por meio da técnica absorção atômica. Este cálculo está detalhado no Apêndice A. Os valores encontrados foram iguais a $13,6$ e $3,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, para os nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A, respectivamente. Considerando-se que a concentração de PLU estimada está adsorvida nas nanopartículas, e que as nanopartículas possuem o mesmo tamanho, a razão molar entre a quantidade de PLU disponível por AuNPs será de 116 para o nanocompósito AuNP-PLU:5F e 559 para o nanocompósito controle, AuNP-PLU:5A. Isso mostra que a quantidade de polímero

por nanopartícula é 5 vezes maior na amostra controle do que na amostra fotoexcitada, em acordo com presença significativa de polímero na micrografia da amostra controle (Fig. 8(b)).

Os perfis de distribuição da intensidade de luz espalhada em função do diâmetro hidrodinâmico dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A estão apresentados na Fig. 10. O diâmetro médio determinado para o nanocompósito obtido por fotoexcitação (AuNP-PLU:5F) foi de $37,0 \pm 2,0$ nm e do controle (AuNP-PLU:5A) igual a $50,0 \pm 0,4$ nm com polidispersividade $\sigma = 0,2$. Essa variação de tamanho das nanoestruturas pode ser observada pela cor da dispersão coloidal de pink-avermelhado para roxo-pink (Fig. 10), indicando que a ação da radiação UV como catalisador da síntese de formação das nanopartículas de ouro promove a redução no tamanho médio das mesmas e no tamanho hidrodinâmico do nanocompósito, quando se compara com os dados da amostra controle.

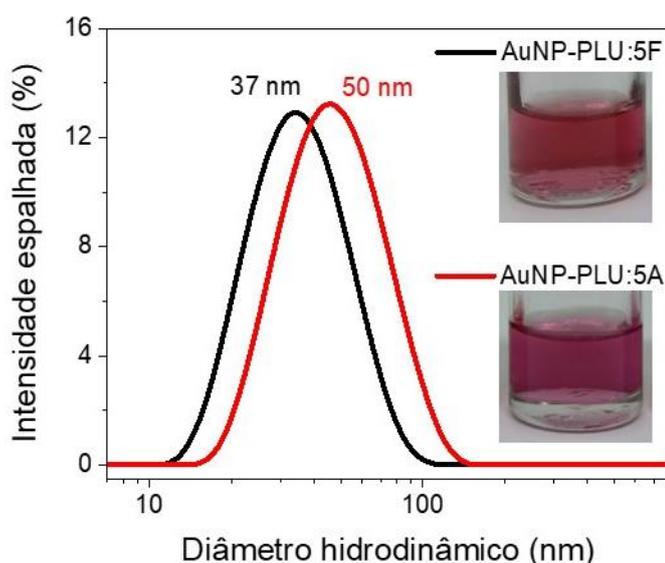
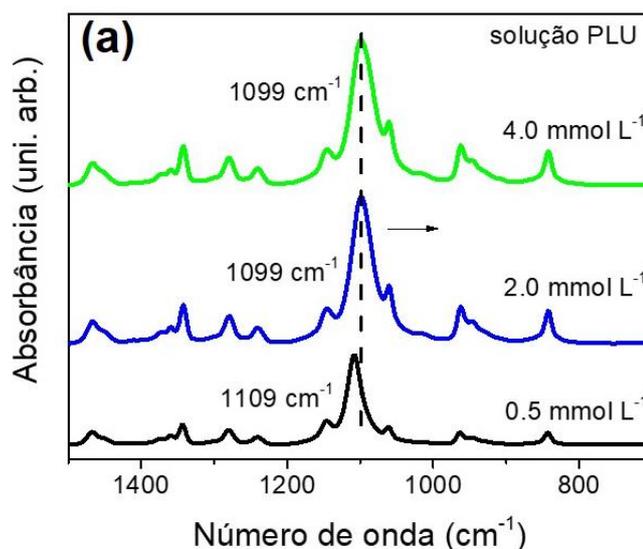


Figura 10. Perfis de distribuição da Intensidade de luz espalhada em função do diâmetro hidrodinâmico dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F (linha preta) e AuNP-PLU:5A (linha vermelha). *Inset*: imagens digitais das dispersões coloidais.

As mudanças estruturais induzidas devido à formação e interação com as nanopartículas foi investigada por meio de dados de espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR) (Ver Apêndice B para os detalhes sobre a obtenção dos espectros pelo método ATR). A Fig. 11 mostra os espectros no infravermelho obtidos por ATR para

soluções aquosas de PLU nas concentrações de 0,5; 2 e 4 mmol L⁻¹; no intervalo de 1500 a 700 cm⁻¹ e a Tab. 2 lista as principais bandas observadas no espectro da Fig. 11 e a identificação das mesmas [49,58].

Observa-se na Fig. 11 que as soluções de PLU apresentam espectros FTIR-ATR obtidos na faixa de 4496 a 374 cm⁻¹, não mostrados, semelhantes com a intensidade da absorbância variando em função da concentração de PLU. Observa-se na faixa de 700 a 1500 cm⁻¹ (Fig.11) o deslocamento da banda de estiramento do grupo éter (C-O-C), localizada em 1109 cm⁻¹ quando a concentração de PLU é igual a 0,5 mmol L⁻¹ (abaixo da CMC) e se desloca para menores números de onda (1099 cm⁻¹) para o regime micelar nas concentrações de 2 e 4 mmol L⁻¹. A variação do número de onda desta banda é uma evidência da formação de micelas pelas cadeias de PLU.



b) Identificação das principais bandas da solução PLU

Posição (cm ⁻¹)	Atribuição
2880	Estiramento CH
1465	Dobramento CH ₂
1373	Dobramento simétrico CH ₃
1359	Dobramento simétrico fora do plano CH ₂
1359	Estiramento C-C
1342	Dobramento simétrico fora do plano CH ₂

1280	Dobramento assimétrico fora do plano CH ₂
1242	Dobramento assimétrico fora do plano CH ₂
1145	Estiramento C-O-C e estiramento C-C
1099 ou 1109	Estiramento C-O-C
1060	Estiramento C-O
962	Dobramento assimétrico no plano CH ₂
945	Dobramento assimétrico no plano CH ₂ Estiramento C-O-C
842	Dobramento C-H fora do plano

Figura 11. (a) Espectros de infravermelho obtido por ATR para soluções aquosas de PLU nas concentrações de 0,5; 2 e 4 mmol L⁻¹. Em (b) a identificação da posição das principais bandas e suas atribuições [49,58].

O estudo da formação das AuNPs por meio da espectroscopia FTIR-ATR, para a amostra AuNP-PLU:5F é apresentada na Fig. 12(a), que também mostra o espectro da solução de PLU a 2 mmol L⁻¹ após ser irradiado com luz UV por 10 min.

Observa-se na Fig. 12 (a) que a solução de PLU irradiada por 10 min (ou até 50 min - dados não apresentados) não apresenta sinal de oxidação na sua estrutura ou alguma mudança de conformação. O espectro obtido é idêntico ao apresentado na Fig. 11. Contudo, quando as nanopartículas de ouro são sintetizadas na presença do PLU observa-se um deslocamento de 11 cm⁻¹ da banda de estiramento do grupo éter, $\nu(\text{C-O-C})$, para maiores números de onda. Esse comportamento sugere a presença das nanopartículas coordenadas ao grupo. Observou-se também, uma larga banda na região entre 1700 e 1750 cm⁻¹ (*inset* da Fig. 12 (a)) que pode estar associada ao estiramento C=O de aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos, indicando a oxidação do polímero quando irradiado na presença dos íons AuCl₄⁻.

A Fig. 12(b) apresenta os espectros FTIR-ATR dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A (amostra controle), da solução de PLU 2 mmol L⁻¹ na presença de um corante hidrofóbico (ftalocianina cloro-alumínio: AICIPc) sem irradiar e a solução de PLU puro na mesma concentração irradiado por 10 min, na região entre 1400 e 800 cm⁻¹. Comparando-se os números de onda da banda de vibração de estiramento éter, $\nu(\text{C-O-C})$, observados nos espectros de AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5F, verifica-se um aumento de 5 cm⁻¹. Esse aumento provavelmente se dá

peelo aumento de éteres conjugados com as AuNPs. Conforme foi observado na Fig. 8, nanopartículas menores são formadas no nanocompósito fotoexcitado e como consequência, a nucleação (pequenos *clusters* de ouro) foi favorecida.

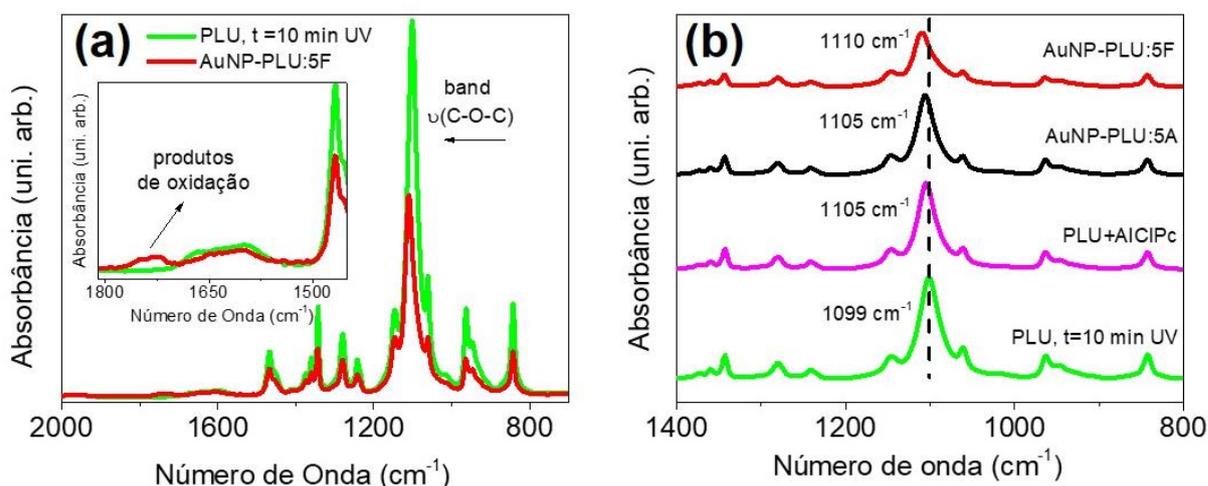


Figura 12. Espectros de infravermelho obtidos por ATR para (a) solução de PLU na concentração de 2 mmol L^{-1} após 10 min de fotoexcitação e o nanocompósito AuNP-PLU:5F; inset: a larga banda indicando a presença dos produtos de oxidação no nanocompósito sintetizado por fotoexcitação. (b) comparação da posição da banda $\nu(\text{C-O-C})$ próxima a 1100 cm^{-1} para a solução de PLU na concentração de 2 mmol L^{-1} após 10 min de fotoexcitação; solução de PLU sem irradiar adicionado AICIPc (corante hidrofóbico) e os nanocompósitos: AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5F.

Quando comparamos a posição da banda $\nu(\text{C-O-C})$ da solução de PLU adicionado AICIPc, dos nanocompósitos AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5F com a solução de PLU puro verificou-se um deslocamento para maiores números de onda para os nanocompósitos e para o PLU+AICIPc. Isso sugere que as AuNPs interagem com a estrutura do PLU de forma semelhante a um complexo hidrofóbico. Outro dado que reforça essa proposta é o decréscimo da largura de banda (sem alteração da posição central) do dobramento simétrico do grupo metil (CH_3 em 1373 cm^{-1} [22]) que indica uma diminuição do movimento rotacional desse grupo devido à presença das AuNPs ou da AICIPc. Este estudo foi complementado com dados obtidos de espectroscopia Raman.

Os espectros Raman do PLU sólido e do nanocompósito AuNP-PLU:5F seco estão apresentados na Fig. 13.

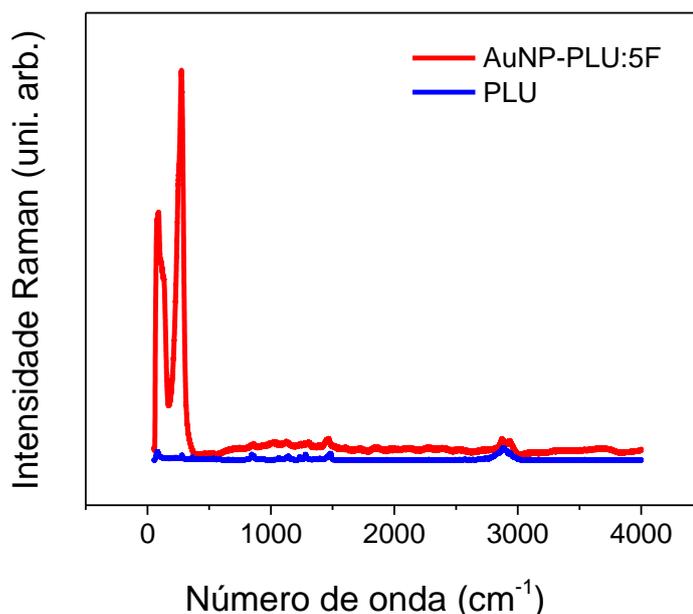


Figura 13. Espectros Raman do PLU e do nanocompósito AuNP-PLU:5F secos.

A intensa banda Raman observada na Fig. 13 na região abaixo de 300 cm^{-1} para o nanocompósito AuNP-PLU:5F sugere que as nanopartículas de ouro estão coordenadas na estrutura do PLU por meio de átomos de oxigênio [59]. O nanocompósito controle (AuNP-PLU:5A) também apresentou o mesmo espectro Raman indicando que as AuNPs permanecem coordenadas ao PLU da mesma forma. O sinal Raman das nanopartículas de ouro é muito intenso quando se compara ao do PLU, mesmo assim, a banda atribuída à vibração do $-\text{CH}_2$ presente cadeia do PLU é observada em 2900 cm^{-1} .

A distribuição de tamanho dos nanocompósitos produzidos pelos métodos de síntese fotoexcitado (AuNP-PLU:5F) e controle (AuNP-PLU:5A - luz ambiente) foi estudada por meio da técnica de ultracentrifugação analítica (AUC) pela metodologia da velocidade de sedimentação (SV). Neste método um sistema óptico permite o acompanhamento da variação de concentração dos nanocompósitos na solução promovida pela aplicação de uma força centrífuga de natureza gravitacional. A absorbância em 260 e 530 nm foram medidos em uma varredura ao longo de toda a célula obtendo os perfis sedimentação para vários tempos apresentados na Fig.14 (a) e (b) para os nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A para 530 nm, respectivamente. A escolha desses comprimentos de onda para monitoramento do deslocamento dos nanocompósitos durante a ultracentrifugação ocorreu porque o

polímero absorve a 260 nm e a nanopartícula próximo de 530 nm (Fig. G1- apêndice G).

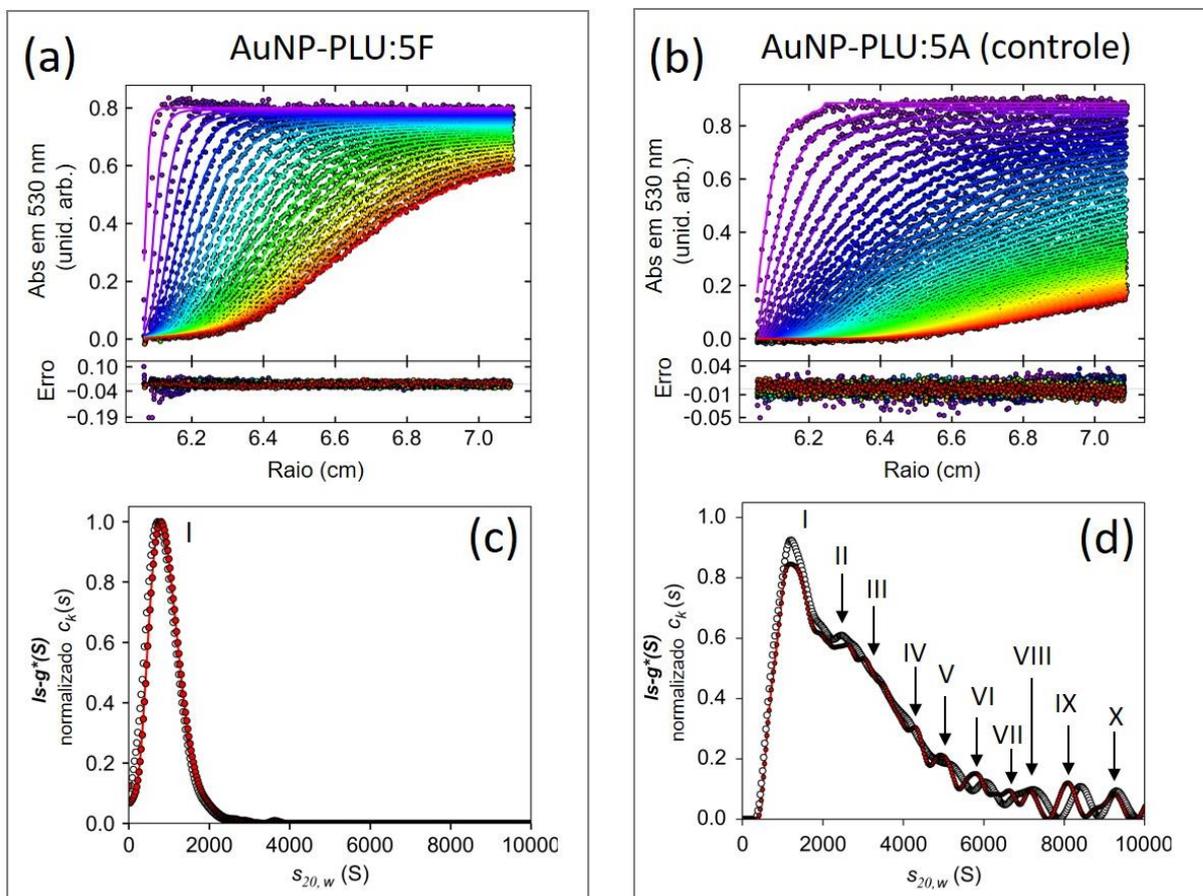


Figura 14. Painéis superiores: varreduras radiais a 530 nm da análise SV-AUC das nanopartículas presentes nos nanocompósitos (a) por fotoexcitação (AuNP-PLU:5F) e (b) controle (AuNP-PLU:5A). Painéis inferiores: a distribuição aparente do coeficiente de sedimentação $Is-g^*(S)$ a 260 nm (preto) e 530 nm (vermelho) obtidos para AuNP-PLU:5F (d) e AuNP-PLU:5A (e). Os picos correspondem às diferentes populações de nanopartículas e estão indicadas por algarismos romanos.

Quando o nanocompósito fotoexcitado (Fig. 14(a)) é submetido a um alto campo centrífugo observa-se uma rápida e uniforme sedimentação das partículas mostrados pelo comportamento exponencial da curva que atinge um platô de concentração no final da célula na absorbância de $\sim 0,8$ unid. arb. A curva adquire o comportamento sigmoidal (com platô inferior e superior) quando o transporte de massa resulta de um equilíbrio entre os processos de sedimentação e difusão. E para o nanocompósito controle (Fig. 14(b)) observa-se uma sedimentação mais rápida que pode estar associado à presença de partículas de tamanho maior. O ajuste dos

pontos experimentais da Fig.14 (a) foi realizado por meio de um modelo matemático baseado na equação de *Lamm* (Apêndice H), que descreve o comportamento espacial e temporal da concentração considerando a sedimentação por transporte de massa por difusão [55]. O software computacional (*SEDFIT*) ajusta uma série de perfis de concentração em diferentes momentos para um conjunto de pontos experimentais. O resultado é uma distribuição do coeficiente de sedimentação aparente $ls-g^*$, em unidades de *Svedberg* (S), onde o asterisco indica dependência dos parâmetros pré-definidos (temperatura, viscosidade, densidade, volume, por exemplo) na análise. Estas distribuições $ls-g^*$ estão apresentadas na Fig. 14 (c) e (d) para as absorvâncias em 260 e 530 nm normalizados para a condição padrão ($S_{20,w}$: onde a temperatura é de 20°C e o solvente é a água). A identificação dos picos mostrados na Fig. 14 (c) e (d) estão apresentados na Tab. 2.

Tabela 2. Identificação dos picos da Fig. 14 (b) e os valores do coeficiente de sedimentação aparente para as nanopartículas produzidas pelo método controle e fotoexcitado.

Método síntese	Distribuição em 530 nm			Distribuição em 260 nm		
	Pico	$S_{20,w}$ (s)	Porcentagem (%)	Pico	$S_{20,w}$ (s)	Porcentagem (%)
Controle (luz ambiente)	I	1451,17	43,21	I	1418,534	44,17
	II	2613,09	13,30	II	3555,02	43,80
	III	3477,32	20,04	III	6118,22	2,71
	IV	4403,81	5,24	IV	7145,20	3,26
	V	5030,07	4,98	V	8441,533	2,02
	VI	5811,971	3,67	VI	9364,584	1,69
	VII	6343,14	0,85			
	VIII	6681,68	1,44			
	IX	7198,76	1,44			
	X	8125,44	2,16			
Fotoexcitado	I	947,10	99,36	I	857,78	99,15

Os dados obtidos por este estudo por ultracentrifugação analítica mostram que os perfis de sedimentação $ls-g^*(S)$ a 530 nm para partículas sintetizadas por fotoexcitação AuNP-PLU:5F, observa-se um único pico com coeficiente de

sedimentação $S_{20,w}$ de 947,10 S, indicando a presença de uma população homogênea de nanopartículas (Fig. 14 (c) e Tab. 2). Enquanto que no caso da amostra controle AuNP-PLU:5A, observa-se uma larga banda juntamente com outras de menor intensidade, provavelmente formadas por populações de partículas com diferentes tamanhos de acordo com as análises de distribuição. A principal população de partículas a 530 nm corresponde ao pico I (43,2%) com um coeficiente de sedimentação $S_{20,w}$ de 1451,17 S, enquanto as seguido do pico II (13,3%) e III (20,04%) com coeficiente de sedimentação de 2613,09 S e 3477,32 S, respectivamente (Fig. 14(d) e Tab. 2). Outros picos com menos de 5% nas análises de distribuição são detectados, sugerindo a presença de outras partículas maiores. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por microscopia eletrônica de transmissão apresentados na Fig. 8 (a-b) onde a amostra sintetizada por fotoexcitação (AuNP-PLU:5F) apresentou estreita distribuição de tamanho em relação a amostra controle. Desta forma, as análises por SV-AUC e MET mostram claramente que o método de síntese de nanopartículas de ouro na presença do PLU sob fotoexcitação é melhor e mais eficiente para produzir, em termos de tamanho e forma, uma população homogênea de nanopartículas, quando comparado com partículas obtidas nas mesmas condições em sintetizados sob luz ambiente.

Um experimento de controle, usando o PLU polímero sob as mesmas condições de centrifugação, mostrou que ele não é capaz de sedimentar durante o tempo de experimentação. A absorbância a 260 nm corresponde à absorção do PLU polímero, enquanto a 530 nm corresponde à absorção do nanocompósito produto da coordenação do ouro com polímero. Portanto, as semelhanças entre os perfis de distribuição de $ls-g^*(S)$ em relação a $S_{20,w}$ a 260 e 530 nm sugerem que todas as partículas detectadas no experimento são formadas por complexos de ouro e polímero. Em nenhum caso é detectada a presença de agregados de polímeros sem ouro em sua estrutura, o que indica que a presença de ouro e a irradiação por si só não induz a agregação do polímero.

4.1.1 Estudo do mecanismo de reação

A espontaneidade da reação realizada pela mistura das soluções de copolímero F127 (PLU) e de HAuCl_4 , foi estudada por meio da técnica de voltametria cíclica das soluções precursoras, tendo o KCl como eletrólito de suporte [22]. Os

voltamogramas cíclicos das soluções de PLU e HAuCl_4 ambos a 2 mmol L^{-1} preparadas em solução de KCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ estão apresentados na Fig. 15.

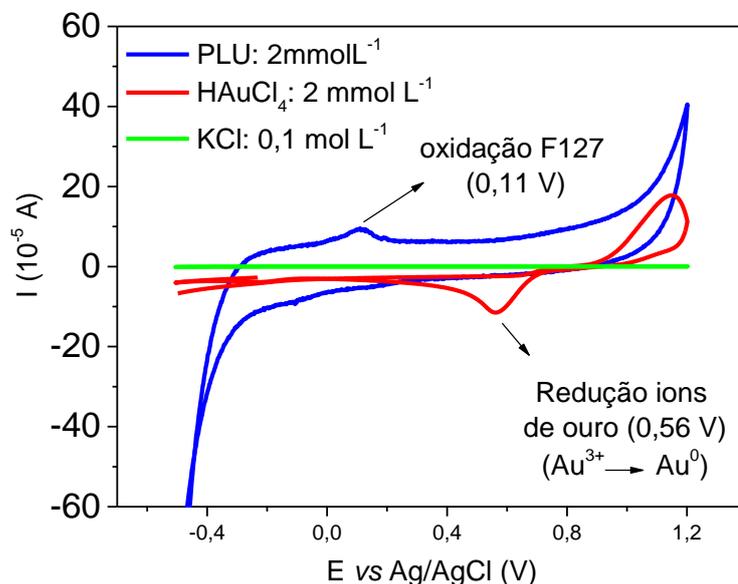
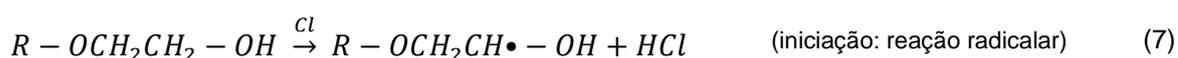


Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos das soluções de PLU e HAuCl_4 , ambos a 2 mmol L^{-1} preparadas em solução de KCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

O voltamograma do HAuCl_4 (Fig. 15) mostra a oxidação de $\text{Au}^0 \rightarrow \text{Au}^{3+}$ em 1,0 V bem como a redução de $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$ em 0,56 V. A oxidação do PLU ocorre no potencial de 0,11 V. Como a oxidação do PLU ocorre em um potencial menor do que a redução dos íons de ouro, o PLU é capaz de reduzir o Au^{3+} enquanto ele é oxidado [22].

Os resultados apresentados das análises de UV-vis e FTIR-ATR apresentados nas Figs 7 e 12 mostraram que cada uma das soluções de PLU e HAuCl_4 não mostram variações espectrais quando expostas à radiação UV. Desta forma, o mecanismo de formação dos nanocompósitos será analisado considerando-se o efeito da irradiação da mistura reacional ($\text{PLU} + \text{HAuCl}_4$), ou seja, independentemente os precursores não são modificados pela incidência da radiação UV usada no processo de fotoexcitação, mas apenas quando são misturados. O estudo foi concebido considerando-se trabalhos que relatam a síntese fotoexcitada de nanopartículas de ouro na presença de outros agentes ou polímeros. A reação redox pode ocorrer em várias etapas envolvendo a excitação e o desproporcionamento dos íons AuCl_4^-

[17,18] e oxidação do polímero [32], conforme apresentado no esquema 1, para a formação do nanocompósito AuNP-PLU deste trabalho.



Esquema 1. Mecanismo proposto para a formação do nanocompósito AuNP-PLU e oxidação do PLU.

Considerando-se as etapas da redução propostas no esquema 1, a absorção de um quantum de energia luminosa ($E = hf$) pelos íons de ouro promove a formação do estado excitado $(Au^{3+}Cl_4^-)^*$ sendo que o asterisco é usado para indicar a maior energia (etapa 2). Com essa excitação da molécula o elétron participante da ligação Au-Cl pode ser liberado para o átomo de cloro levando à formação do estado bivalente $(Au^{2+}Cl_3^-)$ (etapa 3). Esta espécie é instável e rapidamente assumirá um estado mais oxidado $(Au^{3+}Cl_4^-)$ ao perder elétrons; e reduzindo-se para $(Au^{1+}Cl_2^-)$ ao ganhar elétrons. Essa etapa da reação é chamada de desproporcionamento porque a mesma espécie (Au) sofre uma auto-oxirredução (etapa 4) durante a reação química. Contudo, os íons $(Au^{1+}Cl_2^-)$ não serão desproporcionados rapidamente como os $(Au^{3+}Cl_4^-)$, porque o potencial de redução de um único átomo Au^{1+}/Au^0 é negativo (-1,4 V), enquanto o potencial de Au^{3+}/Au^0 é positivo (+1,5 V) [32]. Por isso, eles se acumulam até que os íons $Au^{3+}Cl_4^-$ sejam reduzidos. Isso leva a um efeito chamado de aurofilicidade [1] quando as espécies de ouro Au^{1+} formam ligações entre si

formando aglomerados em solução. Após esse tempo de indução esses íons também são reduzidos por desproporcionamento (etapa 5).

O crescimento das AuNPs ocorre pela coalescência das sementes de Au^0 com outras mais próximas e/ou pela redução de íons de ouro na superfície dos aglomerados metálicos (*clusters*). A complexação do PLU com os íons de ouro participando da redução dos mesmos e posteriormente sua adsorção nos clusters metálicos suspendendo-os em meio aquoso, dá origem ao nanocompósito AuNP-PLU. Acredita-se que a complexação dos íons com a estrutura do PLU seja um processo entalpicamente dirigido e exotérmico, enquanto a formação do nanocomplexo seja entropicamente dirigido e endotérmico conforme estudo realizado por calorimetria de titulação isotérmica na amostra controle AuNP-PLU:5A (apêndice F).

Na etapa 2, a fotólise do $AuCl_4^-$ produz átomos de cloro e íons cloreto que podem estar relacionados com a oxidação do polímero. Análises dos espectros FTIR-ATR obtidas de soluções de PLU com adição de ácido clorídrico (HCl) mostraram que o íon cloreto não produz oxidação no PLU estando ou não sob irradiação UV. Portanto, no mecanismo de reação proposto, apesar dos íons cloreto estarem presentes na solução, considerou-se que eles não são responsáveis pelo início da reação redox. Porém, o cloro (Cl) que permanece na forma atômica podem abstrair átomos de hidrogênio [32] das extremidades das cadeias poliméricas promovendo a oxidação do álcool (-COH) em um aldeído (-CHO) através da reação radicalar (etapas 7-9). A presença da banda visualizada na região entre $1700 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ no espectro de infravermelho do nanocompósito (Fig. 12) indica a ocorrência de oxidação do PLU na presença de $AuCl_4^-$. É possível que neste sistema também ocorra a fotólise da água, catalisada pela presença do Au^{3+} . Isto pode gerar radicais $H\bullet$ e $OH\bullet$ que são altamente reativos oxidando o polímero de maneira similar aos átomos de Cl [32]. A excitação no UV (254 nm) utilizada neste trabalho poderia promover a fotólise da água [32], contudo observou-se que o PLU puro não apresenta sinais de oxidação quando irradiado individualmente. Portanto, não foi descartada a possibilidade desse efeito ocorrer, mas considerou-se a oxidação do PLU relacionada à presença dos íons tetravalentes $AuCl_4^-$.

4.1.2 Cinética de formação dos nanocompósitos

A formação das AuNPs por redução química e fotoquímica dos AuCl_4^- foi monitorada por meio de espectroscopia de absorção no UV-vis uma vez que as espécies envolvidas apresentam típicas transições eletrônicas nessa região do espectro eletromagnético. Os espectros foram adquiridos após sucessivos intervalos de fotoexcitação, descritos na seção 3.5, assegurando que o processo de medida não interferiu na reação fotoexcitada.

Apesar da maioria das investigações relatadas na literatura [13,60,61] apresentar o monitoramento das absorções ópticas dos íons de ouro e a formação de pequenas nanopartículas, ao contrário, neste estudo a cinética de formação dos nanocompósitos foi realizada fazendo o monitoramento da banda LSPR do nanocompósito. Os íons de ouro exibem intensa banda LMCT em 220 nm enquanto as AuNPs apresentam fraca absorção próximo a 500 nm. A intensidade destas absorbâncias mudam rapidamente no decorrer do tempo. Contudo, a formação de nanopartículas maiores deslocam a linha de base do espectro para cima tornando difícil a detecção dos íons e pequenos núcleos de ouro. Por isso, neste trabalho, o intervalo escolhido para análise espectral foi entre 450 e 600 nm onde se localiza a banda LSPR associada às AuNPs.

A Fig. 16 apresenta os espectros de UV-vis registrados sucessivamente até 50 min de tempo de fotoexcitação da mistura $\text{HAuCl}_4 + \text{PLU}$ no decorrer da reação com imagens da solução após a mistura dos precursores em $t=0$ min (a) e do nanocompósito formado em $t=10$ min de fotoexcitação (b). O gráfico inserido mostra a variação da absorbância máxima em função do tempo de fotoexcitação (pontos) com um ajuste exponencial (linha). Após 1 min de fotoexcitação a banda LSPR das AuNPs é claramente observada no espectro. A intensidade da absorbância aumenta continuamente com o tempo de fotoexcitação atingindo um máximo após 10 min de reação com $\lambda=526$ nm. Nesse momento a mistura reacional exhibe coloração *pink* (imagem Fig. 14 (b)) confirmando a formação do nanocompósito. Os valores máximos da absorbância (Abs_{MAX}) da banda LSPR foram coletados do espectro e apresentados em função do tempo de fotoexcitação (*inset*). A Abs_{MAX} apresenta um comportamento assintótico com ligeiro aumento nos primeiros minutos de reação. A redução dos íons de ouro e a formação das AuNPs se dá em aproximadamente 10 min de reação sob fotoexcitação.

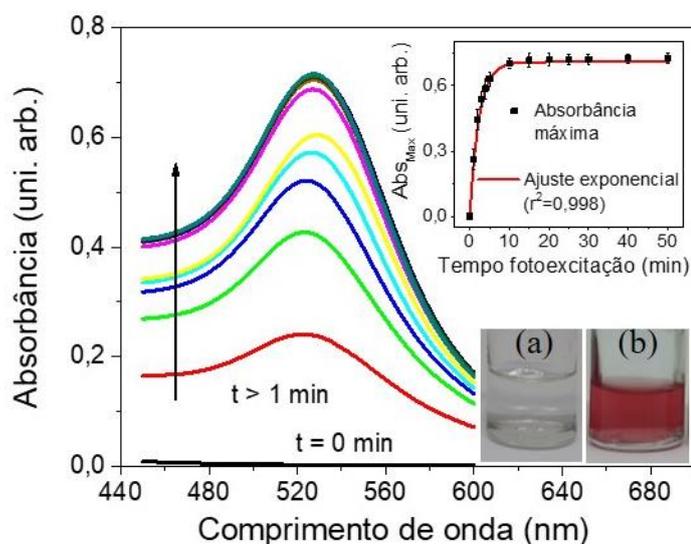


Figura 16. Monitoramento da banda plasmônica na região entre 450 e 600 nm do espectro de UV-Vis durante a fotoexcitação mistura reacional para a formação do nanocompósito AuNP-PLU:5F (2mmol L⁻¹ de PLU e de HAuCl₄). *Inset*: dados de absorvância máxima em função do tempo de fotoexcitação (pontos) com ajuste exponencial (linha); e imagens digitais da mistura reacional em t = 0 min (a), antes da fotoexcitação, e em t = 10 min de fotoexcitação (b).

Monitoramento similar ao apresentado na Fig. 16 foi realizado para todas as amostras descritas na Tab. 1 e o ajuste dos valores de Abs_{MAX} realizado pela função MnMolecular 1 fornecida pelo software Origin 8.0 da seguinte forma:

$$Abs_{MAX} = A_{\infty}[1 - e^{-k_{obs}t}] \quad (10)$$

Na Eq. 10 Abs_{MAX} corresponde ao valor da absorvância máxima da banda LSPR (em unidades arbitrárias) no tempo t (expressado em minutos), enquanto A_∞ é a absorvância da banda LSPR no tempo infinito de reação (em unidades arbitrárias), e k_{obs} é a constante de taxa observada (em min⁻¹). A partir dos valores dessa constante foi possível estimar a ordem da reação, que também implica em observar de maneira indireta a velocidade de formação do nanocompósito AuNP-PLU. A constante de taxa observada também engloba a concentração de PLU (K_{obs} = k'[PLU]ⁿ) para as amostras do conjunto I e a concentração de HAuCl₄ (K_{obs} = k''[HAuCl₄]^m) para as amostras do conjunto II.

A Fig. 17 apresenta os valores da constante de taxa observada (k_{obs}) obtidos através do ajuste dos dados experimentais pela Eq. 10 para as amostras da Tab. 1, exceto para a concentração de 0,1 mmol L⁻¹ de PLU que não apresentou

comportamento exponencial quando sintetizado com fotoexcitação. Essa amostra apresentou comportamento sigmoidal com um tempo de indução e portanto, não será analisada aqui. Nas amostras controle as concentrações de 0,1 e 0,3 mmol L⁻¹ foram retiradas dessa análise porque sua formação necessita de período muito longo (dias) para ocorrer.

A Fig.17 (a) apresenta os valores da constante de taxa observada (k_{obs}) para os nanocompósitos sintetizados com o aumento da concentração de PLU (amostras do conjunto I da Tab. 1). Observa-se que a cinética de formação dos nanocompósitos depende do tipo de síntese realizada, com ou sem fotoexcitação. No caso dos nanocompósitos preparados com fotoexcitação os valores da constante de taxa aparente aumentam para as duas menores concentrações analisadas (0,3 e 0,5 mmol L⁻¹), e ao atingir a concentração de 1 mmol L⁻¹ ocorre um abrupto aumento no valor de k_{obs} de 0,14 para 0,43 min⁻¹, permanecendo praticamente constante até as maiores concentrações analisadas. Quando as micelas de PLU são formadas para a concentração de PLU > 1,0 mmol L⁻¹ (CMC ~ 0,6 mmol L⁻¹) a cinética da reação aparenta não depender da concentração de PLU. A confirmação de que o regime micelar foi alcançado nas concentrações de PLU > 1,0 mmol L⁻¹ foi obtida por espalhamento dinâmico de luz e estes dados serão apresentados na seção 4.2. Esse comportamento sugere a influência do regime micelar na cinética de formação dos nanocompósitos fotoexcitados, enquanto no caso da amostra controle, os valores de k_{obs} permanecem praticamente constantes com a concentração de PLU;

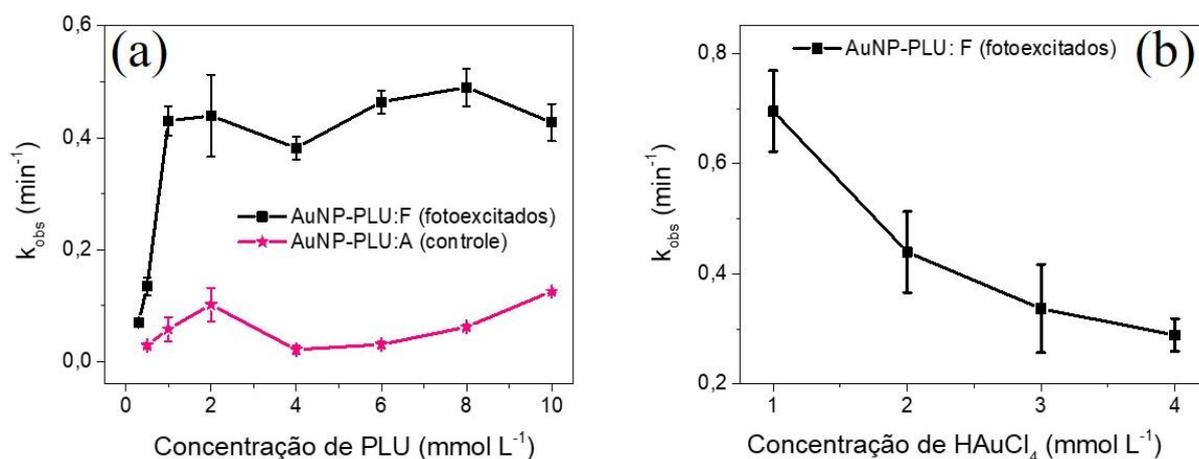


Figura 17. A constante de taxa observada (k_{obs}) em função da concentração dos precursores (Tab.1). Em (a) nanocompósitos do conjunto I com variação da concentração de PLU para a síntese fotoexcitada

(linha preta) e para as amostras controle (linha pink); (b) nanocompósitos do conjunto II com variação da concentração de HAuCl_4 .

A Fig.17 (b) apresenta os valores da constante de taxa observada (k_{obs}) para os nanocompósitos sintetizados sob fotoexcitação em função do aumento da concentração de HAuCl_4 (amostras do conjunto II da Tab. 1). Observa-se uma dependência de k_{obs} com a concentração do precursor metálico de 0,69 para $0,28 \text{ min}^{-1}$, indicando que a cinética de reação não é de 1º ordem.

4.2 Efeito da concentração dos precursores na formação do nanocompósito

O efeito da concentração dos precursores (PLU e HAuCl_4) no tempo de reação, na morfologia (tamanho/formato) das AuNPs e no tamanho dos nanocompósitos AuNP-PLU foi investigada por espectroscopia de UV-vis, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamento dinâmico de luz (EDL). Em adição, alguns nanocompósitos foram estudados por voltametria cíclica (VC) para investigar a presença de íons de ouro não reduzidos em solução.

Os espectros de absorvância no UV-vis dos nanocompósitos sintetizados com o aumento da concentração de PLU mantendo-se a concentração de HAuCl_4 fixa igual a 2 mmol L^{-1} estão apresentados na Fig. 18 (a). Nove concentrações de PLU (0,1 a 10 mmol L^{-1} - Tab. 1) foram analisadas, apenas os espectros representativos estão mostrados. Os valores de absorvância máxima da banda LSPR das AuNPs para todos os nanocompósitos estudados em função da concentração de PLU estão inseridos na Fig. 18 (a).

A Fig. 18 (b) mostra os espectros de UV-vis dos nanocompósitos sintetizados em função do aumento da concentração de HAuCl_4 , com a concentração de PLU fixa em $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. As concentrações de HAuCl_4 estudadas foram 1 mmol L^{-1} (10F), $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (5F), $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (11F) e $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (12F). Inseridos nessa imagem estão os valores de absorvância máxima da banda LSPR de cada nanocompósito em função da concentração do precursor metálico com ajuste linear.

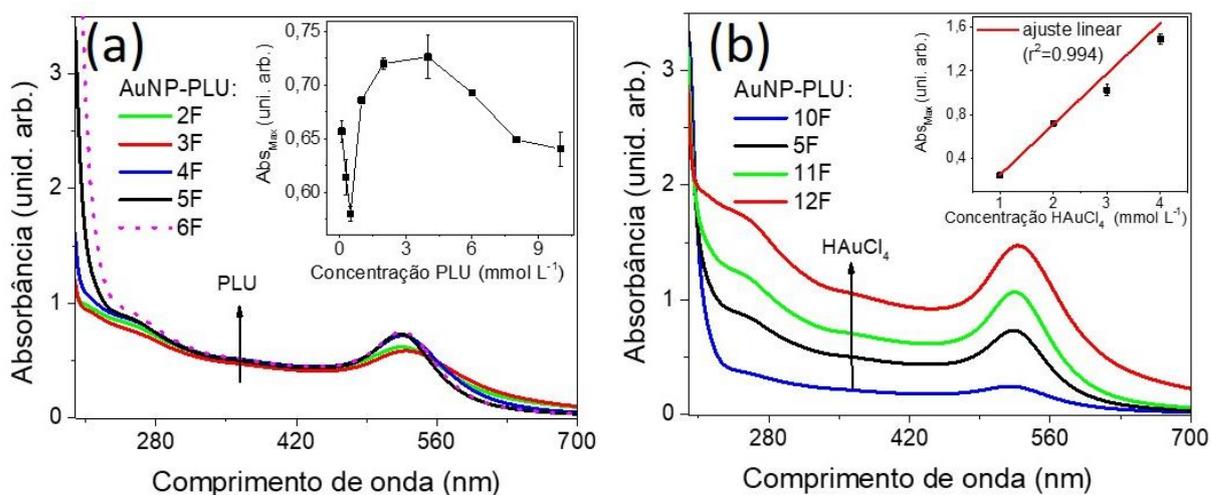


Figura 18. Espectros de UV-vis para os nanocompósitos AuNP-PLU: (a) com a concentração de HAuCl₄ fixa em 2 mmol L⁻¹ e a concentração de PLU variando de 0,3 mmol L⁻¹ (2F), 0,5 mmol L⁻¹ (3F), 1,0 mmol L⁻¹(4F) e 2,0 mmol L⁻¹ (5F); *Inset*: os valores de absorvância máxima (pontos pretos) dos nanocompósitos sintetizados nas concentrações de PLU: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0, 8,0 e 10,0 mmol L⁻¹; a linha é um guia visual. Em (b) a concentração de PLU permaneceu em 2,0 mmol L⁻¹ e a concentração de HAuCl₄ variou de 1,0 mmol L⁻¹ (10F), 2,0 mmol L⁻¹ (5F), 3,0 mmol L⁻¹ (11F) e 4,0 mmol L⁻¹ (4F); *inset*: os valores de absorvância máxima (pontos pretos) desses nanocompósitos e o ajuste linear (linha vermelha).

Observa-se na Fig. 18 (a) que para baixas concentrações de PLU entre (0,1 até 0,5 mmol L⁻¹) ocorre uma diminuição dos valores de Abs_{MAX} seguido de um aumento até a concentração de 2 mmol L⁻¹; fica constante até 4 mmol L⁻¹ e decresce até a maior concentração de PLU analisada (10 mmol L⁻¹). Esses dados sugerem uma agregação das AuNPs na presença de pequenas quantidades de polímero. Por este motivo, a banda plasmônica no espectro de UV-vis é mais alargada para essas concentrações. À medida que se acrescenta mais polímero (PLU > 0,5 mmol L⁻¹) a absorvância máxima da banda LSPR aumenta e fica mais estreita até um valor de saturação (~ 0.72 arb. unid.) atingido na concentração de 2 mmol L⁻¹, indicando que essa concentração de PLU apresenta a melhor condição de síntese com maior concentração de AuNPs e sem a presença de grandes agregados. A partir desta concentração a quantidade de PLU adicionado por íons de AuCl₄⁻ disponíveis para redução é muito elevada ([PLU]/[HAuCl₄] >> 1) promovendo a queda da Abs_{MAX} e o deslocamento da banda para menores comprimentos de onda (526 para 515 nm). Isto sugere que houve a formação de nanopartículas menores na suspensão coloidal.

Os dados da Fig. 18 (b) indicam que quando a concentração de íons de ouro aumenta, para a concentração de PLU fixa em 2 mmol L^{-1} , verifica-se um aumento linear nos valores de Abs_{MAX} da banda LSPR sem alteração significativa no seu formato ou posição. É provável que o aumento da concentração de HAuCl_4 na síntese do nanocompósito promova um aumento na concentração de AuNPs na dispersão coloidal com mínima variação no tamanho das AuNPs.

Para complementar o estudo, avaliou-se a dependência do diâmetro hidrodinâmico (D_H) dos nanocompósitos sintetizados com fotoexcitação em relação ao aumento da concentração dos precursores (PLU ou HAuCl_4) na síntese (Fig. 19), adotando como referência o D_H do PLU puro em solução aquosa.

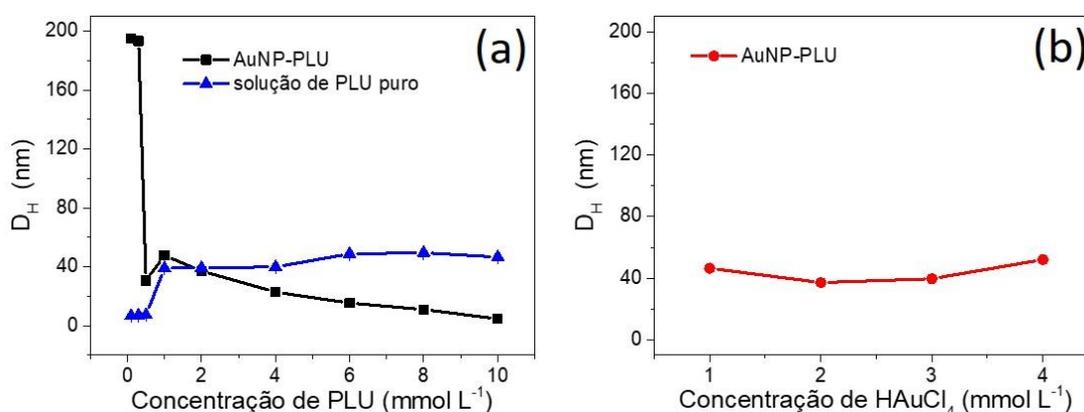


Figura 19. Diâmetro hidrodinâmico: (a) da cadeia de PLU em solução aquosa (pontos azuis) e dos nanocompósitos AuNP-PLU (pontos pretos) sintetizados com fotoexcitação em função da concentração de PLU. (b) dos nanocompósitos sintetizados por fotoexcitação com aumento da concentração de HAuCl_4 com a concentração de PLU fixa em 2 mmol L^{-1} .

Observa-se na Fig. 19(a) que o D_H das estruturas formadas pelo PLU puro em solução começam em torno de 7 nm quando a concentração de PLU $\leq 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. O valor de D_H aumenta para $\sim 40 \text{ nm}$ quando a concentração de PLU excede a sua CMC (concentração micelar crítica $> 0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ [42]) e, a partir de então, o valor de D_H permanece praticamente constante. Esta é uma forte evidência de que as concentrações de PLU $\geq 1 \text{ mmol L}^{-1}$ contém micelas em solução, enquanto, as concentrações de PLU $\leq 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ fazem parte da região não micelar do copolímero. O valor encontrado para o D_H das micelas coincide com os valores relatados na literatura que é de 36 nm [62].

O D_H nanocompósitos sintetizados sob fotoexcitação, em função do aumento da concentração de PLU observado na Fig. 19 (a) tem valores bem distintos para a região de baixa concentrações ($< 1 \text{ mmol L}^{-1}$) e para concentrações de PLU acima de 2 mmol L^{-1} . Para baixas concentrações o valor de D_H dos nanocompósitos é maior do que o D_H do PLU puro, indicando a ocorrência de agregação do PLU ao redor das AuNPs. Quando a concentração de PLU é aumentada no intervalo de 2 a 10 mmol L^{-1} , ocorre uma diminuição nos valores de D_H dos nanocompósitos. Estes valores tem uma tendência de queda, ficando menores do que os obtidos para as mesmas concentrações da solução de PLU puro. No caso dos nanocompósitos o D_H varia de 37 nm para quase 10 nm, para a maior concentração de PLU. Essa diminuição pode ser causada pela diminuição do tamanho das AuNPs e sugerindo uma contração da estrutura micelar na presença desses nanocompósitos. Acredita-se que nesta síntese a coordenação do ouro com a cadeia do PLU ocorra de maneira intramolecular. A presença da radiação UV na síntese do nanocompósito promove a coordenação de vários núcleos de ouro na mesma cadeia de copolímero promovendo um nanocompósito mais compacto e com menos PLU (Fig. 8 e 9). E na síntese controle haja uma coordenação do tipo intermolecular onde várias cadeias de PLU coordenam com um núcleo metálico aumentando o diâmetro hidrodinâmico da nanocompósito, como se observa na Fig.10. Por outro lado, observa-se que o aumento da concentração do precursor metálico não promove grandes variações no valor de D_H dos nanocompósitos (Fig. 19 (b)). É provável que haja somente um aumento na concentração de AuNPs formadas sem variação significativa no tamanho, uma vez que na Fig. 18 observa-se aumento linear da Abs_{Max} da banda LSPR sem deslocamento da sua posição.

A Fig. 20 mostra um resumo dos valores obtidos para os diâmetros médios das AuNPs obtidos por MET em função da concentração dos precursores. Enquanto as micrografias representativas que deram origem estão apresentadas na Fig. 21 para nanocompósitos sintetizados com aumento da concentração de PLU e na Fig. 22 com o aumento da concentração de HAuCl_4 . Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados na Fig. 19, mostrando que o aumento da concentração de PLU favorece a formação de AuNPs menores, enquanto o aumento da concentração de HAuCl_4 não produz grandes alterações no diâmetro médio para concentrações maiores que 2 mmol L^{-1} do precursor metálico.

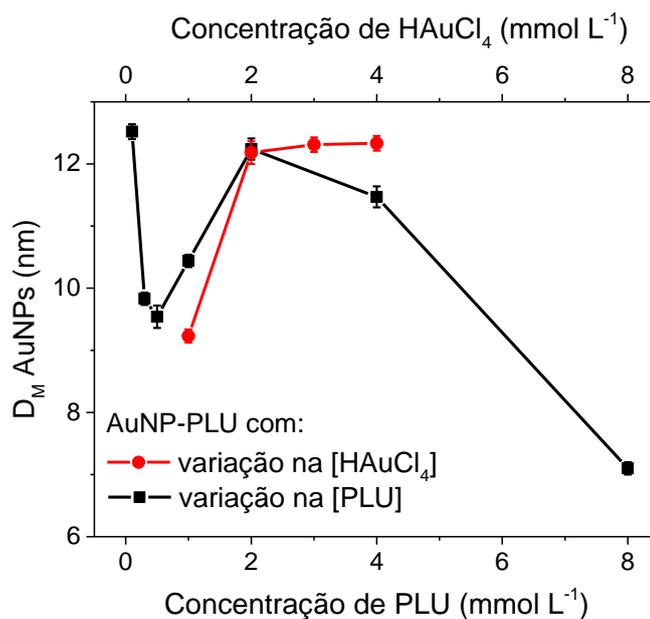


Figura 20. Diâmetro médio (D_M) das nanopartículas de ouro (AuNPs) obtidos por meio de histogramas de distribuição de tamanho para os nanocompósitos AuNP-PLU sintetizados nas concentrações de PLU de: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mmol L⁻¹ (pontos em preto) com a concentração de H[AuCl₄] em 2 mmol L⁻¹. E nas concentrações de H[AuCl₄]: 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mmol L⁻¹ (pontos em vermelho) com a concentração de PLU fixa em 2 mmol L⁻¹.

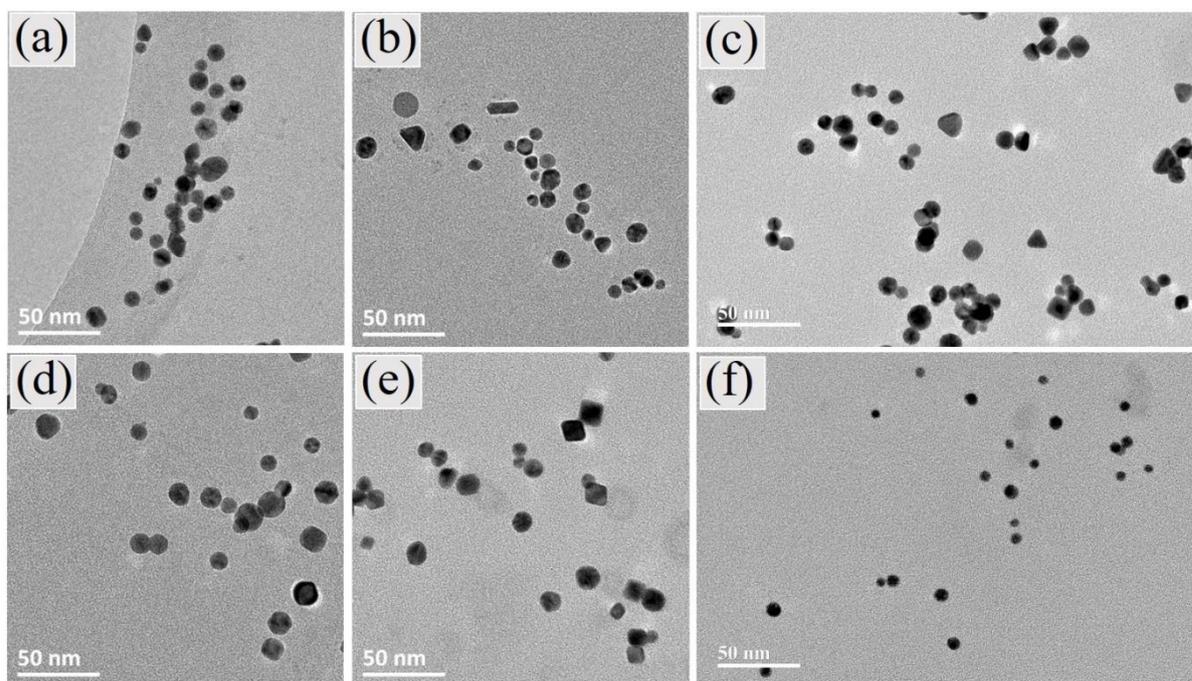


Figura 21. Micrografias de MET dos nanocompósitos AuNP-PLU variando-se concentração de PLU de: (a) 0,3 mmol L⁻¹ (2F), (b) 0,5 mmol L⁻¹ (3F), (c) 1,0 mmol L⁻¹ (4F); (d) 2,0 mmol L⁻¹ (5F); (e) 4 mmol L⁻¹ (6F); e (f) 8 mmol L⁻¹ (8F). Escala de 50 nm.

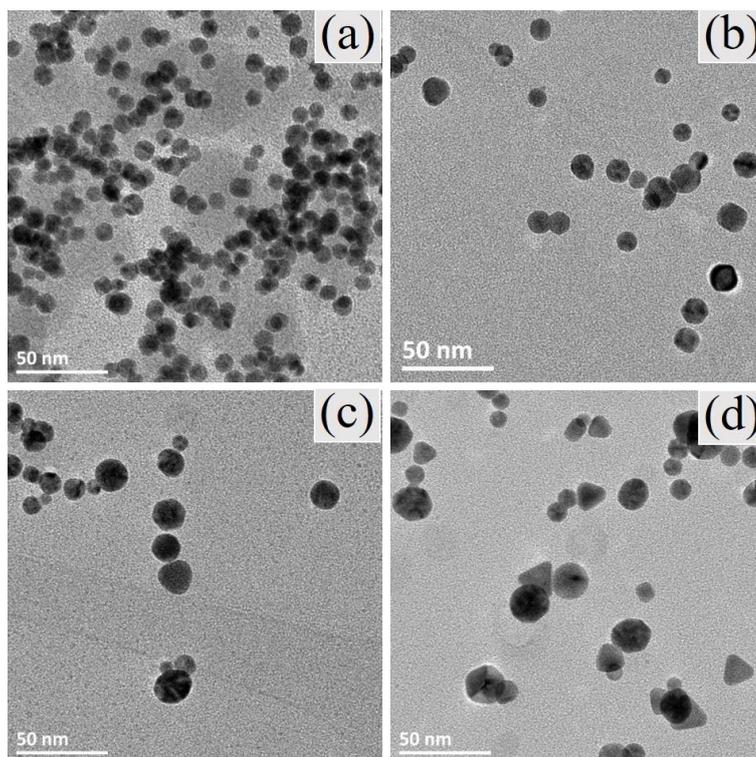


Figura 22. Micrografias de MET dos nanocompósitos AuNP-PLU sintetizados com concentração de HAuCl_4 de: (a) 1 mmol L^{-1} (10F); (b) 2 mmol L^{-1} (5F); (c) 3 mmol L^{-1} (11F) e (d) 4 mmol L^{-1} (12F). A concentração de PLU permaneceu fixa em 2 mmol L^{-1} . Escala de 50 nm.

A voltametria cíclica (VC) foi empregada para investigar a presença de íons de ouro não reduzidos nos nanocompósitos sintetizados sob fotoexcitação variando a concentração de PLU e de HAuCl_4 . Para efeito de comparação a amostra AuNP-PLU:3A sintetizada na menor concentração de PLU ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) pelo método controle também foi analisada por VC. A Fig. 23 apresenta os voltamogramas dos nanocompósitos preparados por fotoexcitação, AuNP-PLU:1F, com a menor concentração de PLU ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e o AuNP-PLU:12F que tem a maior concentração de HAuCl_4 (4 mmol L^{-1}); e a amostra AuNP-PLU:3A com a menor concentração de PLU ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) sintetizado no método controle - Tab. 1. Os nanocompósitos com concentrações inferiores a $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de PLU (amostras AuNP-PLU:1A e AuNP-PLU:2A) apresentaram sedimentação das nanopartículas antes do final da reação, e por isso, não foram utilizadas nessa análise.

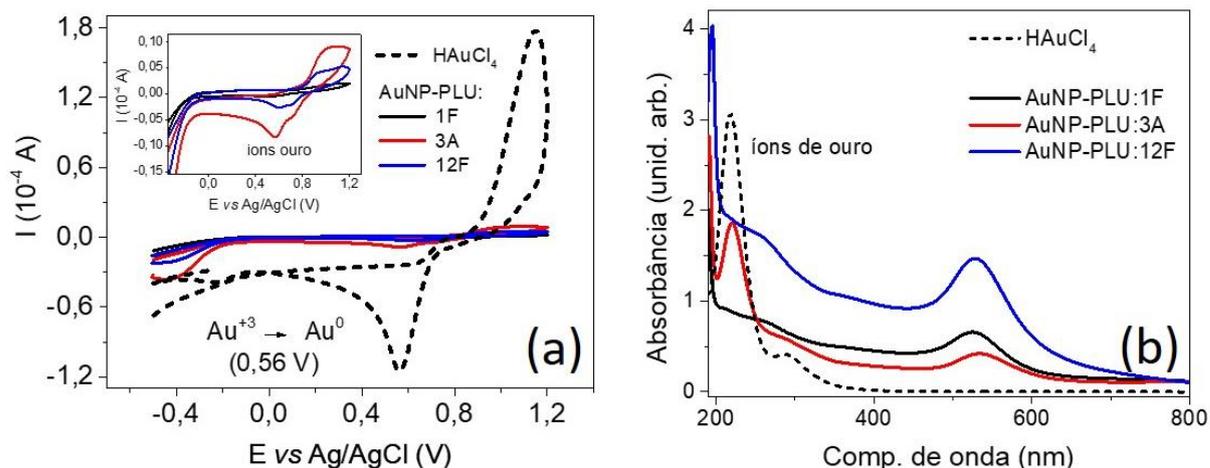


Figura 23. (a) Voltamogramas cíclicos dos nanocompósitos AuNP-PLU sintetizados por fotoexcitação AuNP-PLU:1F (0,1 mmol L⁻¹ de PLU e 2 mmol L⁻¹ de HAuCl₄) e AuNP-PLU:12F (2 mmol L⁻¹ de PLU e 4 mmol L⁻¹ de HAuCl₄) e pelo método controle AuNP-PLU:3A (0,5 mmol L⁻¹ de PLU e 2 mmol L⁻¹ de HAuCl₄); Inset: voltamogramas cíclicos dos nanocompósitos AuNP-PLU:1F (linha preta), AuNP-PLU:3A (linha vermelha) e AuNP-PLU:12F (linha azul). (b) Espectros de UV-vis dos nanocompósitos apresentados em (a).

Observa-se na Fig. 23 que o voltamograma do nanocompósito AuNP-PLU:1F, produzido sob fotoexcitação com a menor concentração de PLU estudada (0,1 mmol L⁻¹) indica a completa redução dos íons de ouro (HAuCl₄ = 2 mmol L⁻¹) devido à ausência do pico catódico próximo a 0,56V associado à reação ($\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$), quando comparado aos outros nanocompósitos e a solução de HAuCl₄. Entretanto, o nanocompósito controle AuNP-PLU:3A sintetizado com 0,5 mmol L⁻¹ de PLU e 2 mmol L⁻¹ HAuCl₄ (mesma concentração HAuCl₄ do nanocompósito AuNP-PLU:1F) exibe maior pico catódico em 0,56 V comparado com as outras amostras. Em proporção da quantidade de íons de ouro adicionados, esse nanocompósito possui 7% de íons de ouro não reduzidos, enquanto os nanocompósito fotoexcitado AuNP-PLU:1F apresenta 0,3% e o AuNP-PLU:2F apresenta 1,5%. Desta forma, a síntese fotoexcitada apresenta a melhor eficiência de redução mesmo nas maiores concentrações de HAuCl₄. Na Fig. 12(b) é possível observar a presença de uma intensa banda em 220 nm confirmando a presença dos íons de ouro não reduzidos na amostra controle (AuNP-PLU:3A). A síntese controle apresenta completa redução dos íons de ouro quando a concentração de PLU é 2 mmol L⁻¹ como mostrado no trabalho de Gomes et al. [22] (Anexo).

Considerando-se que os resultados obtidos pela voltametria cíclica indicam que nos nanocompósitos sintetizados com fotoexcitação ocorre a completa redução dos íons de ouro, estimou-se o tempo de reação para a formação dos AuNP-PLU considerando-se uma eficiência de redução de 99%, indicados pelos valores da corrente catódica, e os valores da constante de taxa (K_{obs}) da Fig. 17 (Apêndice D).

A Fig. 24 apresenta os valores teóricos para o tempo médio de reação das em função da concentração de PLU (amostras do conjunto I (pontos em vermelho)) e da concentração de HAuCl_4 (conjunto II (pontos em preto)). O tempo de síntese com luz UV não é alterado para concentrações de PLU $> 1 \text{ mmol L}^{-1}$ permanecendo próximo de 11 min. Enquanto para as amostras do conjunto II o tempo de síntese varia de 7 a 17 min mostrando que um tempo maior de exposição a luz UV é necessário para reduzir maiores concentrações de íons de ouro. Pelas análises realizadas os resultados indicam que a amostra AuNP-PLU:5F (contem 2 mmol L^{-1} de HAuCl_4 e de PLU) é a mais adequada para a formação dos nanocompósitos AuNP-PLU sob fotoexcitação.

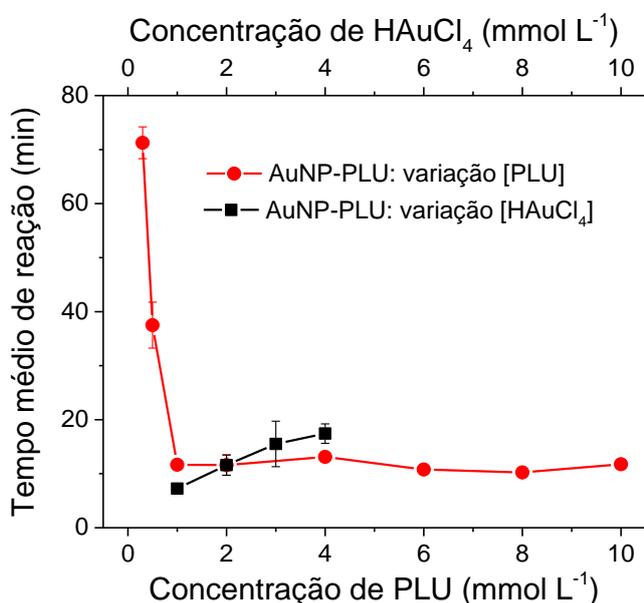


Figura 24. Tempo médio de reação de formação dos nanocompósitos em função da concentração de PLU (pontos vermelhos) e da concentração de HAuCl_4 (pontos pretos). A linha é um guia visual.

4.3 Crescimento sucessivo AuNps via sementes de Au⁰.

Com o objetivo de aumentar o tamanho das nanopartículas de ouro produzidas via fotoexcitação, as AuNPs foram crescidas em uma segunda etapa. As nanopartículas de ouro já formadas foram usadas como sementes para a repetição da etapa de síntese sob fotoexcitação. O sucessivo crescimento das AuNPs foi observado com a adição de mais íons de ouro na dispersão coloidal conforme foi descrito na seção 2.2. Várias razões molares de Au(0)/Au(III) foram testadas e obteve-se a total redução dos íons HAuCl₄ com a razão igual a 0,5. Os nanocompósitos AuNP-PLU:4F e AuNP-PLU:5F apresentaram crescimento das AuNPs adicionando-se 0,1 mmol L⁻¹ de HAuCl₄ em cada um na proporção de 1:1 v/v e fotoexcitados durante 50 min.

A Fig. 25 apresenta os espectros de UV-vis dos nanocompósitos AuNP-PLU:4F e AuNP-PLU:5F, antes e depois da adição dos íons de ouro. Os nanocompósitos com as AuNPs crescidas foram identificados por AuNP-PLU:4F-*grown* e AuNP-PLU:5F-*grown*. O leve deslocamento para o azul da banda LSPR e o seu alargamento nos nanocompósitos crescidos indicam a alteração do tamanho dos nanocompósitos que podem estar associados ao aumento de tamanho das partículas metálicas sintetizadas nesse novo processo. Por outro lado, a ausência da banda LMCT na região entre 200 e 300 nm confirma que os íons de ouro adicionados foram totalmente reduzidos.

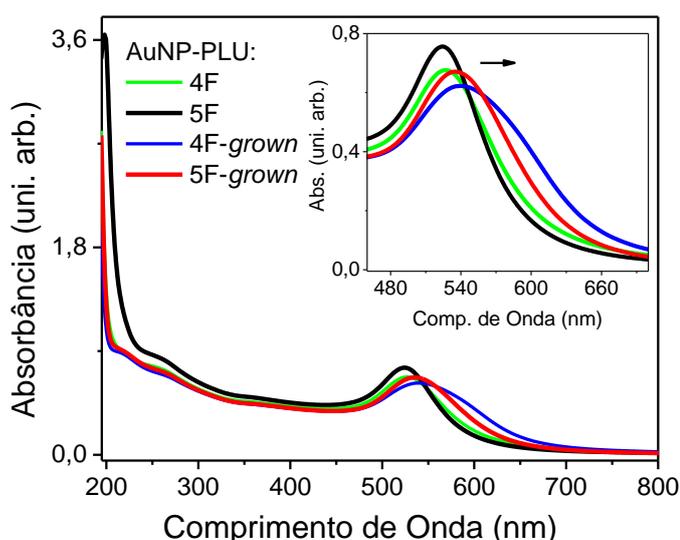


Figura 25. Espectro de UV-vis dos nanocompósitos crescidos identificados por: AuNP-PLU:4F-*grown* e AuNP-PLU:5F-*grown* tendo como sementes as AuNPs dos nanocompósitos AuNP-PLU:4F e 5F,

respectivamente. *Inset*: deslocamento da banda LSPR de 528 para 542 nm (AuNP-PLU: 4F para o AuNP-PLU:4F-grown) e de 526 para 537 nm (AuNP-PLU: 5F para AuNP-PLU:5F-grown).

A Fig. 26 apresenta as micrografias em alta resolução dos nanocompósitos AuNP-PLU:4F e AuNP-PLU:5F antes da adição de íons de ouro, quando consideradas como sementes, com $D_M = 10,4$ e $D_M = 12,2$ nm, respectivamente e após o crescimento, AuNP-PLU:4F-grown e AuNP-PLU:5F-grown com $D_M = 12,2$ e $D_M = 15,4$ nm. Esse aumento de aproximadamente 2 e 3 nm foi observado nas imagens de MET em alta resolução por uma camada menos densa. A região central possui o mesmo tamanho das sementes de cada amostra, podendo indicar que os íons de ouro adicionados nessa segunda etapa de síntese estão sendo reduzidos na superfície das AuNPs (sementes) permitindo o seu crescimento.

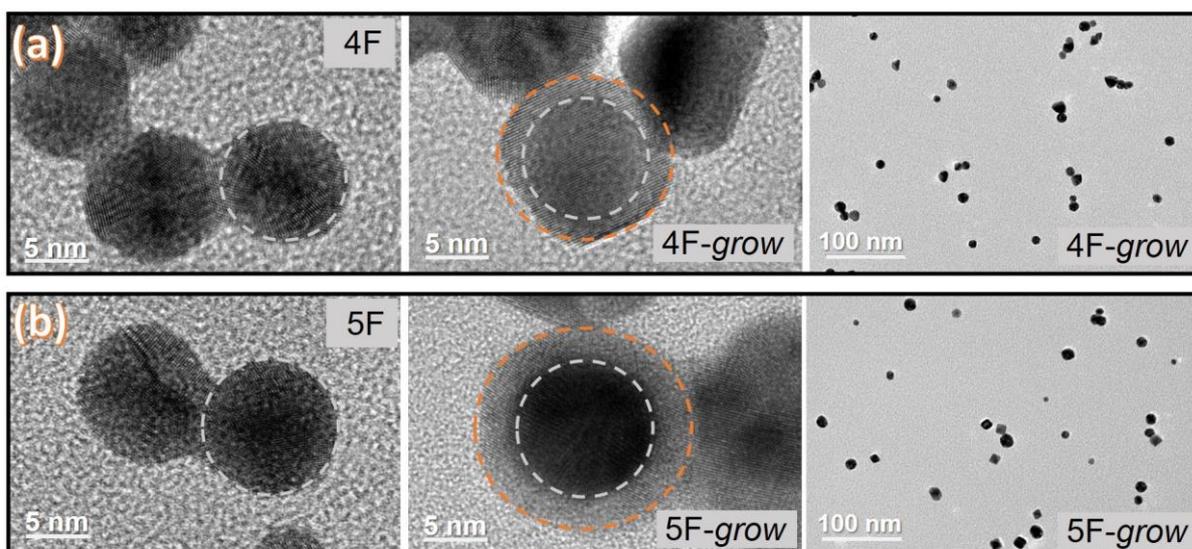


Figura 26. Crescimento sucessivo das AuNPs via adição de íons de ouro na dispersão coloidal AuNP-PLU:4F (a) e AuNP-PLU:5F (b), aqui consideradas como sementes, indicadas por 4F e 5F, respectivamente. Após crescimento as novas AuNPs foram nomeadas por 4F-grow e 5F-grow, respectivamente. As linhas pontilhadas é para facilitar a visualização do tamanho original da semente na parte mais densa da figura. Escala de 5 e 100 nm.

O crescimento observado nas AuNPs do nanocompósito AuNP-PLU:5F na Fig. 26 não resultou em alteração no tamanho hidrodinâmico que permaneceu próximo de 37 nm. Mas, no espectro de infravermelho (FTIR-ATR) observou-se um deslocou a banda de vibração de estiramento do grupo éter $\nu(\text{C-O-C})$. Um

deslocamento de 4 cm^{-1} para maiores números de onda (1110 para 1114 cm^{-1}) da amostra AuNP-PLU:5F-*grown* em relação a amostra AuNP-PLU:5F (crescida) foi observado. Além disso, a banda referente à oxidação do PLU também foi encontrada na mesma região da Fig. 2. Esses resultados podem indicar que a criação de interfaces iniciais formadas por nanopartículas em dispersão cria ambientes que redirecionam o crescimento das AuNPs para processos não clássicos (redução de íons de ouro no bulk) como foi relatado na literatura[32]. Desta forma, o crescimento sucessivo das AuNPs via adição consecutiva de íons de ouro na dispersão pode ocorrer pela ativação da luz UV. Realizando o mesmo procedimento com amostras controle (sintetizadas com luz ambiente) não foi observado crescimento das nanopartículas.

4.4 Estabilidade do Nanocompósito

A estabilidade dos nanocompósitos produzidos foi estudada em função do tempo e da temperatura (23° e 10°C). Quando os nanocompósitos foram estocados à temperatura ambiente (23°C), os resultados mostraram uma dependência com a concentração do PLU usada na síntese. Os nanocompósitos com baixa concentração de PLU ($< 1 \text{ mmol L}^{-1}$) apresentam sinais de sedimentação das AuNPs após 15 dias, com $D_H \sim 100 \text{ nm}$. Enquanto para concentrações de PLU $> 2 \text{ mmol L}^{-1}$ apresentam sinais de agregação após 20 dias com $D_H \sim 60 \text{ nm}$.

Quando os nanocompósitos foram armazenadas a 10°C , as amostras com concentrações de PLU $> \text{CMC}$ apresentaram estabilidade por até 60 dias depois de sintetizadas. Os dados obtidos a partir do monitoramento por 60 dias do nanocompósito AuNP-PLU-5F são apresentados na Fig. 27 observando-se que a banda plasmônica (LSPR) permanece inalterada, enquanto o diâmetro hidrodinâmico permanece praticamente constante, $D_H \sim 37 \text{ nm}$ durante todo período. Portanto, a melhor condição de armazenamento dos nanocompósitos, entre as temperaturas estudadas, para conservar todas as suas propriedades é a 10°C .

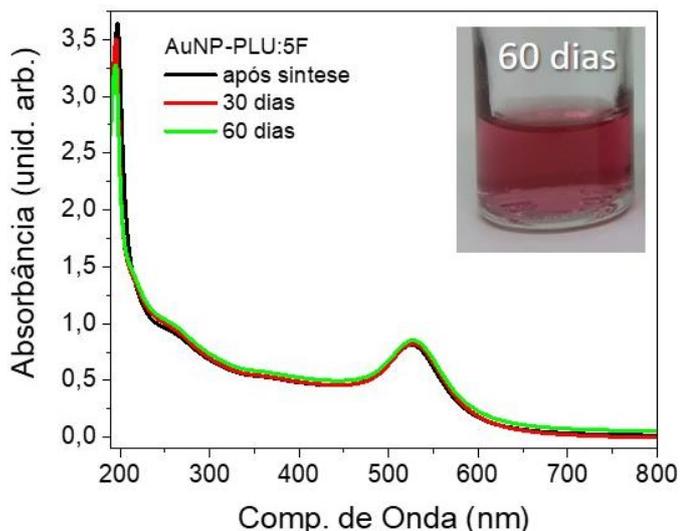


Figura 27. Espectros de absorvância UV-vis do nanocompósito AuNP-PLU:5F após a síntese, com 30 e 60 dias de armazenamento a 10°C, conforme indicação. *Inset*: Imagem digital após 60 dias.

A estabilidade do nanocompósito AuNP-PLU:5F também foi investigada para pH neutro visando aplicações biológicas. O estudo foi realizado tomando-se uma alíquota do nanocompósito AuNP-PLU-5F, que foi centrifugada e ressuspendida em solução tampão (PBS, pH=7,23) em duas proporções: 1:1 e 1:4. Os espectros de UV-vis registrados no momento da diluição e após 24h do preparo estão apresentados na Fig. 28 (a) com imagens digitais das dispersões coloidais e em (b) a micrografia obtida por MET do AuNP-PLU-5F diluído em 1:4 em PBS na escala de 100 nm e *inset* na escala de 5 nm.

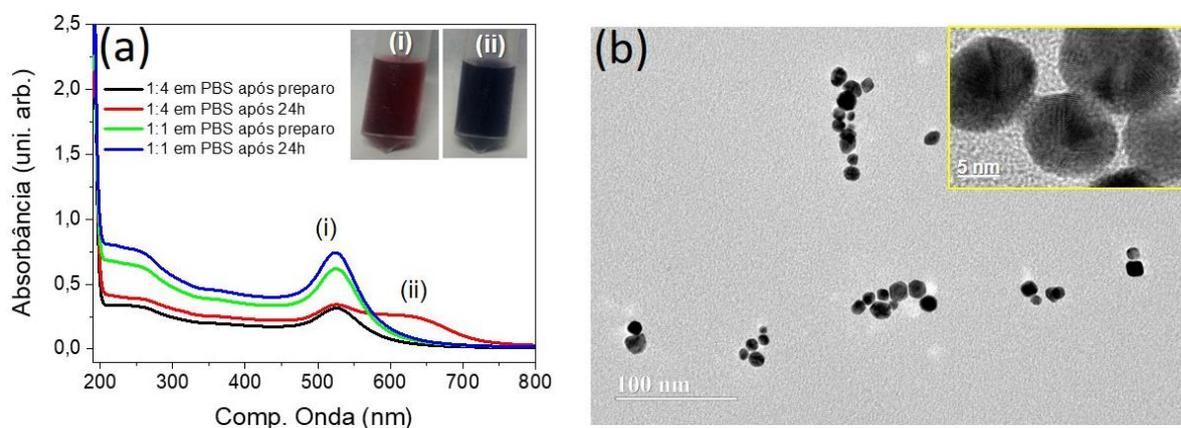


Figura 28. (a) Espetros de absorvância no UV-vis do nanocompósito AuNP-PLU:5F centrifugado e ressuspendido em solução de PBS: 1:1 e 1:4, conforme indicação e *inset* imagens digitais da dispersão

coloidal. (b) Micrografia MET do nanocompósito diluído em 1:4 em PBS. Escala 100 nm e *inset*: imagem alta resolução com escala de 5 nm.

O diâmetro hidrodinâmico do nanocompósito com diluição de 1:1 em PBS permanece em próximo de 39 nm, enquanto o AuNP-PLU ressuspenso em PBS na proporção de 1:4 apresenta D_H próximo de 76 nm. O D_H do nanocompósito AuNP-PLU utilizado neste estudo é de 37 nm. Observa-se então que quando diluído na menor proporção de PBS nenhum efeito de agregação é visualizado com o pH = 6,5 a 21°C. Por outro lado, uma agregação é promovida quando o nanocompósito é diluído em 1:4 tendo o pH = 7,1 a 21°C que pode ser causado pelo aumento do pH ou da salinidade do meio; ou pela interação com algum elemento presente no tampão (cloro, potássio, fosfato e sódio). Para esclarecer este fato outras análises devem ser realizadas com controle dessas condições do meio. Contudo, essas amostras quando armazenadas sob refrigeração (10°C) permanecem estáveis por 60 dias.

4.5 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

A *viabilidade celular in vitro* dos nanocompósitos foi avaliada com a linhagem celular NIH-3T3 (fibroblastos), que está presente em todo tecido conjuntivo humano, empregando-se o protocolo MTT. Este ensaio foi realizado para dois tempos de incubação 15 min e 24h. Os períodos de incubação foram definidos considerando-se o estudo realizado *in vivo* com nanocompósitos (AuNP@PEG)[3,63]. Os resultados mostraram que AuNPs com tamanhos na faixa de 4-13 nm permanecem na corrente sanguínea por 24h enquanto nanopartículas maiores (~100 nm) são rapidamente absorvidas pelo fígado, baço e apresentam menos tempo de circulação. Estabeleceu-se o tempo de 15 min para uma avaliação preliminar da citotoxicidade induzida e o de 24 h.

A Fig. 29 apresenta a *viabilidade celular* dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A para os dois tempos de incubação avaliados em função da concentração relativa. Essa concentração corresponde à percentagem de diluição da concentração inicial de cada amostra. Como parâmetro de referência (controle) utilizou-se células tratadas com a solução de PLU e células não tratadas (sem adição

de PLU ou nanocompósitos). Esta última será identificada como controle da viabilidade celular na Fig. 29. A Tabela 3 apresenta as concentrações de PLU, ouro (Au^0) e de nanopartículas para cada diluição apresentada na Fig. 29.

Tabela 3. Valores das concentrações dos solutos em cada diluição empregada no ensaio de MTT: a concentração do PLU puro (solução aquosa); a concentração de PLU nas dispersões coloidais, a concentração de ouro coloidal (Au_0) e de nanopartículas (AuNP-PLU) para os nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A.

Concentração relativa (%)	PLU puro (mmol L^{-1})	PLU coloidal (mmol L^{-1})		[Au ⁰] coloidal (mmol L^{-1})		[AuNPs] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
		5F	5A	5F	5A	5F	5A
0,8	0,016	0,013	0,015	0,025	0,022	0,109	0,027
1,6	0,032	0,026	0,031	0,049	0,044	0,218	0,054
3,1	0,062	0,051	0,060	0,096	0,086	0,422	0,105
6,3	0,126	0,208	0,122	0,195	0,175	0,857	0,214
12,5	0,250	0,206	0,241	0,386	0,346	1,70	0,425

Para tempo de incubação de 15 min (Fig. 29 (a)) verifica-se uma viabilidade celular acima de 80% para todas diluições seriadas dos nanocompósitos e do PLU puro. Nenhuma variação estatística foi verificada entre o grupo controle e o grupo tratado com os nanocompósitos ou com a solução de PLU puro. Entre os grupos na mesma concentração de diluição ou entre a mesma amostra em diferentes concentrações não foi verificado nenhuma citotoxicidade induzida. Isto sugere que o tratamento de 15 min não promoveu alteração na viabilidade celular que pode ser devido à alta biocompatibilidade dos nanocompósitos e/ou porque o tempo utilizado não foi suficiente para a incorporação dos mesmos nas células.

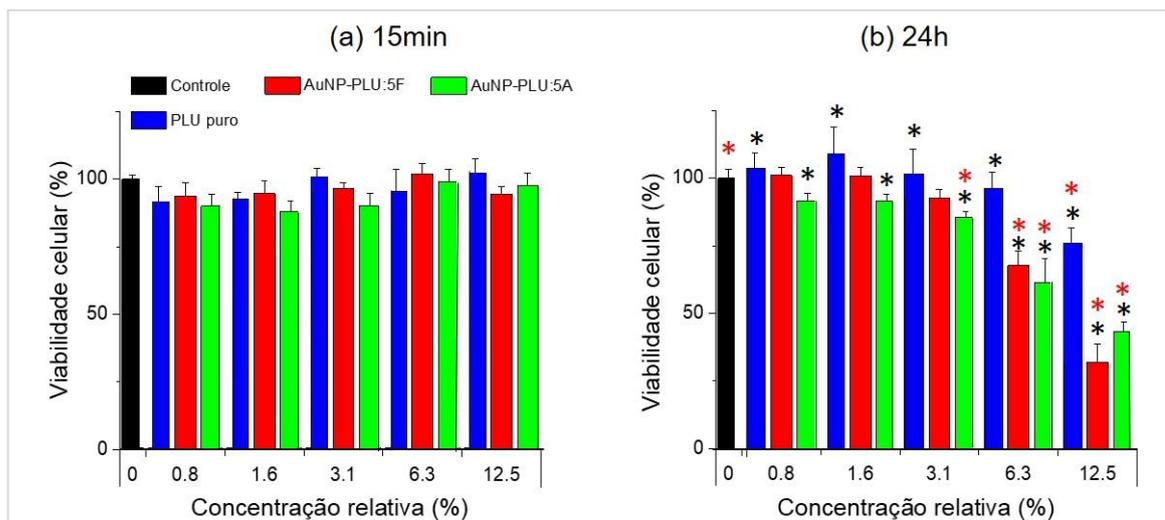


Figura 29. Viabilidade celular dos nanocompósitos AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A e para a solução de PLU puro (sem AuNPs) em função da diluição seriada no tempo de incubação de 15min (a) e 24h (b). Como controle foram utilizadas células sem tratamento (adição de PLU ou nanocompósitos). As concentrações relativas referem-se à percentagem de diluição da concentração inicial de cada amostra. As barras representam a média \pm desvio padrão. Os asteriscos referem-se a uma diferença estatística com significância de $p < 0,05$, e sua cor é para facilitar a comparação: vermelho com o grupo controle e preto entre as amostras e as amostras com o PLU.

Os resultados obtidos para o tempo de incubação de 24h apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre percentagem de viabilidade celular dos nanocompósitos e do grupo controle e também entre as amostras a partir da concentração relativa de 3,1 %. Os dados sugerem que os nanocompósitos e o PLU puro interagiram com as células de maneira diferente induzindo citotoxicidade apenas, no caso dos nanocompósitos, acima de 3,1 % e para o PLU na concentração de 12,5% (Fig. 29(b)). Observou-se que os grupos tratados PLU, AuNP-PLU:5F e AuNP-PLU:5A apresentam o mesmo comportamento com relação à viabilidade celular nas concentrações até 1,6 %, quando atinge um patamar de máxima viabilidade celular. Nessas concentrações o grupo tratado com a amostra sintetizada em luz ambiente (AuNP-PLU:5A – barra verde) apresenta uma leve diminuição na viabilidade, detectada estatisticamente, em relação à solução de PLU puro (barra azul). É provável que isso seja efeito da presença das nanopartículas de ouro. Entre as amostras AuNP-PLU:5A e AuNP-PLU:5F não há diferença estatística, indicando que a diferença de diâmetro, 20 e 12 nm não exerce influência. Uma diferença estatística muito pequena (significância de $p < 0,04$) entre as amostras a AuNP-PLU:5F e

AuNP-PLU:5A aparece apenas na concentração de 12,5%. É provável que a elevada concentração de AuNPs da amostra fotoexcitada em relação à amostra sintetizada com luz ambiente (veja Tab. 3) esteja contribuindo para esta variação na citotoxicidade. Contudo, a amostra fotoexcitada apresenta dados estatísticos melhores que a amostra sintetizada em luz ambiente. Nas concentrações abaixo de 3,1% nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) é verificada entre o grupo tratado com o nanocompósito AuNP-PLU:5F e o grupo tratado com PLU e com o grupo controle (sem tratamento) confirmando a alta compatibilidade do nanocompósito nessas condições.

À medida que a diluição diminui, ou seja a porcentagem relativa da concentração inicial aumenta, é observado uma queda na viabilidade celular dos nanocompósitos em relação ao grupo tratado somente com PLU e ao grupo controle (sem tratamento). Não se verificou nenhuma variação estatística entre o grupo tratado com PLU puro com o grupo controle, e entre as diferentes concentrações de PLU.

O valor do IC-50 de PLU para os nanocompósitos estudados foi obtido a partir da curva dose-resposta. Com o valor da concentração de PLU determinou-se a concentração de ouro para o valor mediante ao valor encontrado para o copolímero ($C_1V_1=C_2V_2$). Os resultados encontrados foram: 0,18 mmol L⁻¹ e 0,20 mmol L⁻¹ onde a concentração de ouro é de 0,34 e 0,29 mmol L⁻¹. Connor et al. [64] mostrou que nanopartículas preparadas pelo método Turkevich (~18 nm) com a superfície modificada por cisteína são atóxicas em células K562 (leucemia) até a concentração de 0,25 mmol L⁻¹ após 3 dias de tratamento. Este resultado é similar aquele encontrado para a amostra controle. Por outro lado, a biocompatibilidade do copolímero (F127 ou PLU) encontrada neste estudo também foi verificada no trabalho de Jin et al. [65]. Nenhuma variação da viabilidade celular de células HeLa foi encontrada até a concentração de 19,8 mmol L⁻¹ após 48h de tratamento, mostrando a boa compatibilidade do PLU puro.

Capítulo 5

CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizadas com sucesso nanopartículas de ouro com fotoexcitação de mistura reacional contendo íons de ouro (HAuCl_4) e o copolímero Pluronic F127.

Quando se compara os dados obtidos na síntese aqui desenvolvida, com amostras controle sintetizadas sem a presença da radiação UV, verifica-se que a nucleação foi favorecida na síntese fotoexcitada enquanto o crescimento foi predominante na síntese controle. Em adição, observa-se que a síntese pode ser realizada com concentrações de PLU na faixa de 0,1 a 10 mmol L^{-1} , maior do que no caso da síntese realizada em condições ambiente (0,5 a 10 mmol L^{-1}); enquanto o tempo de formação dos nanocompósitos híbridos AuNP-PLU foi reduzido de no mínimo 60 min para 10 min na síntese fotoexcitada; AuNPs produzidas com fotoexcitação apresentam uma distribuição de tamanho estreita, enquanto as produzidas via síntese controle apresentam uma grande polidispersividade de tamanho.

Quando há incidência de luz UV na reação redox a cinética da reação e o mecanismo de formação das AuNPs são alterados. A cinética da reação parece ser independente da concentração de PLU quando o regime micelar é alcançado ($\text{PLU} > 1 \text{ mmol L}^{-1}$) e a reação redox ocorre mediante a excitação e desproporcionamento do íon metálico com oxidação do copolímero. A evidência desse processo de oxidação foi observada nos espectros FTIR-ATR que sugerem a presença dos produtos de oxidação.

As características morfológicas das AuNPs dependem da concentração, observou-se uma redução no diâmetro médio de 13 para 7 nm com a variação na concentração de PLU de 0,1 a 8 mmol L^{-1} , com a concentração do precursor metálico

fixa em 2 mmol L^{-1} . Por outro lado, quando a concentração do HAuCl_4 na síntese foi variada, mantendo-se a concentração de PLU em 2 mmol L^{-1} , obteve-se diâmetros médios na faixa de 10 a 12 nm. Análises eletroquímicas obtidas por voltametria cíclica mostraram que a síntese no caso dos nanocompósitos obtidos com fotoexcitação, ocorre a completa redução dos íons de ouro até mesmo na menor concentração de PLU estudada ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) confirmando a eficiência de redução do precursor. O mesmo não ocorre para as amostras controle que apresentaram seu maior rendimento na concentração de 2 mmol L^{-1} de PLU.

Em uma segunda etapa de síntese verificou-se que o crescimento das AuNPs pode ser controlado mediante a adição de íons de ouro em dispersões contendo AuNPs seguida de fotoexcitação, de modo as nanopartículas presentes no meio aquoso nucleiem os íons de ouro adicionados. O resultado foi um aumento de diâmetro de 12,2 para 15,4 nm para no nanocompósito AuNP-PLU:5F.

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células NIH-3T3 mostraram que os nanocompósitos são atóxicos após incubação por 24h, empregando-se a metodologia MTT para concentrações de PLU $< 0,18 \text{ mmol L}^{-1}$ e de $\text{Au}^0 < 0,34 \text{ mmol L}^{-1}$.

Em resumo, a investigação detalhada das propriedades dos nanocompósitos AuNP-PLU, mostrou que a introdução da fotoexcitação durante a formação das AuNPs na presença de PLU melhora as propriedades dos nanomateriais produzidos, por exemplo, para a solução reacional padrão, diminui o tempo de síntese para 10 min reduzindo todo o precursor metálico, enquanto no processo de síntese em condições ambiente, o tempo necessário é de 60 min, ainda se observa resíduo do precursor metálico indicado pela presença banda LMCT no espectro de UV-vis e o pico catódico em 0,56 V no voltamograma cíclico.

O estudo detalhado das propriedades da amostra controle, sintetizada em condições ambiente, permitiu a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos, contribuindo para elucidar o processo de formação das AuNPs na presença de copolímeros no método síntese já existente, sem a presença da radiação UV.

Como perspectivas para continuidade deste trabalho sugere-se avaliar o potencial de aplicação dos nanocompósitos desenvolvidos como agentes de contraste em imagens de raios X e para entrega direcionada de fármacos. Em outra abordagem, a produção de nanofilmes com os nanocompósitos sintetizados e o estudo de suas

propriedades. Como complemento do estudo desenvolvido, sugere-se a investigação do processo de síntese das AuNPs em outros copolímeros com fotoexcitação.

REFERÊNCIAS

- [1] C. Louis, O. Plucherry, O. Pluchery, *Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology*, Imperial C, Université Pierre et Marie Curie, France, 2012.
- [2] E.S. Medeiros, L.G. Paterno, L.H.C. Mattoso, *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*, in: *Nanotecnologia*, 1 ed, Artiber, São Paulo, 2012: p. 208.
- [3] P. Tiwari, K. Vig, V. Dennis, S. Singh, *Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications*, *Nanomaterials*. 1 (2011) 31–63. doi:10.3390/nano1010031.
- [4] Y.T. Tung, C.C. Chang, Y.L. Lin, S.L. Hsieh, G.J. Wang, *Development of double-generation gold nanoparticle chip-based dengue virus detection system combining fluorescence turn-on probes*, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 90–98. doi:10.1016/j.bios.2015.09.007.
- [5] A.B. Bucharskaya, G.N. Maslyakova, M.L. Chekhonatskaya, G.S. Terentyuk, N.A. Navolokin, B.N. Khlebtsov, N.G. Khlebtsov, A.N. Bashkatov, E.A. Genina, V. V. Tuchin, *Plasmonic photothermal therapy: Approaches to advanced strategy*, *Lasers Surg. Med.* (2018) 1–9. doi:10.1002/lsm.23001.
- [6] L.E. Cole, R.D. Ross, J.M. Tilley, T. Vargo-Gogola, R.K. Roeder, *Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography.*, *Nanomedicine (Lond)*. 10 (2015) 321–41. doi:10.2217/nnm.14.171.
- [7] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, *The Formation of Colloidal Gold*, *J. Phys. Chem.* 57 (1953) 670–673. doi:10.1021/j150508a015.
- [8] M.K. Chow, C.F. Zukoski, *Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability*, *J. Colloid Interface Sci.* 165 (1994) 97–109. doi:10.1006/jcis.1994.1210.
- [9] L. Shi, E. Buhler, F. Boué, F. Carn, *How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question*, *J. Colloid Interface Sci.* 492 (2017) 191–198. doi:10.1016/j.jcis.2016.10.065.
- [10] S.R.K. Perala, S. Kumar, *On the Mechanism of Metal Nanoparticle Synthesis in*

- the Brust–Schiffrin Method, *Langmuir*. 29 (2013) 9863–9873. doi:10.1021/la401604q.
- [11] T. Sakai, P. Alexandridis, Single-step synthesis and stabilization of metal nanoparticles in aqueous pluronic block copolymer solutions at ambient temperature, *Langmuir*. 20 (2004) 8426–8430. doi:10.1021/la049514s.
- [12] T. Sakai, P. Alexandridis, Size- and shape-controlled synthesis of colloidal gold through autoreduction of the auric cation by poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers in aqueous solutions at ambient conditions., *Nanotechnology*. 16 (2005) S344-53. doi:10.1088/0957-4484/16/7/006.
- [13] T. Sakai, P. Alexandridis, Mechanism of gold metal ion reduction, nanoparticle growth and size control in aqueous amphiphilic block copolymer solutions at ambient conditions, *J. Phys. Chem. B*. 109 (2005) 7766–7777. doi:10.1021/jp046221z.
- [14] P. Alexandridis, Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers, *Chem. Eng. Technol*. 34 (2011) 15–28. doi:10.1002/ceat.201000335.
- [15] T. Sakai, P. Alexandridis, Spontaneous Formation of Gold Nanoparticles in Poly(ethylene oxide) - Poly(propylene oxide) Solutions: Solvent Quality and Polymer Structure Effects, *Langmuir*. 170 (2005) 8019–8025. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la050756h>.
- [16] M. Mandal, S.K. Ghosh, S. Kundu, K. Esumi, T. Pal, UV photoactivation for size and shape controlled synthesis and coalescence of gold nanoparticles in micelles, *Langmuir*. 18 (2002) 7792–7797. doi:10.1021/la0118107.
- [17] Y. Shang, C. Min, J. Hu, T. Wang, H. Liu, Y. Hu, Synthesis of gold nanoparticles by reduction of H₂AuCl₄ under UV irradiation, *Solid State Sci*. 15 (2013) 17–23. doi:10.1016/j.solidstatesciences.2012.09.002.
- [18] P.R. Teixeira, M.S.C. Santos, A.L.G. Silva, S.N. Báo, R.B. Azevedo, M.J.A. Sales, L.G. Paterno, Photochemically-assisted synthesis of non-toxic and biocompatible gold nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 148 (2016) 317–323. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.09.002.
- [19] S. Eustis, M.A. El-Sayed, Molecular mechanism of the photochemical generation of gold nanoparticles in ethylene glycol: Support for the disproportionation mechanism, *J. Phys. Chem. B*. 110 (2006) 14014–14019. doi:10.1021/jp062972k.

- [20] D.C. Santos, V.C. de Souza, D.A. Vasconcelos, G.R.S. Andrade, I.F. Gimenez, Z. Teixeira, Triblock copolymer-mediated synthesis of catalytically active gold nanostructures, *J. Nanoparticle Res.* 20 (2018). doi:10.1007/s11051-018-4212-8.
- [21] S. Eustis, M.A. El-Sayed, S.H. Cha, J.U. Kim, K.H. Kim, J.C. Lee, Preparation of gold nanosheets using poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers via photoreduction, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 110 (2007) 182–186. doi:10.1016/j.mseb.2007.03.016.
- [22] D.S.B. Gomes, L.G. Paterno, A.B.S. Santos, A. V. Garay, D. Mertz, S.M. Freitas, M.A.G. Soler, New insights on the formation of gold nanoparticles and Pluronic nanocomposites: Kinetics and thermodynamics parameters, *J. Mol. Liq.* 268 (2018) 181–189. doi:10.1016/j.molliq.2018.07.042.
- [23] S. Cotton, *Chemistry of Precious Metals*, 1° ed, Rutland UK, 1997.
- [24] S.A. Maier, *Plasmonics Fundamentals and Applications*, Springer, New York, USA, 2007.
- [25] P.K. Jain, K.S. Lee, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 7238–7248. doi:10.1021/jp057170o.
- [26] S. Eustis, M.A. El-Sayed, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 209–217. doi:10.1039/b514191e.
- [27] W. Rechberger, A. Hohenau, A. Leitner, J.R. Krenn, B. Lamprecht, F.R. Aussenegg, Optical properties of two interacting gold nanoparticles, *Opt. Commun.* 220 (2003) 137–141. doi:10.1016/S0030-4018(03)01357-9.
- [28] M. Notarianni, K. Vernon, A. Chou, M. Aljada, J. Liu, N. Motta, Plasmonic effect of gold nanoparticles in organic solar cells, *Sol. Energy.* 106 (2014) 23–37. doi:10.1016/j.solener.2013.09.026.
- [29] A.Y. Cho, J.R. Arthur, Molecular beam epitaxy, *Prog. Solid State Chem.* 10 (1975) 157–191. doi:https://doi.org/10.1016/0079-6786(75)90005-9.
- [30] T.C.R. Rocha, *Nanopartículas Metálicas Anisotrópicas: Mecanismo de Formação e Aplicações Ópticas*, Tese Doutorado, UNICAMP. (2008).
- [31] L.D. Pachón, G. Rothenberg, Transition-metal nanoparticles: Synthesis, stability

- and the leaching issue, *Appl. Organomet. Chem.* 22 (2008) 288–299. doi:10.1002/aoc.1382.
- [32] K. Mallick, Z.L. Wang, T. Pal, Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: a photochemical approach for size-controlled synthesis, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 140 (2001) 75–80. doi:10.1016/S1010-6030(01)00389-6.
- [33] S. Wustoni, D. Phan, Sustainable synthesis of gold nanorods assisted by cubic-shaped seeds as intermediate particles, *Inorg. Chem. Commun.* 93 (2018) 78–82. doi:10.1016/j.inoche.2018.05.014.
- [34] S.K. Sivaraman, S. Kumar, V. Santhanam, Journal of Colloid and Interface Science Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method – The role of chloroauric acid, *J. Colloid Interface Sci.* 361 (2011) 543–547. doi:10.1016/j.jcis.2011.06.015.
- [35] K. Rahme, L. Chen, R.G. Hobbs, M.A. Morris, C. O'Driscoll, J.D. Holmes, PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions, *RSC Adv.* 3 (2013) 6085. doi:10.1039/c3ra22739a.
- [36] K. Rahme, J. Oberdisse, R. Schweins, C. Gaillard, J.D. Marty, C. Mingotaud, F. Gauffre, Pluronic-stabilized gold nanoparticles: Investigation of the structure of the polymer-particle hybrid, *ChemPhysChem.* 9 (2008) 2230–2236. doi:10.1002/cphc.200800358.
- [37] T. Sakai, P. Alexandridis, Spontaneous formation of gold nanoparticles in poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) solutions: Solvent quality and polymer structure effects, *Langmuir.* 21 (2005) 8019–8025. doi:10.1021/la050756h.
- [38] I.M.A. Diniz, C. Chen, X. Xu, S. Ansari, H.H. Zadeh, M.M. Marques, S. Shi, A. Moshaverinia, Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 1–10. doi:10.1007/s10856-015-5493-4.
- [39] A. Pitto-Barry, N.P.E. Barry, Pluronic® block-copolymers in medicine: From chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances, *Polym. Chem.* 5 (2014) 3291–3297. doi:10.1039/c4py00039k.
- [40] V. Singh, P. Khullar, P.N. Dave, N. Kaur, Micelles, mixed micelles, and applications of polyoxypropylene (PPO)-polyoxyethylene (PEO)-

- polyoxypropylene (PPO) triblock polymers, *Int. J. Ind. Chem.* 4 (2013) 12. doi:10.1186/2228-5547-4-12.
- [41] K.R. Py-Daniel, J.S. Namban, L.R. De Andrade, P.E.N. De Souza, L.G. Paterno, R.B. Azevedo, M.A.G. Soler, Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 103 (2016) 23–31. doi:10.1016/j.ejpb.2016.03.028.
- [42] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, T.A. Hatton, Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association, *Macromolecules.* 27 (1994) 2414–2425. doi:10.1021/ma00087a009.
- [43] Delcio Daltin, *Tensoativos: Química, propriedades e aplicações*, 1° ed, Edgard Blucher, São Paulo-SP, 2012.
- [44] K. Saha, S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. Rotello, Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing, *Chem. Rev.* 112 (2012) 2739–2779. doi:10.1021/cr2001178.
- [45] S. Her, D.A. Jaffray, C. Allen, Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: mechanisms and recent advancements, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2015). doi:10.1016/j.addr.2015.12.012.
- [46] S.Y. Nam, L.M. Ricles, L.J. Suggs, S.Y. Emelianov, In vivo ultrasound and photoacoustic monitoring of mesenchymal stem cells labeled with gold nanotracers, *PLoS One.* 7 (2012) 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0037267.
- [47] X. Huang, W. Qian, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy, *Lasers Surg. Med.* 39 (2007) 747–753. doi:10.1002/lsm.20577.
- [48] T. Simon, S.C. Boca, S. Astilean, Pluronic-Nanogold hybrids: Synthesis and tagging with photosensitizing molecules, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 97 (2012) 77–83. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.03.037.
- [49] L.P. et. al Donald, *Introdução à Espectroscopia - Tradução da 5ª edição norte-americana - Donald L. Pavia; Gary M. Lampman; George S. Kriz; James R. Vyvyan.pdf*, Edição, 2°, cengage Learning, São Paulo, 2015.
- [50] Shimadzu, *UV-VIS Spectrophotometers: UV-2600/2700*, Shimadzu Corporation, Japan, 2012.
- [51] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principios de análisis instrumental*, 6 ed, cengage Learning, Austrália, 2008.
- [52] E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy - A prctical approach*, Wiley,

- England, 2005.
- [53] M. Farina, *Uma introdução a Microscopia Eletrônica de Transmissão*, 1 ed., Livraria da Física, São Paulo, 2010.
- [54] J.B. Berne, R. Pecora, *Dynamics Light Scattering*, 1° ed, DOVER SCIENCE, EUA, 2000.
- [55] J.J. Correia, W.F. Stafford, *Sedimentation Velocity: A Classical Perspective*, 2015. doi:10.1016/bs.mie.2015.06.042.
- [56] B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, 3° ed, WILEY-VCH, Federal Republic Germany, 1999.
- [57] I. Isothermal, Mcapn-2016-1, (2016) 1–5.
- [58] Y. Su, H. Liu, J. Wang, J. Chen, Study of Salt Effects on the Micellization of PEO-PPO- PEO Block Copolymer in Aqueous Solution by FTIR Spectroscopy, *Langmuir*. 18 (2002) 865–871.
- [59] E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, Wiley, England, 2005.
- [60] K. Paclawski, T. Sak, Kinetics and mechanism of the reaction of gold(III) chloride complexes with formic acid, *J. Min. Metall. Sect. B Metall.* 51 (2015) 133–142. doi:10.2298/JMMB141024017P.
- [61] T. Sakai, Y. Horiuchi, P. Alexandridis, T. Okada, S. Mishima, Block copolymer-mediated synthesis of gold nanoparticles in aqueous solutions: Segment effect on gold ion reduction, stabilization, and particle morphology, *J. Colloid Interface Sci.* 394 (2013) 124–131. doi:10.1016/j.jcis.2012.12.003.
- [62] P.R. Desai, N.J. Jain, R.K. Sharma, P. Bahadur, Effect of additives on the micellization of PEO/PPO/PEO block copolymer F127 in aqueous solution, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 178 (2001) 57–69. doi:10.1016/S0927-7757(00)00493-3.
- [63] W.S. Cho, M. Cho, J. Jeong, M. Choi, B.S. Han, H.S. Shin, J. Hong, B.H. Chung, J. Jeong, M.H. Cho, Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245 (2010) 116–123. doi:10.1016/j.taap.2010.02.013.
- [64] E.E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity, *Small*. 1 (2005) 325–327. doi:10.1002/sml.200400093.
- [65] E. Jin, Z. Zhang, H. Lian, X. Chen, C. Xiao, X. Zhuang, X. Chen, Injectable

- electroactive hydrogels based on Pluronic®F127 and tetraaniline copolymer, *Eur. Polym. J.* 88 (2017) 67–74. doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.01.013.
- [66] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, Q. Huo, Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 58 (2007) 3–7. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.08.005.
- [67] J.L. Cole, J.W. Lary, T. P. Moody, T.M. Laue, Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium, *Methods Cell Biol.* 84 (2008) 143–179. doi:10.1016/S0091-679X(07)84006-4.

APÊNDICE

A - Cálculo da concentração de nanopartículas de ouro referenciada no trabalho de Liu et al. [66].

O número médio de átomos de ouro por nanopartícula (N) (em mols) foi estimado considerando que elas são esféricas com estruturas cristalinas fcc, e com densidade de $19,3 \text{ g/cm}^3$, peso atômico (M) de 197 g/mol e com o diâmetro médio (D_M) obtido por MET através da equação 1.

$$N = \frac{\pi \rho (D_M)^2}{6 M} \quad (1)$$

E a concentração molar de nanopartículas de ouro (C_{AuNPs}) pode ser determinada pela equação 2.

$$C_{AuNPs} = \frac{N_T}{(N \cdot V \cdot N_A)} \quad (2)$$

sendo N_T a concentração total de ouro, N determinado pela eq. 1, V o volume da amostra, e N_A o número de Avogadro.

B – Processo de aquisição dos espectros de infravermelho pelo método ATR.

Gotejou-se 10 μL da amostra líquida após ser centrifugada (sem diluir) sob o cristal do espectrofotômetro e a banda de vibração de estiramento O-H localizada em 3300 cm^{-1} foi monitorada durante 27 min. Após sucessivas medidas obteve-se um espectro constante sem a presença dessa banda indicando que a amostra foi seca sobre o cristal de ATR. A Fig. B1 apresenta os espectros em três momentos de aquisição.

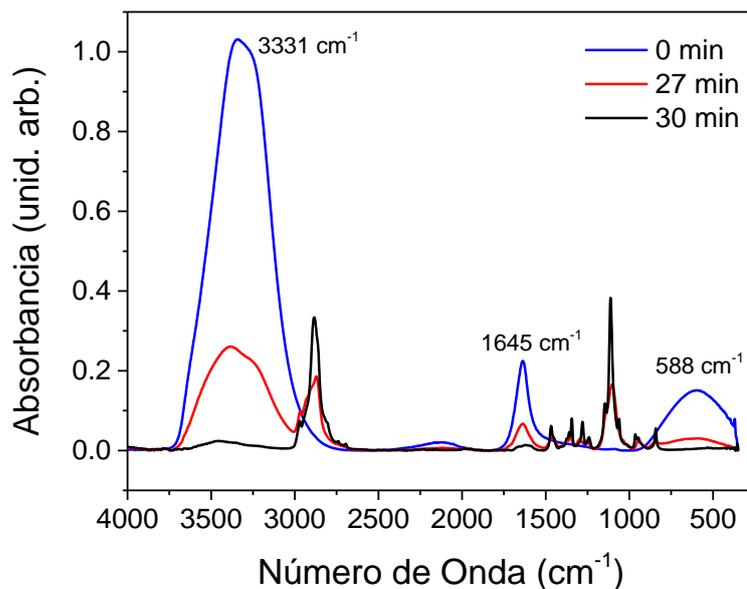


Fig. B1. Espectros sucessivos do nanocompósito AuNp-PLU:3F após gotejar amostra sobre o cristal do equipamento ($t=0$), após 27 min e 30 min quando as bandas associadas as vibrações OH (estiramento simétrico e assimétrico em 3331 cm^{-1} , dobramentos em 1645 cm^{-1} e 588 cm^{-1}) não são significativas.

C – Viscosidade absoluta

Para o cálculo de viscosidade absoluta mediu-se o tempo de escoamento da água (líquido padrão) e das soluções de F127 utilizando um viscosímetro de Ostwald a 25 °C . A massa de 1 mL de cada solução foi aferida para determinação da densidade. Todas as medidas foram realizadas em quadruplicada. Com os dados encontrados determinou-se a viscosidade absoluta η_{abs} , em unidades cP, por:

$$\eta_{abs} = \frac{\eta_a(t_L \rho_L)}{t_a \rho_a} \quad \text{C1}$$

em que η_a é a viscosidade da água a 25 °C ($0,8904\text{ cP}$), t_L é o tempo de escoamento do líquido (soluções de PLU), ρ_L a densidade do líquido, t_a o tempo de escoamento da água e ρ_a a viscosidade da água.

Os resultados obtidos pela Eq. C1 estão apresentados na Fig. C2.

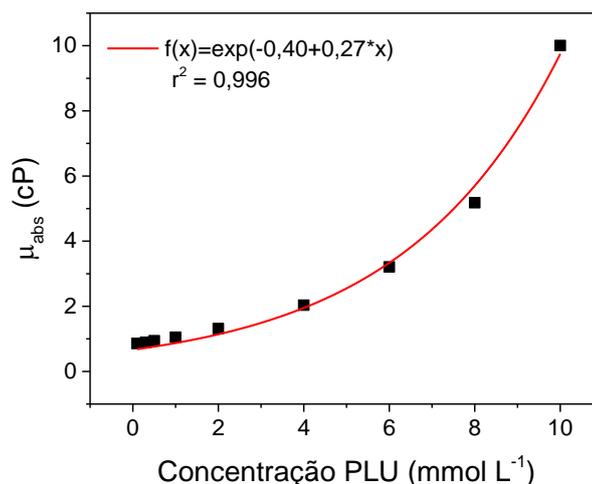


Fig. C2. Viscosidade absoluta das soluções de PLU em função da concentração do copolímero a 25 °C (pontos pretos). Ajuste dos pontos pela função exponencial indicada (linha vermelha).

D – Cálculo do tempo de reação

Considerando que a função utilizada no ajuste é do tipo:

$$Y(t) = a_1 - a_2 e^{-K_{ap} t_E} \quad \text{D1}$$

em que a_1 e b_1 são constantes, K_{obs} representa a constante de taxa observada e t o tempo estimado. Assumindo o valor de $a_1 = a_2 = a$

$$Y(t) = a(1 - e^{-K_{ap} t_E}) \quad \text{D2}$$

Para que a dinâmica do sistema seja igual 99,3%, teremos que:

$$e^{-K_{ap} t_E} \approx 0,007 \quad \text{D3}$$

logo o tempo de reação pode ser estimado por:

$$t_E = \frac{5}{K_{ap}} \quad \text{D4}$$

E- TEMPERATURA DURANTE A SÍNTESE FOTOEXCITADA

A temperatura da síntese fotoexcitada foi monitorada com um termômetro durante 50 min de exposição à radiação UV da mistura reacional contendo 2 mmol L⁻¹ de PLU e de H₂AuCl₄. A reação do nanocompósito AuNP-PLU:5F formado por esta mistura ocorre em 10 min de fotoexcitação. A temperatura ambiente neste experimento foi de 21 °C.

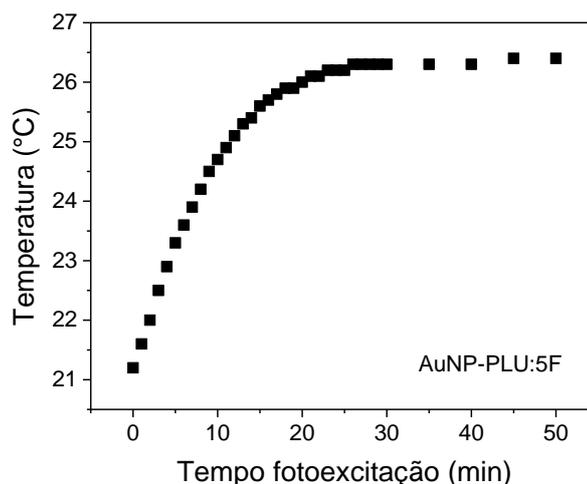


Figura F1. Temperatura em função do tempo de síntese para o nanocompósito AuNP-PLU:5F.

F- TERMODINÂMICA DE FORMAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS CONTROLE: AUNP-PLU:5A

Como descrito na seção experimental 3.4 os espectros de UV-vis foram adquiridos com adição de 300 μL de HAuCl_4 divididos em 20 incrementos de 15 μL . Estes resultados estão apresentados na Fig. F1. Comprovou-se a condição de equilíbrio entre cada adição de íons de ouro com os valores de $\text{Abs}_{\text{Máx}}$ coletados dos espectros adquiridos após 4 min e 8 min de cada incremento. O nanocompósito possui as mesmas características daquele com a adição total de 300 μL de HAuCl_4 . O λ_{Max} encontrado foi de 537nm com adição em incrementos, e 540 nm com adição volume total de 300 μL de HAuCl_4 .

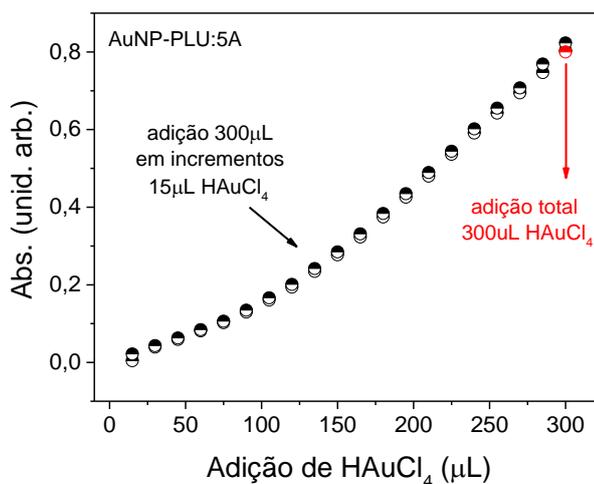
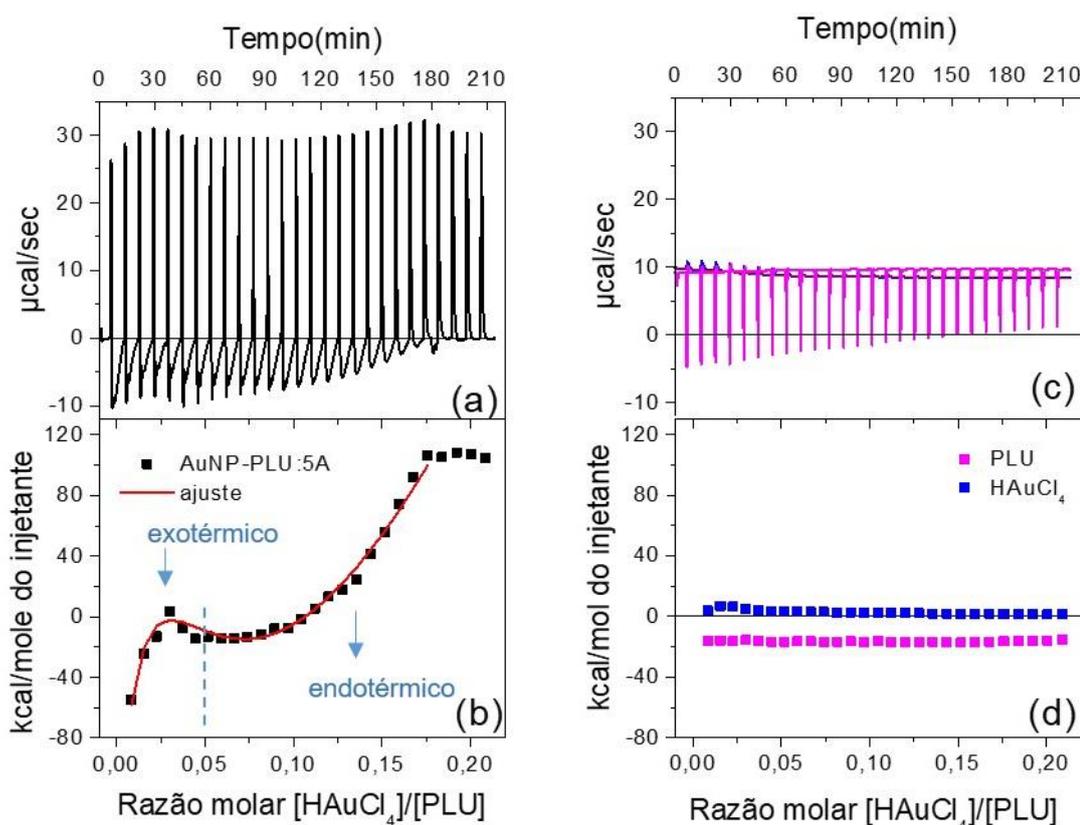


Figura F1. Absorbância máxima em função da adição de incrementos de 15 μL de HAuCl_4 . A absorbância máxima foi coletada após 4 min e 8 min da adição dos incrementos. Ponto vermelho corresponde ao nanocompósito com que teve a adição total dos 300 μL de HAuCl_4 .

Os parâmetros termodinâmicos de formação do nanocompósito controle (AuNP-PLU:5A) foi obtido por medidas de ITC (calorimetria de titulação isotérmica) conforme descrito na seção 3.4. Os resultados encontrados estão apresentados na Fig. F2.

Para cada adição de H_{AuCl}₄ na solução de PLU observou-se um fluxo de calor associado a interação dos íons de ouro com o PLU e também da interação do íons de ouro com a água (calor de diluição). Da mesma forma, o PLU contribuirá com um fluxo de calor referente a sua interação com a água contida na solução do titulante (solução de H_{AuCl}₄). Por isso, o calor de diluição foi calculado medidante aos experimentos de ITC independentes com a titulação de PLU e H_{AuCl}₄ em água (Fig. F2 c-d). Esse calor foi descontado do experimento principal (Fig. F2 a-b) para que somente a contribuição da interação dos ions de ouro com o PLU fosse significativo.



(e)

Parâmetros Termodinâmicos

Sítios ligantes	Entalpia de ligação ΔH (kcal/mol)	Constante de ligação K (x10 ⁴ M ⁻¹)	Entropia, TΔS (kcal/mol)	Energia livre de Gibbs ΔG (kcal/mol)
1	-101.4 ± 17.0	1.8 ± 0.5	-95.5 ± 17.1	-5.8
2	1318.5 ± 383.9	7.6 ± 3.6	1325.3 ± 385.8	-6.8

3	-12980.0 ± 113.1	4.2 ± 2.1	-12969.5 ± 126.5	-10.5
4	53025.0 ± 1888.0	3.4 ± 0.1	52921.6 ± 1897.4	103.4

Figura F2. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da formação do nanocompósito AuNP-PLU:5A. (a) Fluxo de calor em função do tempo durante cada injeção de íons de ouro (HAuCl_4 a 2 mmol L^{-1}) na solução de PLU (2 mmol L^{-1}). (b) calor envolvido em função da razão molar $[\text{HAuCl}_4]/[\text{PLU}]$ para cada injeção (pico) apresentado em (a). (c) fluxo de calor durante a titulação de HAuCl_4 em água (linha azul) e de PLU em água (linha pink). (d) calor de diluição do HAuCl_4 e do PLU em função da razão molar $[\text{HAuCl}_4]/[\text{PLU}]$. Os dados (a-b) foram subtraídos do experimento (c-d). (e) tabela com os parâmetros termodinâmicos extraídos do ajuste realizado em (b).

Apesar da complexidade do processo de formação dos nanocomplexos há pelo menos dois estágios bem definidos que estão identificados na isoterma da Fig. F2(b). Um estágio inicial consistentemente exotérmico dirigido entalpicamente quando as razões molares $< 0,05$ associado aos sítios de ligação 3 e 4 (principalmente ao sítio 3 pelo valor da energia livre de Gibbs) atribuído a coordenação dos íons de ouro com os oxigênios da cadeia do PLU.

Outro estágio é verificado para razões molares entre 0,05 e 0,12 (Fig. F2(b)). Um forte processo endotérmico é observado e aparenta estar associado ao crescimento dos núcleos de Au_0 e sua auto-agregação. Neste segundo estágio há contribuição dos sítios 1 e 2. Isso indica que a complexação do ouro metálico com a cadeia do polímero é uma interação hidrofóbica clássica diminuindo os graus de liberdade do polímero, mas aumentando a entropia total do sistema como consequência da exclusão de moléculas de água no ambiente superficial das regiões hidrofóbicas do polímero durante a interação.

Resumindo, a complexação dos íons de ouro com a cadeia do PLU é um processo entalpicamente dirigido e exotérmico. E a formação do nanocomplexo é dirigido entropicamente e endotérmico.

G- Espectros de absorção no Uv-vis utilizados na ultracentrifugação analítica (SV-AUC)

Os comprimentos de onda escolhidos para monitoramento dos perfis de sedimentação dos nanocompósitos com a aplicação de um alto campo centrífugo

ocorreu mediante o espectro apresentado na Fig. G1. O PLU responde com uma leve banda a 260 nm e as AuNPs em 530 nm para o nanocompósito AuNP-PLU:5A.

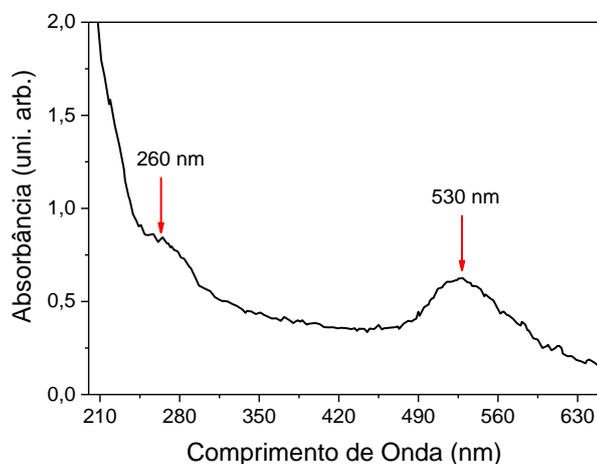


Figura G1. Espectro de absorção no UV-vis para o nanocompósito AuNP-PLU:5A. As indicações referem-se aos comprimentos de onda de absorção do PLU, em 260 nm, e das AuNPs em 530 nm.

G- Equação de Lamm

A evolução temporal da distribuição de concentração radial de partículas durante a aplicação de um campo centrífugo é dado pela equação de *Lamm* [55,67],

$$\frac{\partial c(r, t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(rD \frac{\partial c(r, t)}{\partial r} - s\omega^2 r^2 c(r, t) \right)$$

em que, $c(r, t)$ é distribuição de concentração radial (r) das partículas em intervalos de tempo (t) durante o curso do experimento com uma dada velocidade angular do rotor ω ; D e s são coeficientes de difusão e sedimentação das partículas, respectivamente. Não há soluções exatas para a equação de Lamm e soluções aproximadas e numéricas formam a base de muitos programas de análise de SV-AUC usados para extrair os dados de s e D .

ANEXO: ARTIGO PUBLICADO
