Rashida Parveen

Síntese de nanopartículas de ouro com forma e tamanho controlados utilizando glicerol como um agente de redução e estabilização ecológico e de baixo custo

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção de título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica-Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Germano Tremiliosi Filho

São Carlos, Maio de 2017

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

Assinatura:
Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Parveen, Rashida
Síntese de nanopartículas de ouro com forma e tamanho controlados utilizando glicerol como um agente de redução e estabilização ecológico e de baixo custo. / Rashida Parveen. — São Carlos, 2017.
137 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2017.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Germano Tremiliosi Filho

1. Nanopartículas. I. Título.

Referências Bibliográficas conferidas pelo SBI/IQSC

Dedicated to

My Lovely Son Aahil – *for the sunshine he brings in my life*

My Dear Husband Sajjad – *for his loyal companionship and support*

My Dear Parents – *for their limitless love and favours to me*

Acknowledgement

First of all, I would like to deeply thank each and every member of my family, specially my husband Dr. Sajjad Ullah and brother Major Ishaq Sher, for being so kind, loving, understanding and supportive and for always beliveing in my personal capacities and encourgaing me to achive my ambition of pursing academic excellance. I am enromously thankful to the presence of my newborn Aahil Sajjad, for being one big reason behind all my efforts towards achieving academic and professional excellance and become a complete parent and for completing what I call a happy family.

I would like to offer my deepest grattitude to Professor Germano Tremiliosi Filho, for accepting me in his group and supervising my PhD thesis and for generously and patiently sharing with me his excellant undesratnding of the subject matter and guiding me all the way long during this unforgetable four years long journey leading to the completion of this thesis.

I am also so thankful to my colleagues and friends of the Electrochemistry Group at IQSC, including Luiza, Mauro, Jhonas, Adriana, Rafael, Elnice, Wanderson, Thairo, Drielly, Anielli, Nyccolas, Amanda, Janaina, Nickson, Amaury, Bott, Pedro and all others for warmly welcoming me to the group, treating me gently, sharing with me all the happy and sad moments and assisting me in times when it was needed. All this allowed me to become a better person and part of a wider society than before, developing lots of love and respect for different cultural values and people with different thoughts and ideas. I would also like to thank Professores Ubirajara Pereira Rodrigues Filho and Dr. Janaina Fernandes Gomes for the friendship and assistance and sharing of wise ideas. I also humbly thank all other Professors at the Institute of Chemistry of São Carlos for contributing to my formation as an indepedent researcher and chemist. Thanks are also due to all the technicians of IQSC including Mauro, Jhonas, Valdecir, Gabriel, Thiago, Guto, Marcio de Paula, Paulo, Aldimar and André as well as the IQSC-Libraray staff for timely support, patience and assistance whenever needed.

And Finally, I would like to show my deep gratitude to the funding agencies (CNPq, FAPESP, CAPES and TWAS (*The World Academy of Science*)) for financial support and letting me successfully fulfill my dreams.

Resumo

As nanopartículas de ouro (AuNPs), com formatos e distribuição de tamanhos definidos, têm atraído grande atenção devido às suas propriedades óticas e catalíticas únicas, que dependem da forma e tamanho de AuNPs e que são importantes para diversos aplicações. O desenvolvimento de métodos simples e ecologicamente seguros para a síntese de AuNPs de tamanho e forma controlados, empregando reagentes de baixo custo e de fácil manuseamento é, portanto, de grande importância. Considerando isto, realizou-se um estudo sistemático para preparar nanoparticlas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) com um controle de forma e tamanho, empregando exclusivamente glicerol como um agente redutor flexivel, *eco-friendly* e de baixo custo. Na primeira etapa, descrevemos um novo método *one-pot* para a preparação de *nanorods* ou nanobastões de ouro (AuNRs) monocristalinos com quase 100% de rendimento empregando o glicerol em meio alcalino como agente redutor e brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) como agente controlador da forma de particulas. Podemos conseguir um controle das razões de aspecto (a*spect ratio* do inglês, AR = 2 a 6), rendimento de AuNRs (27–99%) bem como da posição de banda de absorção óticas de AuNRs (de 620 a 1200 nm) simplesmente variando as condições experimentais, principalmente o pH do meio reacional (12–13,5) e a concentração do $AgNO_3$. Descobriu-se que a formação de AuNRs é mais rápida a pH mais alto (> 11) e a maior temperatura (> 30 ° C), mas com o rendimento de AuNRs menor (< 70 %). A análise por HRTEM mostrou que os AuNRs crescem na direcção [001] e têm uma estrutura do tipo fcc monocristalina, isenta de falhas estruturais ou deslocamentos. Na segunda etapa, realizamos com sucesso, pela primeira vez, a formação de nanoparticulas esféricas de ouro (AuNPs), quase monodispersas de cerca de 8 nm, utilizando o glicerol bruto conhecido localmente como Glicerina Loíra (*crude glycerol* (CG) do inglê), tal como recebida, da planta de biodiesel. Não foi realizado nenhum tratamento prévio químico ou físico específico do CG, exceto filtração simples. Utilizaram-se duas amostras diferentes de CG com diferentes teores de glicerol (65% e 73%) e diferentes níveis de impurezas (baixo e alto) e tipos (orgânicos e inorgânicos) para preparar AuNPs, a fim de estudar o efeito de possíveis impurezas na formato e distribuição de tamanho de AuNPs. Para comparação, foram também preparadas AuNPs utilizando glicerol comercial puro (99,5%) em condições experimentais idênticas. Foram obtidos AuNPs com tamanho e formato semelhantes em ambos os casos (glicerol puro comercial e CG) indicando que o glicerol comercial pode ser substituído por CG na síntese de AuNPs e as impurezas

orgânicas e inorgânicas não afetam significativamente a distribuição de tamanho de AuNPs preparadas . Este estudo abre novas possibilidades para a preparação *eco-friendly* de nanopartículas metálicas utilizando o CG como um agente redutor de baixo custo, não tóxico e biodegradável. Na terceira etapa, desenvolvemos um método *one-pot* de síntese de AuNPs do tipo *Ligand-free* (sem uso de agente estabilizante) empregando o glicerol tanto como agente redutor quanto com agente estabilizador. A ideia era evitar o uso de um agente estabilizante externo que muitas vezes diminui a atividade catalítica ou afeta adversamente a biocompatibilidade dos sistemas surfactante/AuNPs. Obtiveram-se AuNPs coloidais estáveis com uma distribuição de tamanho razoavelmente estreita (8±3 nm) por este método e verificou-se que a estabilidade e a distribuição de tamanho das partículas dependiam da razão água/glicerol, temperatura e pH do meio reacional. Tais *ligand-free* AuNPs preparadas utilizando glicerol podem ser utilizadas nas aplicações catáliticas e biomédicas.

Abstract

Gold nanoparticles (AuNPs) especially with a control of size and shape have attracted great attention due to their shape-dependent optical properties that are important for many applications. The development of simpler and greener methods for the synthesis of size- and shape-controlled AuNPs employing low-cost and easily handled reagents is thus of great importance. Thus we have carried out a systematic study to prepare shape- and size-controlled AuNPs and AgNPs employing exclusively glycerol as an eco-friendly, low cost and pH-tunable reducing agent. *Firstly*, we report a new one-pot seedless method for the preparation of single-crystalline *AuNRs* in almost 100% yield based on the use of glycerol in alkaline medium as the reducing agent and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) as the shape-controlling agent. We could achieve a control of the aspect ratio (AR= 2 to 6), AuNRs yield (27–99%) as well the LSPR band of the AuNRs (620 to 1200 nm) by simply varying the experimental conditions, principally the pH of the reaction media (varied between 12–13.5) and the concentration of the $AgNO_3$. We found that the formation of AuNRs is faster at higher pH (>11) and higher temperature (>30°C) but the AuNRs yield is smaller (< 70%). HRTEM analysis showed that the AuNRs grow in [001] direction and have a perfect single crystalline fcc structure, free from structural faults or dislocations. *Secondly*, we successfully carried out the formation of nearly monodisperse spherical AuNPs of around 8 nm using the as-received *crude glycerol* (CG) from the biodiesel plant for the first time. No special chemical or physical treatment of CG except simple filtration was carried out. Two different crude glycerol samples with different glycerol contents (65% and 73%) and different impurity levels (low and high) and types (organic and inorganic) were employed to prepare AuNPs so as to study the effect of possible impurities on the shape and size distribution of AuNPs. For comparison, AuNPs were also prepared using pure commercial (99.5 %) glycerol under identical experimental conditions. AuNPs with similar size and shape were obtained in both cases (commercial pure glycerol as well as CG) indicating that commercial glycerol can be replaced with CG in the AuNPs synthesis and the organic and inorganic impurities do not significantly affect the particle size distribution of prepared AuNPs. This study opens up new possibilities for the environment-friendly preparation of metallic nanoparticles using the low-cost, non-toxic and biodegradable CG as

a reducing agent. *Thirdly*, we developed a *ligand-free one-pot synthesis method of AuNPs* employing the eco-friendly glycerol both as reducing agent and stabilizing agent. The idea was to avoid the use of an external stabilizing agent which often hinder the catalytic activity and adversely affect the biocompatibility of the surfactant/AuNP systems. Stable AuNPs with reasonably good size distribution (8±3 nm) were obtained by this method and the stability and size distribution of the particles was found to be dependent on the water/glycerol ratio, temperature and pH of the reaction media. Such surfactant-free biocompatible AuNPs prepared using the eco-friendly glycerol may find useful applications in catalysis and biomedical applications.

Lista de Figuras

Figura 1- A taça de Lycurgus do quarto século A.D, em exposição no British Museum vista na luz refletida (direita) e na luz transmitida (esquerda) 2

Figura 2 - Dependência da atividade catalítica de eletroredução de CO_2 a CO com o tamanho das AuNPs na faixa de tamanhos de 1 a 8 nm. 3

Figura 3 - Percentagem de átomos de superfície em função do diâmetro ($d_{cluster}$) do cluster de átomos de paládio. 4

Figura 4 - Dependência da concentração relativa dos diferentes tipos de átomos de superfície com o tamanho de uma nanopartícula de prata (AgNP). 5

Figura 5 - Imagens de MEV de (a) octaedros (b) nanocubos e (c) dodecaedros rômbicos de ouros e (d) comparação da atividade catalítica de redução de 4-nitroanilina na presença das três formas diferentes de particulas de ouro monitorada pela queda da banda de absorção da 4-nitroanilina em 380 nm 6

Figura 6 - Representação esquemática de um plasmon localizado de superfície mostrando a origem da ressonância plasmonica de superfície devido à interação coerente dos elétrons na banda de condução com radiação eletromagnética incidente. 8

Figura 7 - Espectros de absorção eletrônica de suspensões de AuNPs e AuNRs destacando as bandas de absorção atribuídas ao plasmon de superfície transversal (LSP_T)(do inglês transverse surface plasmon) e ao plasmon de superfície longitudinal (LSP_L) (do inglês longitudinal surface plasmon), respectivamente. 9

Figura 8 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis de suspensões aquosas de AuNPs com diâmetros de 9, 22, 48, e 99 nm , apresentando suas λ_{max} em 517, 521, 533 e 575 nm, respectivamente, evidenciando o efeito do tamanho de partícula sobre a banda SPR. 10

Figura 9 - Propriedades óticas ajustáveis de AuNRs por alterações de AR. Os AuNRs com diferentes ARs exibem dimensões diferentes como evidenciado por micrografias de MET (acima), assim como diferentes comprimentos de onda da banda LSP_L. 11

Figura 10 - Estrutura cristalográfica de AuNR mostrando diferentes faces do cristal. A direção ([100]) de crescimento é mostrada com uma seta. 12

Figura 11 - Procedimento de síntese (acima) e mecanismo de formação (abaixo) de AuNPs pelo método clássico de síntese com citrato deduzido a partir de medidas de SAXS e XANES por Polte et al. (68) 13

Figura 12 - Crescimento de AuNRs de duas etapas mediadas por sementes 14

Figura 13 - Ilustração esquemática de parâmetros controlados por ligantes que são importantes na determinação de propriedades físicas de nanopartículas ou conjuntos de nanopartículas 16

Figura 14 - Estrutura química de surfactantes/polímeros utilizados para estabilização colloidal de partículas (controle de tamanho e forma). 17

Figura 15 - O mecanismo de "Zipping" que mostra a formação da bicamada de CTAB sobre AuNRs, o que favorece a redução de ions Au^{3+} preferencialmente nas extremidades livres de CTAB levando ao crescimento longitudinal de AuNRs 19

Figura 16 - O mecanismo de "*zipping*" na presença de $AgNO_3$ mostrando a formação da bicamada de CTAB sobre os AuNRs e a ligação de íons brometo do CTAB com íons Ag^+. Esta ligação diminui as repulsões entre os grupos de cabeça vizinhos ao longo das faces laterais {110} e os pares Ag-Br atuam como um estabilizador para inibir o crescimento nestas, servindo, portanto, como um molde de crescimento anisotrópico para redução adicional do precursor de Au na direção de crescimento [111]..... 20

Figura 17 - Representação esquemática do modo de ligação de PVP na superfície de AuNPs 20

Figura 18 - Reação de transesterificação em que as gorduras e óleos (triglicéridos) reagem com um álcool tal como metanol, na presença de um catalisador (ácidos (HCl, H_2SO_4), bases (NaOH, KOH, CaO, MgO), ácidos sólidos (óxido de zircónio ou óxido de titânio) ou enzimas (lipozima, novozima)) para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerol como subproduto 23

Figura 19 - Esquema geral para peparação de AuNRs utilizando glicerol como agente redutor e CTAB como agente de controle-de-forma. A letra M significa concentração em mol L^{-1}. 28

Figura 20 - Esquema geral para a preparação das AuNPS utilizando CG como agente redutor e PVP ou PDAC como agentes estabilizantes. A letra M significa concentração em mol L^{-1}. 30

Figura 21 - Espectro UV-Visível de glicerol puro (curva preta), CG-73 (curva vermelha) CG-65 (curva azul) 36

Figura 22 - Espectro de UV–Vis–NIR da amostra NR-1 preparada a temperatura ambiente (25 °C) usando glicerol (0.1 mol L^{-1}) em NaOH 0.01 mol L^{-1} (ver Tabela 1) 40

Figura 23 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) da amostra NR-1 preparada a temperatura ambiente (25 °C) usando glicerol 0.1 mol L^{-1} em NaOH 0.001 mol L^{-1}. 40

Figura 24 - Mecanismo de formação de íons alcóxidos por grupos alcólicos ou carbonilas e a redução dos ions metálicos em NPs metálicas. 41

Figura 25 – Imagem de MET de campo claro da amostra NR-2 preparada a 30 °C (a), imagem de FEG-SEM da amostra NR-3 preparada a 50 °C (b) e imagem de MET de campo escuro da amostra NR-5 preparada a 60 °C. 42

Figura 26 - Histogramas da distribuição do tamanho de particulas, comprimento e largura para diferentes amostras de AuNRs..... 43

Figura 27 - Espectro de Absorção Eletrônica de diferentes amostras de AuNRs. 45

Figura 28 – Imagens de MET da amostra NR-4 (a) e imagem de MET apenas de partículas esféricas decaédricas da mesma amostra (b) preparada utilizando 0,3 mL de $AgNO_3$ 0,004 mol L^{-1}. O resto das condições experimentais foram semelhantes às da NR-3 (ver Tabela 1). 46

Figura 29 - Imagens de MET de campo escuro da amostra NR-6 preparada na ausência de $AgNO_3$ (a) e 0,1 mL (b) 0,25 mL (c) e 0,35 mL (d) de $AgNO_3$. A concentração de $AgNO_3$ foi de 0,004 mol L^{-1} em cada caso. 47

Figura 30 - Mudança de rendimento percentual (%) (a) e espectros Vis-NIR (b) de amostras preparadas variando os volumes (mL) de $AgNO_3$ 0,004 mol L^{-1} na amostra NR-6. 48

Figura 31 – Espectro UV-Vis-NIR da AuNRs preparada usando 0,1 mol L^{-1} de glycerol em solução de NaOH 0,005 mol L^{-1}. A presença da banda LSP indica a formação de AuNRs 49

Figura 32 – Imagens de MET de campo escuro das amostras NR-6 (a), NR-7 (b) e NR-8 (c) preparadas com glicerol 0,1 mol L^{-1} e diferente pHs; a solução de glicerol utilizada na síntese das amostras NR-6, NR-7 e NR-8 foi preparada em 0,1, 0,2 e 0,3 mol L^{-1} de NaOH, respectivamente. Todas as outras condições são semelhantes para as três amostras. 50

Figura 33 - Espectros Vis-NIR das amostras NR-6, NR-7 e NR-8, que diferem na quantidade de NaOH utilizada na preparação da solução de glicerol 0,1 mol L^{-1}. Todas as outras condições são as mesmas para as três amostras. O crescimento de AuNRs começa dentro de 1h sob estas condições experimentais. 51

Figura 34 – Imagem de HRTEM (a) e padrão de difração de eletrons da amostra NR1 registrada com o eixo da zona paralela à direção [103] (b); HRTEM obtidas após inclinação da amostra (c, d). A direção de crescimento [001] é marcada em (a). A direção {111} de planos situa-se a cerca de 45° em relação à direção de crescimento 53

Figura 35 - Representação esquemática das várias fases da formação de AuNRs utilizando glicerol em meio alcalino como agente redutor. 54

Figura 36 - Cromatograma de HPLC da amostra de CG-73 mostrando o pico de eluição de glicerol em 16,1 min. 58

Figura 37 - Cromatograma gasoso da amostra CG-65. Os compostos responsáveis por estes picos, tal como identificados a partir de espectrogramas de massa (Figura 38) foram indicados no lado direito da Figura. 59

Figura 38 - Espectros de massas dos componentes separados na amostra CG-65. As estruturas químicas dos compostos correspondentes, como identificadas por MS, também são mostradas na Figura. 60

Figura 39 - Espectros de ^{13}C-NMR de glicerol comercial (acima) e CG-73 após filtração simples através de um filtro de 0,2 μm (abaixo). 61

Figura 40 - (a) Espectro FTIR da amostra CG-73 em comparação com glicerol comercial (99,5%) e (b) o mesmo espectro em unidades de absorbância ampliado na região de 1500–1800 cm^{-1} , com o intuito de mostrar os detalhes das bandas nesta região (*inset*). Vários modos vibracionas são indicados na Figura. 61

Figura 41 - Espectro de absorção eletrônico na região visível de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações iniciais de CG-73 a concentrações fixas de PVP (1%), NaOH (0,3 mol L^{-1}) e $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles). 64

Figura 42 - Distribuição de tamanho de partículas medida utilizando DLS de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações iniciais de glicerol a pH fixo (13,3±0,2) e concentração fixa de PVP (1%) e $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles). 65

Figura 43 - (a) Imagem de MEV de AuNPs preparadas utilizando 0,1 mol L^{-1} CG-73 e imagens de TEM de AuNPs preparadas utilizando (b) 0,2 mol L^{-1} e (c) 0,4 mol L^{-1} CG-73. O tamanho de partícula médio das AuNPs juntamente com o desvio padrão foi indicado acima de cada imagem....66

Figura 44 - Imagem de TEM representativa de alta resolução (HRTEM) de AuNPs preparada utilizando CG-73 66

Figura 45 - (a) Espectro eletrônico na região do UV-Visível e (b) distribuição de tamanho de partícula medida por TEM das AuNPs preparadas utilizando CG-65. Condições de síntese 3,75 x 10^{-3} mmols de $HAuCl_4$, 1% de PVP e pH 13,2. 67

Figura 46 - Imagens de MET de AuNPs estabilizadas com PVP preparadas utilizando (a) glicerol comercial (99,5%, Panreac) (b) CG-73 e (c) CG-65 em condições experimentais idênticas. Condições: 3,75 x 10^{-3} mmoles de $HAuCl_4$, 0,4 M de glicerol, 1% de PVP e pH 13,2. O tamanho das AuNPs em cada caso é indicado na respectiva imagem TEM....68

Figura 47 - Difratogramas de XRD de AuNPs preparadas utilizando CG (linha sólida) comparado com o das AuNPs preparadas utilizando glicerol comercial puro (linha tracejada) como agente redutor. 68

Figura 48 - Espectro de absorção eletrônica na região do visível das AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações de PVP a pH fixo (13,3±0,2), concentração fixa de CG-73 (0,2 mol L^{-1}) e e concentração de fixa $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles). 70

Figura 49 - Imagens de MET das AuNPs estabilizados com PVP preparadas utilizando diferentes concentrações de PVP a pH fixo (13,3 ± 0,2), concentração de CG-73 fixa (0,2 mol L^{-1}) e concentração fixa de $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmols). O tamanho médio de partículas obtido a partir de imagens de MET também é indicado em cada imagem correspondente. 71

Figura 50 – Distribuição de tamanho medida por DLS de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações de PVP a pH fixo (13,2), concentração de glicerol fixa (0,2 mol L^{-1}) e concentração fixa de $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3}). A sigla SD significa desvio padrão, que representa a largura da distribuição de tamanho de AuNPs....72

Figura 51 - (a) Espectros de absorção na região do visível de AuNPs estabilizadas com PVP e preparadas utilizando concentraçoes diferentes de NaOH a uma concentração fixa de PVP (1%), glicerol (0,2 mol L^{-1}) e $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles), (b) evolução temporal da banda SPRT em 520 nm em função do pH na presença de 1% de PVP e 0,2 mol L^{-1} de glicerol e (c) evolução temporal da banda de SPR_T em 520 nm em função do pH na presença de apenas 1% de PVP (sem glicerol) e (d) comparação da taxa de formação de AuNPs utilizando apenas PVP em meio alcalino (linha tracejada) e PVP mais glicerol em meio alcalino (linha contínua)....73

Figura 52 – Imagens de MET de AuNPs estabilizadas com PVP e obtidas utilizando diferentes concentrações molares de NaOH (0,1–0,4 mol L^{-1}) a uma concentração fixa de PVP (1%) e CG-73 (0,2 mol L^{-1})....75

Figura 53 - Diâmetro hidrodinâmico de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações de OH^- a um concentração fixa de PVP (1 %), glicerol (0,2 mol L^{-1}) e $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles). A sigla SD significa desvio padrão, que representa a largura da distribuição de tamanho das AuNPs...76

Figura 54 - Espectro de absorção eletrônica de AuNPs preparadas usando (a) diferentes concentrações de PDAC (0,03–1,3%) a uma concentração fixa de OH^- (0,3 mol L^{-1}) e (b) diferentes concentrações de OH^- (0,05–0,3 mol L^{-1}) a um concentração fixa de PDAC (1%). A curva inferior tracejada em *b* mostra os espectros de AuNPs preparados utilizando apenas PDAC em meio alcalino, sem a adição de glicerol.....77

Figura 55 - Imagens de MET de AuNPs estabilizadas com PDAC e preparadas em pH diferentes mantendo outros parâmetros constantes.....78

Figura 56 - Imagens de MET das AuNPs estabilizadas com diferentes concentrações de PDAC (0,03%–1,3%) mantendo outros parâmetros constantes.....79

Figura 57 - Distribuição do tamanho de partículas determinado pelo DLS de AuNPS estabilizadas com PDAC e obtidas utilizando diferentes concentrações de PDAC; todas as outras condições experimentais são as mesmas para cada amostra. 79

Figura 58 - (a) Alterações temporais na absorbância a 520 nm para AuNPs estabilizadas com PDAC preparadas utilizando diferentes concentrações de NaOH a uma concentração fixa de PDAC (1%) sem qualquer glicerol na mistura reaccional e (b) comparação de curvas de absorbância vs. tempo para as amostras de AuNPs com e sem glicerol na mistura reaccional a uma concentração fixa de PDAC (1%) e NaOH (0,2 mol L^{-1}). 80

Figura 59 - (a) Evolução temporal da banda de absorbância a 520 nm em função do pH na presença de PDAC (1%) e glicerol (0,2 mol L^{-1}) e (b) e espectros eletrônicos de absorção molecular coletados de 0 min até 60 min a 05 minutos de intervalo de AuNPs estabilizadas com PDAC (amostra (iii) na Figura 59a) e preparadas utilizando NaOH 0,1 mol L^{-1}, PDAC 1%, glicerol 0,2 mol L^{-1} e $HAuCl_4$ 3,75 x 10^{-3} mmols.....81

Figura 60 - Espectro UV-visível e imagens de MET (inset) de AgNPs preparadas utilizando glicerol bruto (CG) como agente redutor. Condições de síntese: 20 µL de $AgNO_3$ (0,005 mol L^{-1}), 1 ml de glicerol bruto (0,2 mol L^{-1} preparado em solução de NaOH 0,8 mol L^{-1}) e 1 ml de PVP (1%). 82

Figura 61 - Espectro UV-visível de AgNPs preparadas utilizando CG na presença de diferentes concentrações de NaOH em condições idênticas. Condições de síntese: 20 µL de $AgNO_3$ (0,005 mol L^{-1}), 1 mL de glicerol bruto (0,2 mol L^{-1} preparado em solução de NaOH de concentração variável) e 1 mL de PVP (1%).....82

Figura 62- Espectro de absorção na região visível de AuNPs preparadas utilizando glicerol puro como agente redutor e estabilizador em meio alcalino. Condições de síntese: 0,5 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 1 mL de glicerol; 0,02 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 1,5 mL.....87

Figura 63 - Micrografias de MET de AuNPs preparadas utilizando glicerol puro como agente redutor e estabilizador em meio alcalino. Os insertos a esquerda e a direita mostram a distribuição de tamanho de partícula e padrão de difração de elétrons de AuNPs, respectivament. Condições de

síntese: 0,5 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 1 mL de glicerol; 0,02 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 1,5 mL.....88

Figura 64 - Espectro de absorção na região visível (a) e a razão A_{650} /A_{530} (b) de amostras de AuNPs preparadas utilizando diferentes proporções iniciais de glicerol: água (v:v) sob condições idênticas. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); 2 mL de solução de glicerol com diferentes proporções de volume de glicerol: água (2:0, 1,5:0,5, 1:1, 0,5:1,5); Uma vez que o volume de reação total é de 3,04 mL, a concentração final de glicerol nestas soluções é de 65,7%, 49,3%, 32,8% e 16,4%, respectivamente.....89

Figura 65 - Micrografias de MET juntamente com os correspondentes histogramas de distribuição de tamanho de AuNPs preparadas utilizando diferentes proporções de glicerol:água, tal como identificadas nos histogramas, sob condições idênticas. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); 2 mL de solução de glicerol com diferentes proporções de volume de glicerol: água (2: 0, 1,5: 0,5 e 1: 1); Volume total ~ 3,04 mL.....90

Figura 66 - Diminuição da viscosidade do glicerol puro em função da temperatura (a) e aumento da viscosidade da solução aquosa de glicerol como função de teor de glicerol (%) 9b). O inserte em ***b*** é uma vista ampliada da faixa de temperatura de 0 a 55 °C (dados retirados Ref (142)).....92

Figura 67 - Espectro de absorção visível de AuNPs preparadas utilizando diferentes temperaturas, mantendo as outras condições idênticas. O inserte mostra a mudança de posição da banda SPR em função da temperatura. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 2 mL de glicerol; 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 3 mL 93

Figura 68 - Micrografia de MET da amostra preparada a 10 °C (diâmetro médio das partículas = 6 ± 1,5 nm).....93

Figura 69 - Espectro de absorção visível de AuNPs preparadas em pH diferente utilizando diferentes concentrações de NaOH (0,01–0,3 mol L^{-1}), mantendo as outras condições idênticas. Por razões de clareza, os três espectros de fundo foram ampliados e mostrados como gráficos inserte. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 2 mL de glicerol; 0,04 mL de NaOH (0,01–0,3 mol L^{-1}); volume total = 3,04 mL 94

Figura 70 - A razão A650/A530 para AuNPs preparadas em pH diferente utilizando diferentes concentrações de NaOH (0,05–0,3 mol L^{-1}). Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 2 mL de glicerol; 0,04 mL de NaOH; Volume total ~ 3 mL.....95

Figura 71 - Evolução temporal dos espectros de absorção UV-visível da mesma amostra de AuNPs adquiridas em vários intervalos de tempo após a sua síntese. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 2 mL de glicerol; 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 3 mL 96

Figura 72 - Espectro de absorção UV-visível da suspensão de AuNPs após aquecimento a diferentes temperaturas durante 30 minutos cada; Condições: 2 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 4 mL de glicerol; 0,08 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 6 mL.....98

Figura 73 - Estabilidade coloidal de AuNPs em função da temperatura. As amostras foram aquecidas durante 10 minutos a cada temperatura. 98

Figura 74 - Evolução temporal dos espectros de absorção UV-visível da suspensão de AuNPs na presença de diferentes quantidades de NaCl adicionadas as AuNPs coloidais; Condições: 2 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 4 mL de glicerol; 0,08 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 6 mL ..99

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros experimentais utilizados na síntese de AuNRs. A concentração de CTAB, $HAuCl_4$ e $AgNO_3$ foi de 0,2 mol L^{-1}, 0,001 mol L^{-1} e 0,004 mol L^{-1}, respectivamente. 29

Tabela 2 - Condições de síntese das AuNPs utilizando CG em meio alcalino; a quantidade de $HAuCl_4$ era de 3,75 x 10^{-3} mmoles e a temperatura era de 25 °C em todos os experimentos. Todas as concentrações nesta Tabela são as concentrações iniciais e o volume total da mistura reacional foi fixado em 12 mL em cada caso. 31

Tabela 3 - Condições de síntese das AuNPs utilizando glicerol em meio alcalino como agente redutor e estabilizador. Todas as concentrações nesta Tabela são concentrações iniciais e o volume total da mistura reacional foi fixado em 3,04 mL em cada caso. A concentração de $HAuCl_4$ foi constante (7,5 x10^{-4} mol L^{-1}, 1 mL) em todos os casos. 32

Tabela 4 - Propriedades óticas, ARs e % de rendimento das AuNRs 44

Tabela 5 - Resultados da caracterização das amostras de glicerol mostrando os parâmetros físicos e o nível de impurezas de amostras de CG em comparação com glicerol commercial 62

Lista de Abreviaturas

NPs:	Nanopartículas
AuNP:	Nanopartículas de ouro
AuNR:	Nanobastões de ouro
AgNP:	Nanopartículas de prata
AR:	Razão de aspecto (aspect ratio)
CG:	Glicerol bruto (Crude Glycerol)
CTAB:	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
PVP:	Polivinilpirrolidona
PDAC:	Cloreto de polidialildimetilamônio
LSPR:	Ressonância de plasmons de superfície localizada
SPR_T:	Ressonância de plasmons de superfície transversal
SPR_L:	Ressonância de plasmons de superfície longitudinal
GC-MS:	Cromatografia gasosa-Espectrometria de massa
PSD:	Distribuição de tamanho de partícula (Particle Size Distribution)
HPLC:	Cromatografia líquida de alta eficiência
FCC:	(estrutura) cúbica de face centrada
DLS:	Espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering)
MET:	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV:	Microscopia eletrônica de varredura
EDX:	Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia
DRX:	Difração de raios X
PW_{75}:	Largura máxima a 75% de altura do pico
Bulk:	Sólido estendido

Sumário

Dedication i

Acknowledgement iii

Resumo iv

Abstract vi

Lista de Figuras viii

Lista de Tabelas xiv

Lista de Abreviaturas xvi

Sumário xvii

Capítulo 1 1

1. Introdução 2

1.1. Introdução às Nanopartículas de Ouro e Histórico de uso e pesquisa em nanopartículas metálicas 2

1.2. Nanopartículas de Ouro: O papel de tamanho e a forma 3

1.3. Nanobastões de ouro (AuNRs) 7

1.3.1. Propriedades óticas de AuNPs e AuNRs 7

1.3.2. Estrutura cristalográfica de AuNRs 11

1.3.3. Métodos de preparação de AuNRs 12

1.4. Estabilização de nanopartículas: o papel dos estabilizadores de partículas no controle de forma e tamanho 16

1.5. Síntese e estabilização de NPs sem uso de ligantes estabilizadores 21

1.6. Preparação de AuNPs e AgNPs utilizando Glicerol como agente redutor 22

1.7. Objetivos do projeto 25

Capítulo 2 26

2. Parte Experimental 27

2.1. Reagentes químicos 27

2.2. Preparação de nanobastões de ouro (AuNRs) pelo método denominado "*one-pot*" utilizando glycerol de alta pureza como agente redutor 27

2.3. Preparação de AuNPs pelo método denominado "*one-pot*" utilizando glicerol bruto como agente redutor 30

2.4. Síntese de AuNPs livres de ligantes (Ligand-Free synthesis) e utilizando glicerol para atuar parcialmente como agente redutor e parcialmente como estabilizador 31

2.5. Técnicas de caracterização 32

2.5.1. Análise de espectroscopia UV/Visível (monitoramento da formação das NPs) 32

2.5.2. Análise de microscopia eletrônica (tamanho e morfologia das NPs) 32

2.5.3 Medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) (análise da distribuição de tamanho de partícula) 33
2.5.4. Análise por difração de raio X (DRX) (fase cristalina e tamanho de cristalito) 34
2.6. Análise do glicerol bruto (Crude Glycerol (CG)) 34
2.6.1. Análise por HPLC (determinação do teor de glicerol e nível de impurezas) 34
2.6.2. Cromatografia de troca iónica (análise de cátions) 34
2.6.3. Titulação Karl Fischer (determinação do teor de água) 35
2.6.4. Análise por RMN, FTIR e GC-MS (impurezas orgânicas) 35
2.6.5. Outras caracterizações 36
Capítulo 3 37
3. Preparação de nanobastões de ouro (AuNRs) utilizando o método glicerol de baixo custo e ambientalmente seguro 38
3.1. Formação de AuNRs utilizando glicerol 38
3.2. Efeito da temperatura 42
3.3. Efeito da concentração de $AgNO_3$ 45
3.4. Efeito da [OH] na solução de Glicerol 48
3.5. Estrutura Cristalográfica das AuNRs 51
3.5. Conclusões 55
Capítuo 4 56
4. Síntese de nanopartículas monodispersas de ouro (AuNPs) usando glicerol bruto (CG) como um agente redutor verde e de baixo custo 57
4.1. Caracterização de glicerol bruto (*crude glycerol* (CG)) 58
4.1.1. Análise por HPLC e GC-MS (teor de glicerol e impurezas orgânicas) 58
4.1.2. Análise de RMN e FTIR (impurezas orgânicas) 59
4.1.3. Outras caracterizações 63
Cromatografia de troca iónica (análise de cátions) 63
Titulação de Karl Fischer (determinação do teor de água) 63
Determinação da densidade, pH e cor 63
4.2. Preparação de nanoparticulas de Ouro (AuNPs) 63
4.2.1. Preparação de AuNPs utilizando CG e PVP 64
Efeito da concentração de glicerol e sua pureza 64
Efeito da concentração de PVP 69
Efeito da [OH-]ou pH 72
4.2.2. Preparação de AuNPs utilizando glicerol bruto (CG) e PDAC 76

4.3. Preparação de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando glicerol bruto 81
4.4. Conclusões 83
Capítulo 5 84
5. Síntese de AuNPs livres de ligantes (*Ligand-Free synthesis*) e utilizando glicerol atuando simultaneamente como agente redutor e estabilizador 85
5.1. Preparação de AuNPs utilizando glicerol puro como agente redutor e estabilizador 85
5.2. Efeito da razão glicerol: água 88
5.3. Efeito da Temperatura 91
5.4. Efeito da concentração de NaOH (pH) 94
5.5. Estabilidade coloidal de AuNPs 95
5.5.1. Estabilidade coloidal de AuNPs em função do tempo 96
5.5.2. Estabilidade coloidal em função do aquecimento pós-síntese 97
5.5.3. Estabilidade coloidal em função da concentração de sal 99
5.6. Conclusões: 100
Capítulo 6 101
6. Conclusões 101
7. Referência 105

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Introdução às Nanopartículas de Ouro e Histórico de uso e pesquisa em nanopartículas metálicas

Embora a aplicação moderna extensa de nanopartículas (NPs) metálicas em detecção e imagem (1–4), libertação controlada de fármacos (5–7) e tratamento de câncer (8–10) tenha-se iniciado apenas recentemente, nanoparticulas metálicas, especialmente nanopartículas de ouro (AuNPs), são utilizadas há séculos. Por exemplo, AuNPs e nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido utilizadas na fabricação de utensílios domésticos e outros itens como espelhos e vasos há mais de 2000 anos.

A taça de Lycurgus de 1600 anos de idade (Figura 1), proveniente dos tempos romanos, é um exemplo espetacular da nanotecnologia Romana (11). Este artefato apresenta impressionante dicroísmo vermelho-verde e foi empregado para finalidades decorativas naquele tempo por conta de suas cores múltiplas (11–13). A taça parece verde na luz refletida normal, mas apresenta coloração vermelha quando a luz é transmitida através dela (11,14). Esta propriedade única se deve a peça conter nanopartículas de Ag-Au de 1-100 nm de tamanho (13) com capacidade eficiente de espalhamento e absorção de luz, resultando em cores distintas e brilhantes, diferentes das apresentadas pelo material *bulk* correspondente. De fato, um dos aspectos mais interessantes das AuNPs é que a maioria de suas propriedades optoeletrônicas são dependentes do seu tamanho e da forma (15,16).

Figura 1- A taça de Lycurgus do quarto século A.D, em exposição no British Museum vista na luz refletida (direita) e na luz transmitida (esquerda)

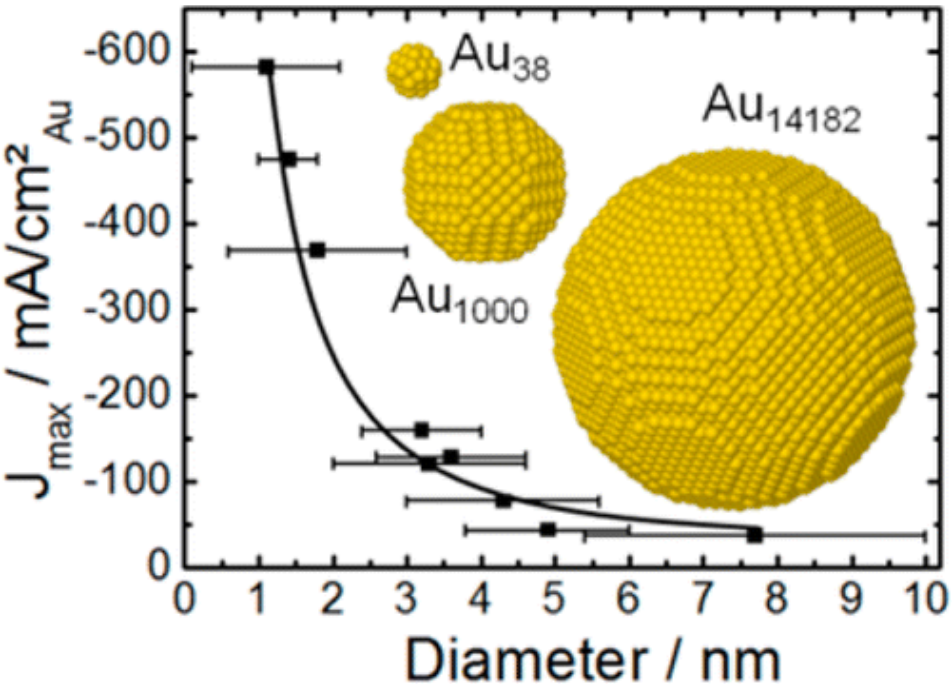
Fonte: (Kumar 2013, Ref (14))

1.2. Nanopartículas de Ouro: O papel de tamanho e a forma

As nanopartículas (NPs) são uma classe importante de materiais que unem os materiais *bulk* (sólido estendido) com as estruturas atômicas e moleculares (17). Estes materiais apresentam propriedades físico-químicas fascinantes e dependentes de forma e do tamanho, diferentes e muitas vezes superiores à sua forma *bulk*, encontrando, por conta disso, ampla aplicação em diversas áreas (1–10,18–22).

Os papéis do tamanho e da forma das NPs são muito importantes na determinação das propriedades e aplicações destas (16,21,23–26). Por exemplo, Mistry *et al.* estudaram a atividade catalítica em função do tamanho das AuNPs na faixa de 1-8 nm para a eletrorredução de CO_2 a CO e observaram um aumento na densidade de corrente e da atividade catalítica à medida que o tamanho das AuNPs diminui (16) (Figura 2). Com base em simulações realizadas utilizando a teoria funcional da densidade (DFT), eles sugeriram que tal comportamento das AuNPs está relacionado ao aumento do número de sitos de baixa coordenação em NPs menores.

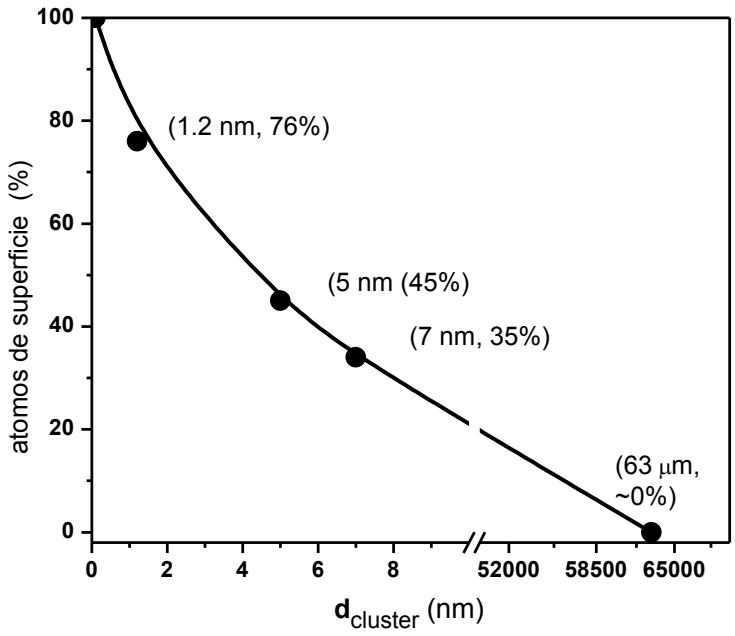
Figura 2 - Dependência da atividade catalítica de eletroredução de CO_2 a CO com o tamanho das AuNPs na faixa de tamanhos de 1 a 8 nm.



Fonte: (Mistry 2014) (16)

Geralmente, as NPs apresentam maior razão superfície/volume ou maior fração de átomos na superfície, em comparação com os materiais correspondentes na forma *bulk* (27,28). Por exemplo, a porcentagem de átomos de superfície (também conhecida como dispersão (29)) é tão alta quanto 76% para um cluster de Pd de 1,2 nm, 45% quando o tamanho do cluster é de cerca de 5 nm e próxima 0% quando o tamanho de partícula é 63 μm (*bulk* Pd)(Figura 3) (27). Devido a essa fração mais elevada de átomos na sua superfície ou perto dela, as NPs apresentam geralmente uma atividade catalítica superior em comparação com o seu correspondente na forma *bulk.*

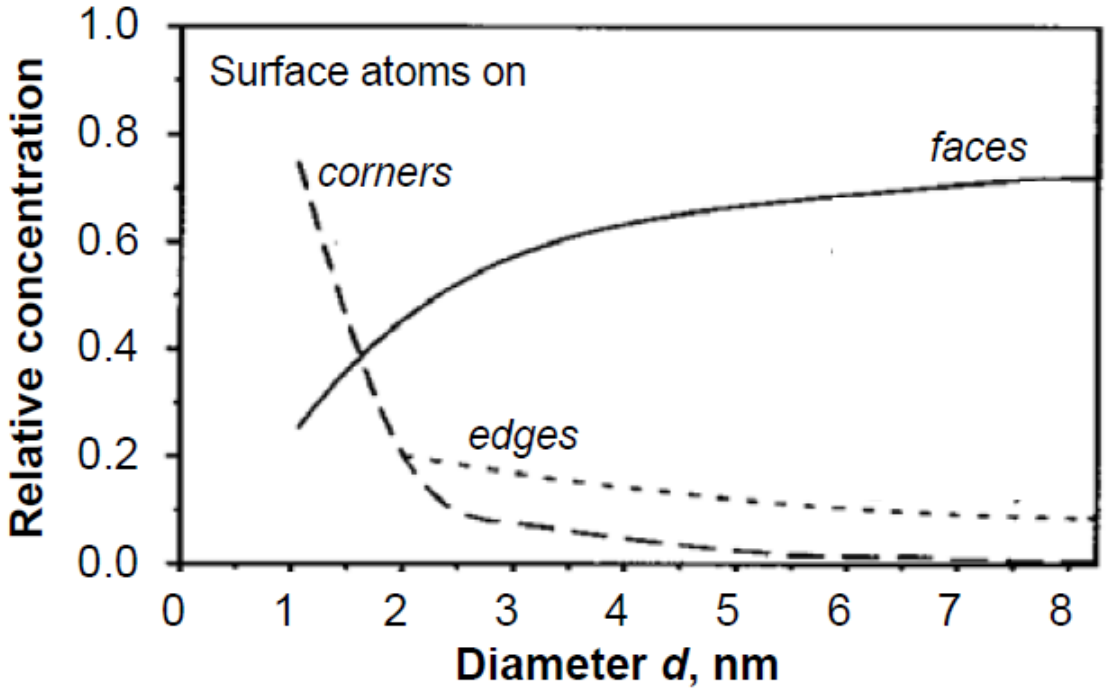
Figura 3 - Percentagem de átomos de superfície em função do diâmetro ($d_{cluster}$) do cluster de átomos de paládio.



Fonte: (Nützenadel 2000, Ref (27)*).*

Além disso, a concentração relativa de átomos localizados nos vértices, arestas e faces é altamente dependente do tamanho de particula (Figura 4)(29). Aparentemente, a fração de átomos de face aumenta com o aumento do tamanho de partícula, enquanto que a fração de átomos metálicos nas arestas e vértices (sítios mais expostos e de baixa coordenação) diminui (29).

Figura 4 - Dependência da concentração relativa dos diferentes tipos de átomos de superfície com o tamanho de uma nanopartícula de prata (AgNP).



Fonte: (Claus 1999, Ref (29)*)*

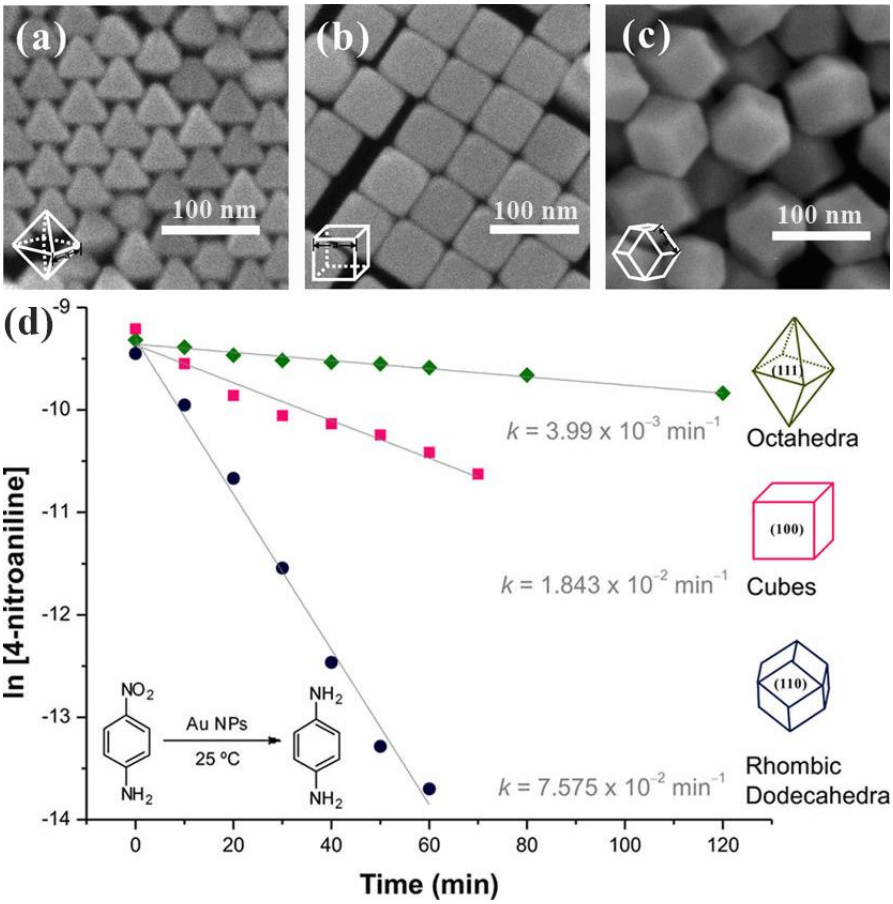
Neste contexto, nanopartículas esféricas de ouro (AuNPs) com tamanho controlado têm atraído grande atenção devido às suas dimensões ultrafinas e propriedades únicas dependentes de tamanho e sua baixa toxicidade (2,30). Estas propriedades únicas levaram à ampla aplicação de AuNPs em catálise (19,31–33), detecção (34), bioimagem (35,36), terapia fototérmica, liberação controlada de fármacos (8,10,37) e dispositivos plasmônicos. Assim, o controle da forma e do tamanho das NPs permite o controle racional de tais propriedades dependentes de tamanho e da forma.

As propriedades de AuNPs não são apenas dependentes de tamanho, sendo que a forma geométrica das partículas também desempenha um papel importante na determinação das propriedades e aplicações de AuNPs (23,26). Por exemplo, Chiu *et al.* estudou a atividade catalítica de nanocubos, octaedros e dodecaedros rómbicos de ouro para a reação de redução de 4-nitroanilina a p-fenilenodiamina em diferentes

temperaturas e verificou que os dodecaedros rómbicos apresentaram a melhor eficiência catalítica em todas as temperaturas empregadas (Figura 5)(26).

A ordem de atividade catalítica determinada seguia a ordem decrescente: dodecaedros rômbicos > nanocubos > octaedros ou, em termos de faces expostas, {110} > {100} > {111} (26). Eles ainda verificaram através de cálculos de DFT que a energia de ligação entre a p-nitroanilina e o plano (110) do Au era alta, razão pela qual os nanocristais de ouro com forma de dodecaedros rômbicos apresentaram alta atividade catalítica. (26).

Figura 5 - Imagens de MEV de (a) octaedros (b) nanocubos e (c) dodecaedros rômbicos de ouros e (d) comparação da atividade catalítica de redução de 4-nitroanilina na presença das três formas diferentes de particulas de ouro monitorada pela queda da banda de absorção da 4-nitroanilina em 380 nm



Fonte: ((Chiu 2012, Ref (26)*)*

1.3. Nanobastões de ouro (AuNRs)

Uma vez que as propriedades óticas das AuNPs dependem intimamente da forma e tamanho, NPs metálicas com formas diferentes foram sintetizadas para aplicação em diferentes regiões espectrais. Dentre as diferentes formas, os nanobastões de ouro (AuNRs) têm atraído grande atenção recentemente devido às suas propriedades óticas únicas, que permitem a sua aplicação no diagnóstico e tratamento de doenças, detecção e imagem (2,4,38) e como agentes terapêuticos térmicos (39,40), dentre outras. Outras vantagens inerentes aos AuNRs incluem a facilidade de preparação através de uma variedade de métodos sintéticos e a possibilidade de ajustar sua razão de aspecto e, consequentemente, variar sua resposta óptica em uma ampla faixa espectral, do visível à região do NIR (41). A seguir serão discutidas separadamente as propriedades ópticas e cristalográficas, bem como métodos de preparação de AuNRs.

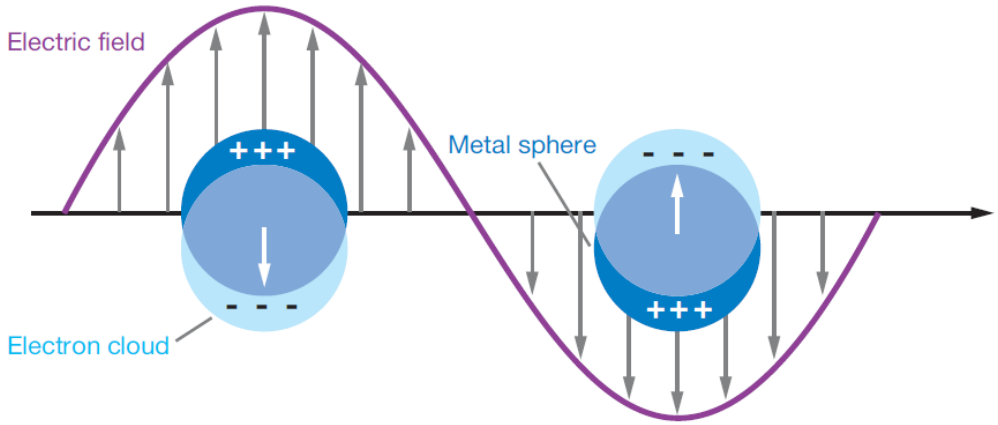
1.3.1. Propriedades óticas de AuNPs e AuNRs

As AuNPs exibem propriedades óticas fascinantes que podem ser ajustadas em uma faixa espectral ampla controlando os parâmetros geométricos das AuNPs. Tais propriedades óticas resultam das oscilações coletivas dos elétrons (plasmons) nos metais excitados por radiação eletromagnética (EMR) de comprimento de onda maior do que o tamanho de partícula, fenômeno denominado como ressonância localizada de plasmon de superfície (localized surface plasmon resonance (LSPR) do inglês)) (Figura 6) (14,42).

Os termos *localizado* e plasmon de *superficie* são utilizados, uma vez que a ressonância está localizada na superfície e que as oscilações coletivas do elétrons livres estão confinadas a um volume finito, definido pelas dimensões das partículas (14,43). Quando os elétrons livres em uma nanopartícula metálica são movidos pelo campo elétrico incidente, oscilando coletivamente a uma certa frequência, a EMR incidente é absorvida (14). Entretanto, a LSPR manifesta-se como um efeito combinado resultante tanto da absorção (conversão de fótons incidentes em fônons, vibrações da rede cristalina, ou relaxação por perda como calor), quanto do

espalhamento (a re-emissão de radiação secundária que resulta do relaxamento de cargas elétricas aceleradas em NPs metálicas expostas a radiação) no espectro de extinção ótica de NPs metálicas (14,43). A cor característica de NPs de metais nobres (por exemplo, vermelho para AuNPs e amarelo para AgNPs) advém destas oscilações coletivas coerentes dos elétrons livres na banda de condução (41).

Figura 6 - Representação esquemática de um plasmon localizado de superfície mostrando a origem da ressonância plasmonica de superfície devido à interação coerente dos elétrons na banda de condução com radiação eletromagnética incidente.



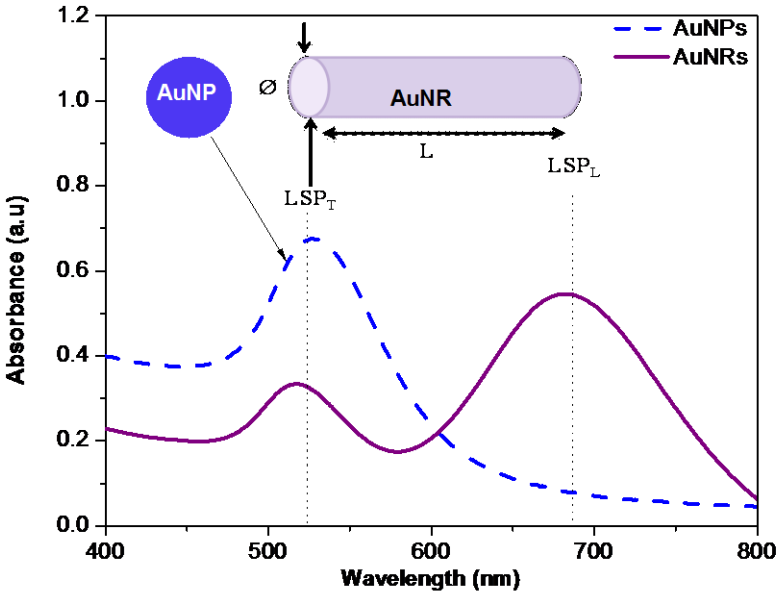
Fonte: (Willets 2007, Ref. (42)*)*

As condições de ressonância dependem da forma, tamanho e constantes dielétricas tanto do metal quanto do meio. Uma vez que a LSPR é sensível a alterações no ambiente dielétrico local, moléculas ligadas quimicamente podem ser detectadas por conta da alteração de densidade eletrônica que induzem na superfície das NPs metálicas, o que resulta numa alteração no λ_{max} da LSPR. Esta propriedade é empregada para detectar mudanças no ambiente local através de uma medida de mudança de comprimento de onda da LSPR e é a base de sensores sensíveis baseados em AuNPs (41,42). De fato, instrumentos comerciais que empregam a espectroscopia SPR para estudar a cinética e a termodinâmica de processos de ligação de moléculas biológicas já são encontrados no mercado, um exemplo sendo o sistema SPR da BIAcore® (42).

No caso das propriedades dependentes do tamanho e forma das NPs metálicas, à medida que a forma ou tamanho da nanopartícula muda, a geometria da superfície também se altera, causando uma mudança na densidade do campo elétrico na superfície. Isto provoca uma alteração na frequência de oscilação dos elétrons, gerando diferentes seções de choque para as propriedades óticas, incluindo absorção e espalhamento (41,43).

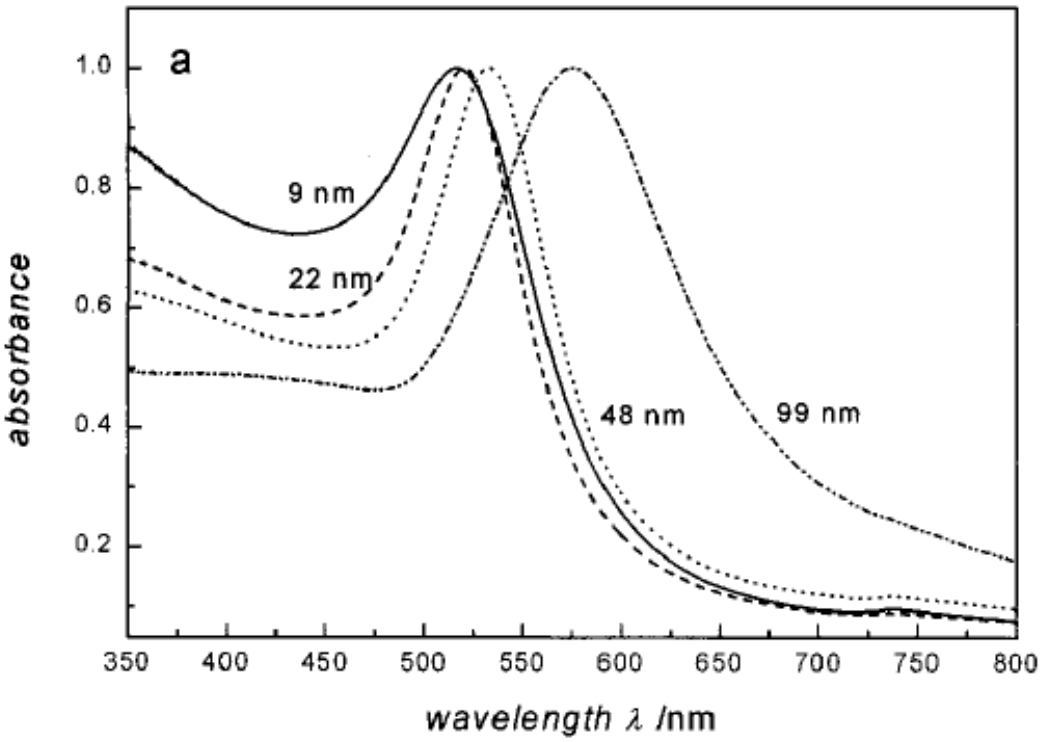
A Figura 7 mostra os espectros de absorção eletrônica de AuNPs e AuNRs. As AuNPs esféricas apresentam a banda de LSPR em torno de 520 nm (Figura 7, curva tracejada), que possui uma forte dependência com o tamanho de partícula, geralmente sendo observado um deslocamento batocrômico com o aumento do tamanho de partícula (44). Esta tendência é claramente observada na Figura 8 que mostra os espectros de absorção de AuNPs com quatro tamanhos diferentes (9, 22, 48 e 99 nm), apresentando as suas bandas de LSPR centradas em 517, 521, 533 e 575 nm, respectivamente (44).

Figura 7 - Espectros de absorção eletrônica de suspensões de AuNPs e AuNRs destacando as bandas de absorção atribuídas ao plasmon de superfície transversal (LSP_T)(do inglês transverse surface plasmon) e ao plasmon de superfície longitudinal (LSP_L) (do inglês longitudinal surface plasmon), respectivamente.



Fonte: Autoria Própria

Figura 8 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis de suspensões aquosas de AuNPs com diâmetros de 9, 22, 48, e 99 nm , apresentando suas λ_{max} em 517, 521, 533 e 575 nm, respectivamente, evidenciando o efeito do tamanho de partícula sobre a banda SPR.



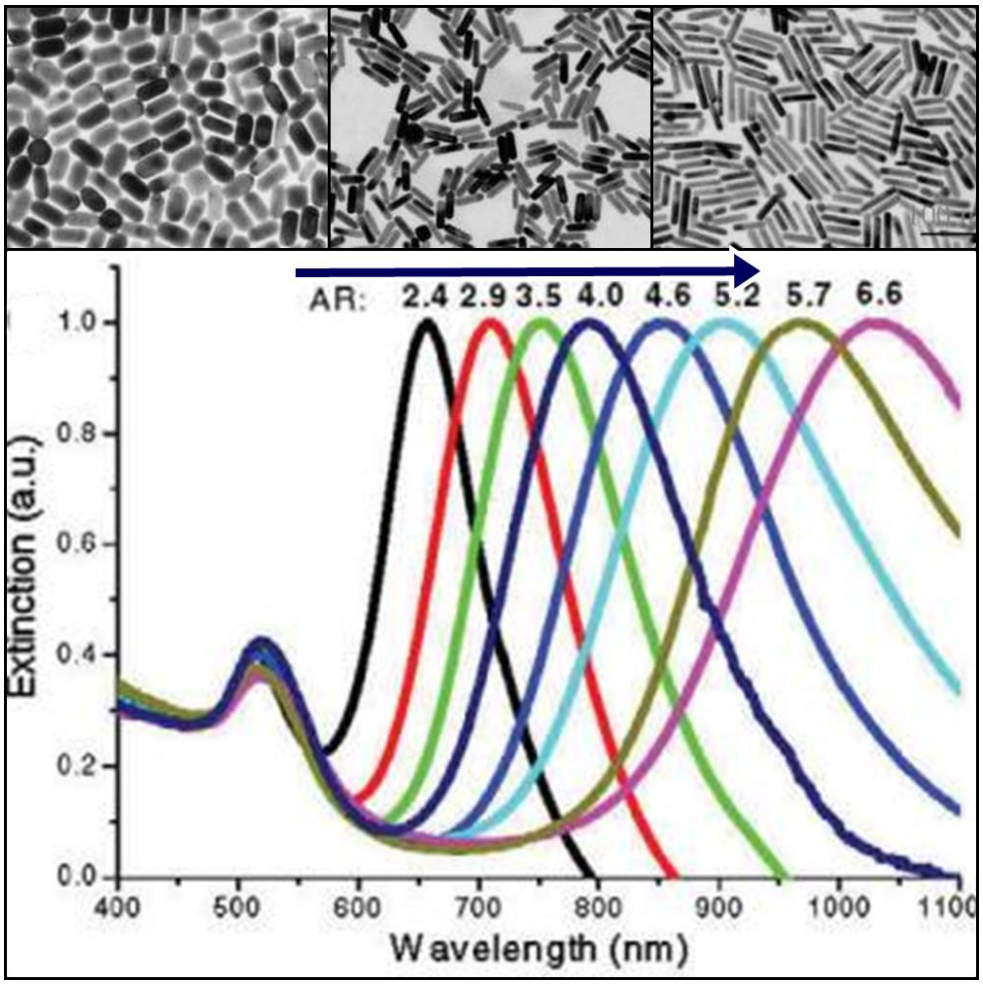
Fonte: (Link 1999, Ref (44)*)*

Uma característica muito importante dos AuNRs é a presença de duas bandas de absorção (Figura 7, curva sólida), que surgem da excitação dos plasmons de superfície quando iluminados com luz de comprimento de onda adequado (41,45). A absorção de plasmon de superfície transversal (LSP_T) surge da oscilação transversal dos elétrons e cai na região visível enquanto a absorção de plasmon de superfície longitudinal (LSP_L) pode cair tanto na região visível quanto no infravermelho próximo (NIR) (46), dependendo da razão de aspecto (AR (aspect ratio)= comprimento dividido pela largura) dos AuNRs (9,24,41,47–51).

Enquanto a banda LSP_T não depende do AR e apresenta mesmo comprimento de onda que a ressonância plasmônica das partículas esféricas (41), a banda LSP_L sofre um deslocamento de vermelho para a região NIR à medida a razão de aspecto (AR)

dos AuNRs (9,41,47,51,52) aumenta (Figura 9). Devido à esta banda de absorção caracteristica na região do NIR, os AuNRs pode atuar como agentes terapêuticos térmicos causando termólise foto-induzida de células-alvo (40).

Figura 9 - Propriedades óticas ajustáveis de AuNRs por alterações de AR. Os AuNRs com diferentes ARs exibem dimensões diferentes como evidenciado por micrografias de MET (acima), assim como diferentes comprimentos de onda da banda LSP_L.



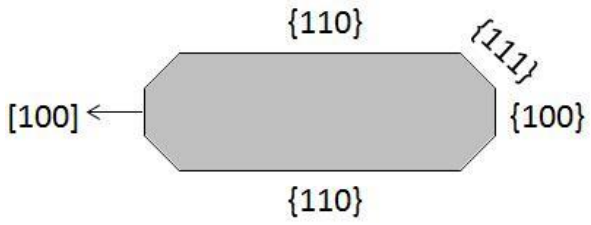
Fonte: (Huang 2010, Ref (9)*).*

1.3.2. Estrutura cristalográfica de AuNRs

Geralmente, os AuNRs apresentam uma direção de crescimento axial ([001]) e sua superfície é fechada ou coberta por faces {100} e {110} (Figura 10) (53,54), enquanto as partículas esféricas de ouro são normalmente fechadas por faces {100} e {111} (53). O

crescimento de AuNRs ocorre quando os íons Au^{1+} são preferencialmente reduzidos nas faces {001} das partículas semente, enquanto as faces {110} são preferencialmente estabilizadas por moléculas de CTAB adsorvidas (54,55). A forma final dos AuNRs depende de qual das três faces mostradas na Figura 10 cresce de maneira predominante. AuNRs curtos são formados quando as faces {100} e {110} crescem preferencialmente, enquanto partícula esféricas são formadas quando {100} e {111} crescem predominantemente (53). Assim, a forma das partículas pode ser controlada se um surfactante tal como o CTAB é adicionado e se a formação de átomos de Au é realizada sob condições controladas.

Figura 10 - Estrutura cristalográfica de AuNR mostrando diferentes faces do cristal. A direção ([100]) de crescimento é mostrada com uma seta.



Fonte: adotado de Wang Z et al. 1999, Ref (53).

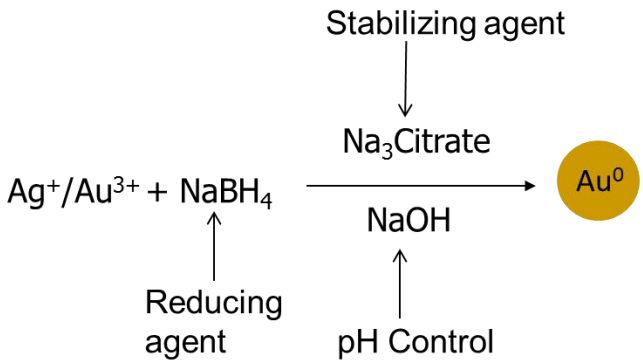
1.3.3. Métodos de preparação de AuNRs

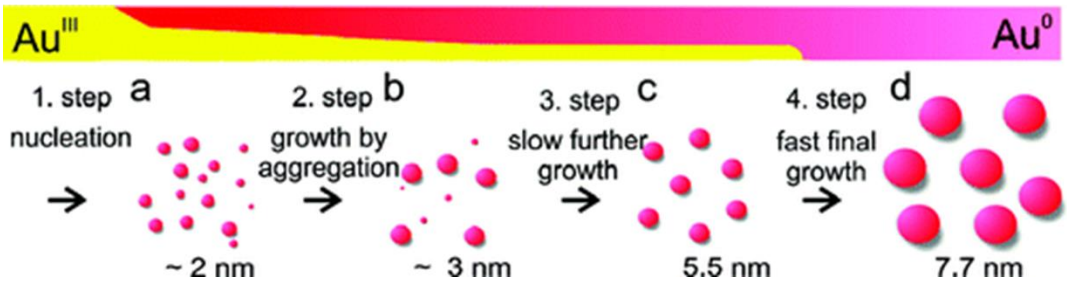
A partir desta breve discussão, torna-se claro que as propriedades catalíticas (20–22), eletrônicas (56), óticas (47) e biológicas (57) dependem intimamente do tamanho e forma das NPs, sendo que o controle de sua forma e tamanho permite manipular tais propriedades (50).

Devido a tais propriedades óticas e catalíticas únicas, foram desenvolvidos diversos métodos para a preparação de AuNPs em variadas formas. Estes métodos variam consideravelmente no que se refere à reprodutibilidade, rendimento, pureza, controle de forma das AuNPs, bem com respeito a seu impacto ambiental. Essas diferentes metodologias incluem método de *template* (58), fotoquímico (59–61), eletroquímico (62,63), assistido por irradiação microondas (64) e métodos químicos em solução, denominados *wet-chemical methods* (65–67). Os métodos convencionais de redução química para a preparação de AuNPs geralmente empregam um agente

redutor, tal como o borohidreto de sódio ($NaBH_4$) ou a hidrazina para reduzir sais do metal a NPs metálicas (Figura 11, parte de cima).

Figura 11 - Procedimento de síntese (acima) e mecanismo de formação (abaixo) de AuNPs pelo método clássico de síntese com citrato deduzido a partir de medidas de SAXS e XANES por Polte *et al.* (68).





Fonte: (Polte et al. 2010, Ref (68)*)*

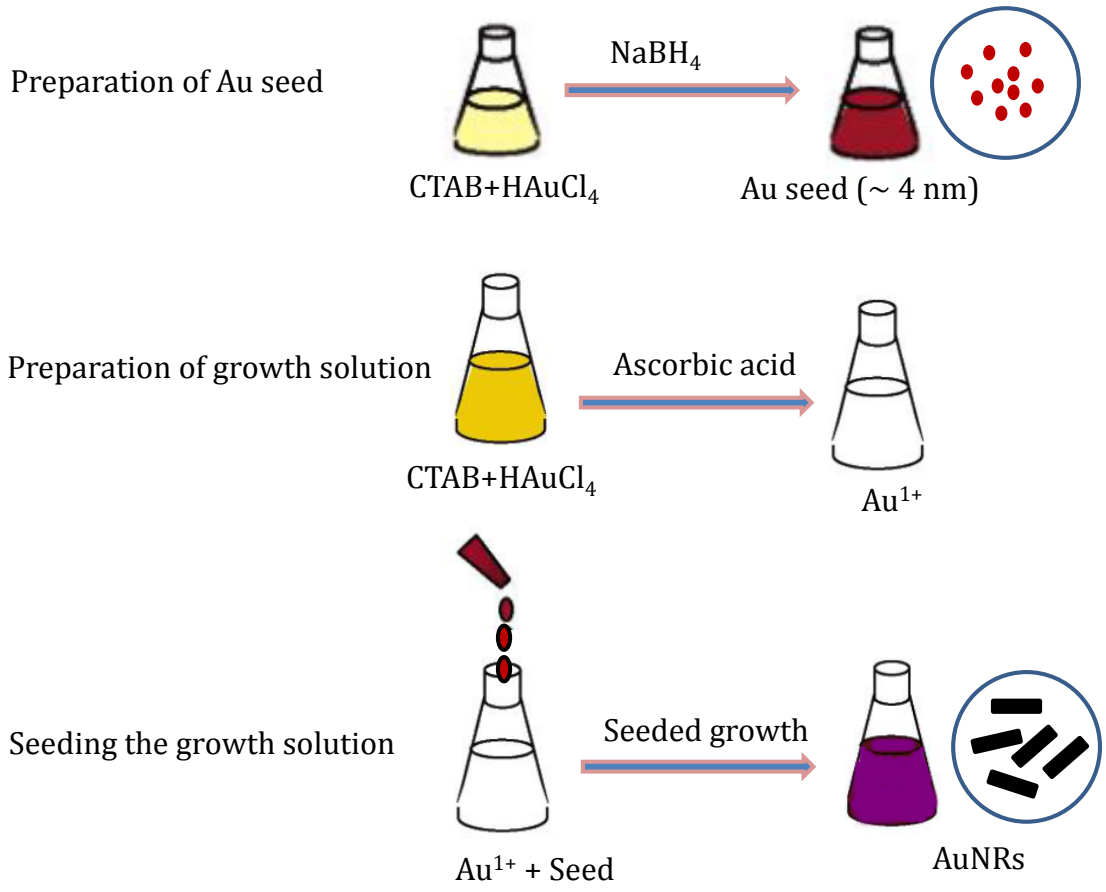
Polte *et al.* estudaram a formação de AuNPs utilizando técnicas de SAXS e XANES e propuseram um mecanismo de nucleação-crescimento consistindo de quatro etapas (Figura 11, parte inferior) (68). Na etapa 1, ocorre a formação rápida de núcleos (~2 nm) que crescem em tamanho (~3 nm) por coalescência na etapa 2. Subsequente coalescência e crescimento lento das partículas sustentado pela redução do precursor de ouro ocorrem na etapa 3. Por fim, as partículas crescem rapidamente até o seu tamanho final após o consumo completo de precursores (Etapa 4) (68).

O controle de forma das NPs é atingido através da seleção cuidadosa de ligantes estabilizadores de superfícies (surfactantes, moléculas poliméricas ou moléculas pequenas simples). O método de redução química em fase liquida mediado por

sementes (*seed-mediated wet chemical reduction method*) originalmente desenvolvido por Murphy e colaboradores (69,70) é um dos métodos mais utilizados para a preparação de AuNRs.

Em geral, a formação de AuNRs pelo método mediado por sementes requer dois passos (Figura 12). Em um primeiro passo, formam-se pequenas partículas semente (*seed partices*) de Au a partir da redução do sal precursor (Au^{3+}) por um agente redutor forte na presença da molécula tensoativa que direciona a forma, usualmente o CTAB. Em uma segunda etapa, estas sementes são introduzidas em uma solução de crescimento (*growth solution*) contendo íons Au^{1+} (na forma de complexo Au^{1+}–CTAB) obtido a partir de redução parcial de Au^{3+} por um agente redutor fraco (acido ascórbico, por exemplo) na presença de CTAB.

Figura 12 - Crescimento de AuNRs de duas etapas mediadas por sementes



Fonte: Autoria própria

Este método permite controlar os ARs através da alteração das condições de reação. No entanto, depende da preparação de sementes de Au utilizando uma solução de $NaBH_4$ recém preparada e mantida sob refrigeração como um agente redutor forte no primeiro passo. $NaBH_4$ é um reagente de alto custo, difícil de manusear e que não pode ser armazenado por muito tempo, sendo necessária uma solução recém preparada cada vez que a síntese de AuNRs é realizada. Outro agente redutor popular é a hidrazina (71). Embora a hidrazina seja um bom agente redutor, a sua utilização deve ser evitada, uma vez que é uma substância cancerígena, extremamente nociva à saúde e ao meio-ambiente, além de ser muito instável (especialmente na sua forma anidra).

Assim, o desenvolvimento de métodos mais simples que empregam reagentes de baixo custo, seguros e de fácil manuseio é de grande importância. Essas tentativas incluem a redução de sais a nanopartículas metálicas usando extratos de plantas (72,73) microorganismos (74,75) e reagentes amigáveis ao meio ambiente (65–67,76,77).

A síntese de nanopartículas de ouro e de prata utilizando extratos vegetais (78–80) é considerada uma abordagem verde, mas tem certas limitações: (i) tais métodos geralmente consistem em etapas múltiplas e normalmente resultam na formação de nanopartículas esféricas, ao invés de AuNRs de forma controlada; (ii) os procedimentos de extração utilizados são geralmente tediosos, demorados e envolvem frequentemente produtos químicos perigosos; (iii) a quantificação de cada componente do extrato complexo da planta (antioxidantes, açúcares, polifenóis, etc.) demanda tempo e energia; (iv) a quantidade de componentes ativos varia de um lote de extração para outro, o que resulta em menos reprodutibilidade do processo posterior de formação de AuNRs.

Similarmente, métodos biossintéticos para formação de NPs também são relatados na literatura usando microrganismos (79) como bactérias, algas e fungos, mas o crescimento e manutenção da própria cultura celular é um trabalho cansativo e caro e muitas vezes requer um controle rigoroso do pH e da temperatura, o que diminue as vantagens do procedimento. Neste trabalho, substituímos $NaBH_4$ pelo glicerol

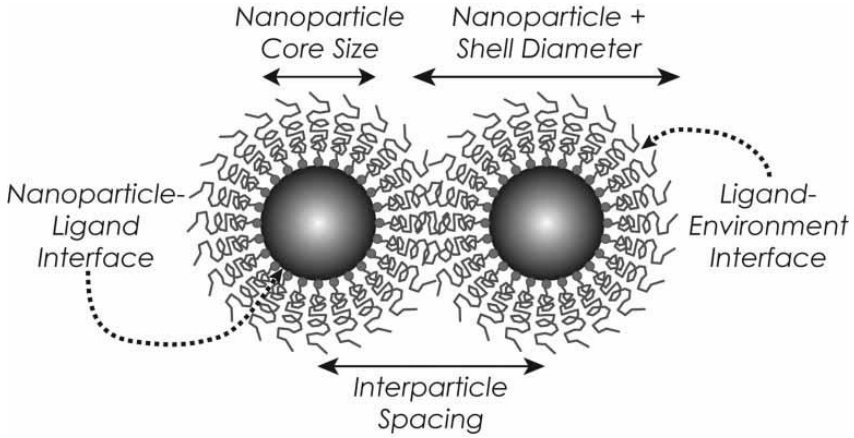
como agente redutor para a formação de AuNRs, devido às razões discutidas na seção 1.6.

1.4. Estabilização de nanopartículas: o papel dos estabilizadores de partículas no controle de forma e tamanho

A eficácia do uso de AuNPs na maioria das aplicações (8,10,19,31–37) muitas vezes depende de seu tamanho, forma ou estrutura de superfície (16,23,26,81–85). A estrutura e a química de superfície das AuNPs também determinam a facilidade de sua funcionalização, grau de interação com as biomoléculas (81), captação celular (82) e citotoxicidade (86). Assim, o controle do tamanho, forma e composição da superfície de AuNPs é de grande importância para a sua utilização eficaz em várias aplicações.

Uma vez que AuNPs têm uma área superficial maior (Figura 3) e, assim, uma elevada energia superficial, consequentemente possuem uma tendência natural de coalescer ou aglomerar e devem ser estabilizadas eletrostaticamente (86) ou através de repulsão estérica (Figura 13), frequentemente através do seu revestimento com diferentes ligantes (surfactantes, polímeros ou ligantes na forma de moléculas pequenas com grupos tióis, aminas, ácidos carboxílicos, grupos funcionais fosfônicos (87)). Estes ligantes ajudam a controlar o tamanho, forma e espaçamento entre partículas e determinar a interação interfacial na interface NP/ligantes e NP/ambiente (87) (Figura 13).

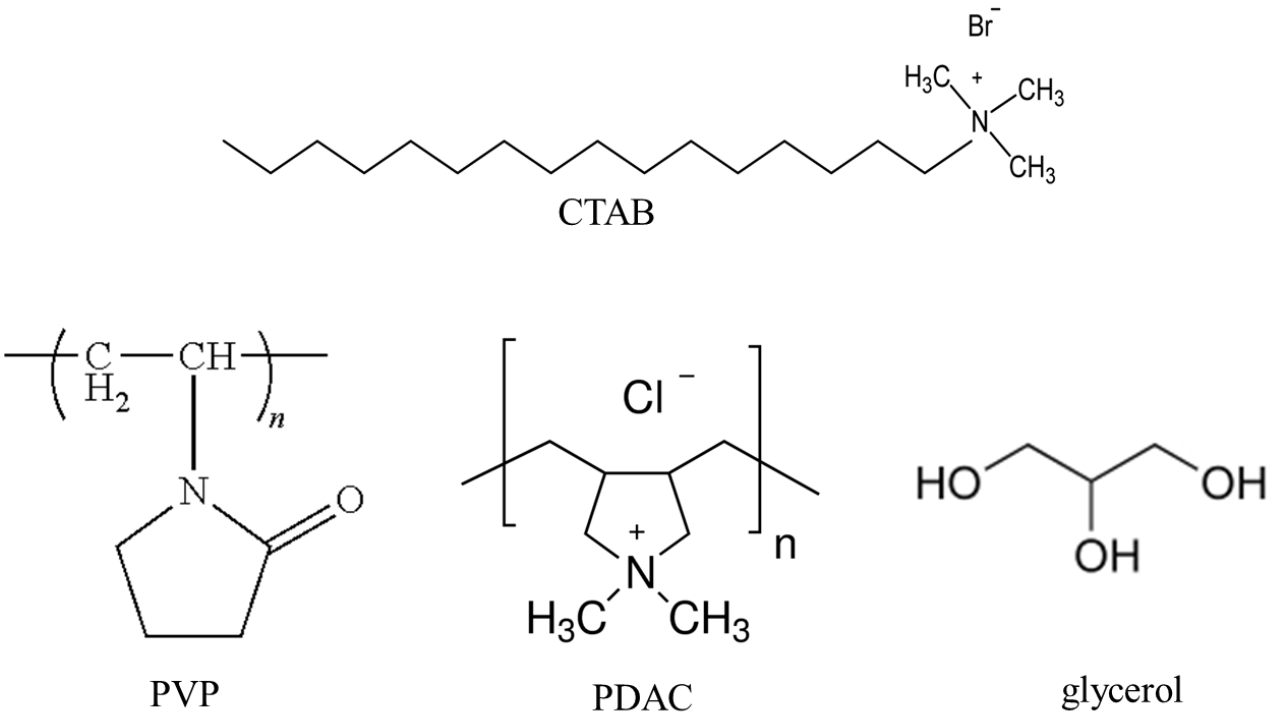
Figura 13 - Ilustração esquemática de parâmetros controlados por ligantes que são importantes na determinação de propriedades físicas de nanopartículas ou conjuntos de nanopartículas



Fonte: (Grubbs et al, 2007, Ref (87)*)*

Alguns exemplos de agentes de controle de forma e tamanho incluem surfactantes orgânicos (por exemplo, brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, $C_{19}H_{42}BrN$ or $(C_{16}H_{33})N^{+}(CH_3)_3Br^{-}$) e CTAC com contra-ions Cl^{-}), moléculas estabilizadoras poliméricas (eg Polivinilpirrolidona, PVP, $(C_6H_9NO)_n$), poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC, $(C_8H_{16}ClN)_n$), polietilenimina, poliotiofeno) (88–90) ou sais inorgânicos (ex: $AgNO_3$) (84), bem como moléculas/ ions pequenos tais como citrato (70). Dentre estes, as estruturas químicas dos diferentes agentes estabilizadores utilizados neste trabalho são apresentadas na Figura 14.

Figura 14 - Estrutura química de surfactantes/polímeros utilizados para estabilização colloidal de partículas (controle de tamanho e forma).



Fonte: Autoria própria

O CTAB tem sido amplamente utilizado para preparação de AuNRs (55,91–95). A presença de CTAB na mistura reacional é importante para a formação de AuNRs, uma vez que os AuNRs são estabilizados pelas bicamadas adsorvidas de CTAB (55). De fato, o CTAB tende a adsorver-se preferencialmente nas diferentes faces cristalinas da partícula semente de ouro em crescimento, o que leva ao crescimento preferencial de faces (tais como {100} que

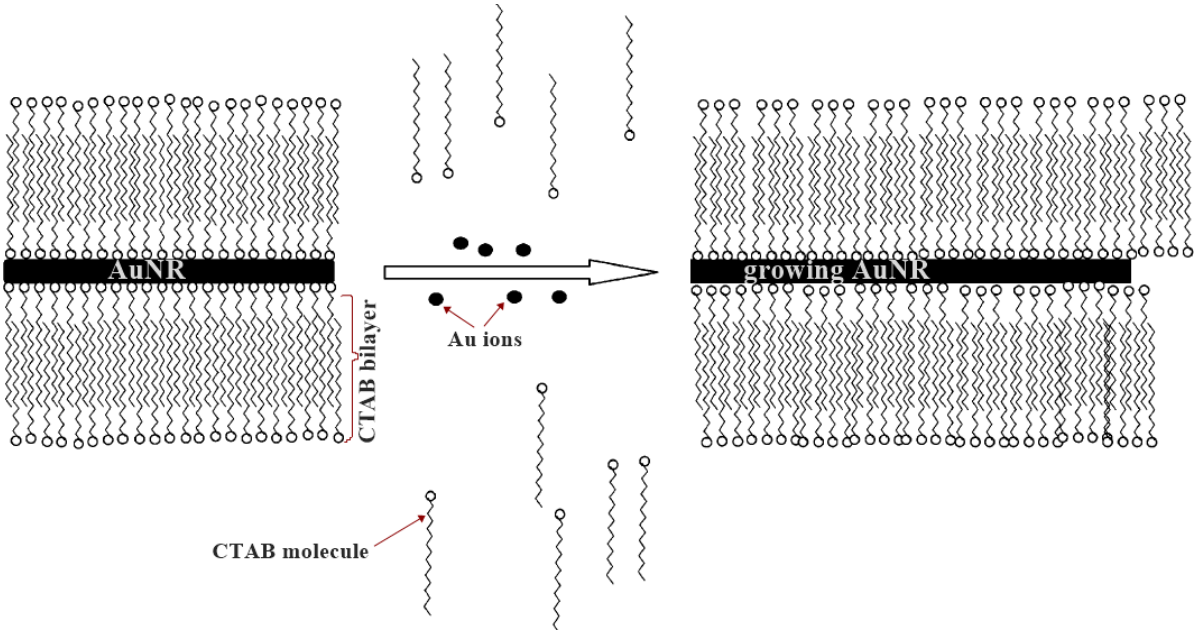
apresenta menor adsorção de CTAB), enquanto inibe o crescimento de outras faces ao longo do eixo longitudial dos nanobastões (tais como faces {110}, que apresenta alta concentração de CTAB adsorvido). Em outras palavras, a molécula CTAB tende a adsorver-se preferencialmente nas faces {110} e o número maior de ligantes CTAB nestas faces impede seu crescimento (55). Assim, a direcionalidade do crescimento, ou crescimento anisotrópico, é alcançada e resulta na formação de AuNRs.

Apesar de alguns estudos sugerirem que o CTAB forma micelas e assim atuam como template para a formação de AuNRs (70), o modelo baseado na adsorção preferencial de CTAB a certas faces é mais amplamente aceito. Considera-se que o CTAB adsorve-se e forma uma bicamada na superfície de AuNRs, onde os grupos de cabeça ($(CH_3)_3N^+$) de uma monocamada estão direcionados para a superfície de AuNRs, enquanto os da segunda camada fazem frente ao solvente para manter a solubilidade em água (91). Tal mecanismo, conhecido como z*ipping Mechanism* é ilustrado na Figura 15. Gao et al. estudaram o efeito de diferentes grupos de cabeça (head groups) e comprimento de cauda de moléculas surfactante sobre a formação de AuNRs. Eles verificaram que enquanto o grupo de cabeça é importante para a adsorção preferencial das moléculas de surfactante em certas faces do AuNRs em crescimento, o comprimento da cauda é crítico para estabilização dos AuNRs. Enquanto o uso de C_{16}TAB levou à formação de AuNRs, os AuNRs não foram formados usando C_{10}TAB, embora ambos tenham o mesmo grupo de cabeça. Isto levou-os a postular que as interações cauda-cauda (através de interações de van der Waals) são mais importantes do que as interações grupo cabeça-Au (91).

Outros estudos ressaltaram a importância dos contra-íons dos surfactantes na formação de AuNRs. Garg *et al.* alegaram que os AuNRs podem ser preparados na ausência de alta concentração de CTA^+, desde que sejam adicionados íons Br- em quantidade suficientes à solução de crescimento e que o papel dos íons Br- é mais crítico do que o componente CTA^+ do surfactante (96). Eles sugeriram ainda que a parte CTA^+ de CTAB apenas fornece proteção estérica aos AuNRs (96).

Além do CTAB, a adição de $AgNO_3$ à solução de crescimento também é considerada importante para a formação reprodutível e controlada de AuNRs; A presença desta espécie aumenta o rendimento de AuNRs, bem como auxilia a ajustar o AR (55,97). Jana *et al.*

Figura 15 - O mecanismo de "Zipping" que mostra a formação da bicamada de CTAB sobre AuNRs, o que favorece a redução de ions Au^{3+} preferencialmente nas extremidades livres de CTAB levando ao crescimento longitudinal de AuNRs

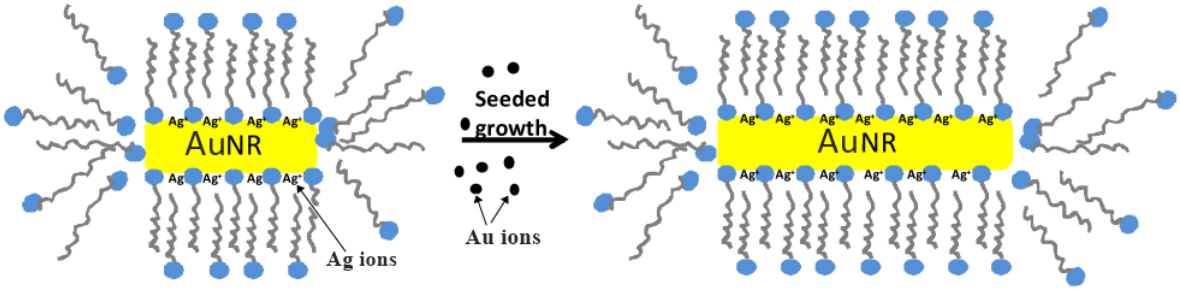


Fonte: (Gao et al. 2003, Ref (91)*).*

propuseram que os íons Ag^{1+} formam AgBr (Br^- vindo do CTAB), que não apenas restringe o crescimento à forma da haste, mas também estabiliza os esferóides e bastonetes formados em solução (98). Para explicar o papel importante de $AgNO_3$ na formação controlada de AuNRs, Nikoobakht *et al.* sugeriram que os íons Ag^+ ajudam na ligação de CTAB às faces {110}, o que diminui o crescimento de AuNRs ao longo dos seus lados (55). De modo semelhante, Liu *et al.* também sugeririam que os íons Ag^+ se adsorvem seletivamente nas faces {110}, o que retarda o crescimento dessas faces. Desta forma, a face {100}, sendo apenas parcialmente coberta por prata, cresce dominantemente de modo que um crescimento dimensional ao longo da direção [100] leva à formação de AuNRs (97). Tal modelo incorporando iõns Ag^+ está ilustrado na Figura 16.

PVP é outro importante surfactante amplamente utilizado para estabilizar NPs metálicas, especialmente AuNPs, AgNPs e PtNPs (99–103). Uma vez que o PVP é um polímero neutro, espera-se que a estabilização seja através de meios estéricos (99,102). Zhou *et al.* mostraram que realmente o PVP estabiliza as AuNPs pela coordenação do oxigénio do

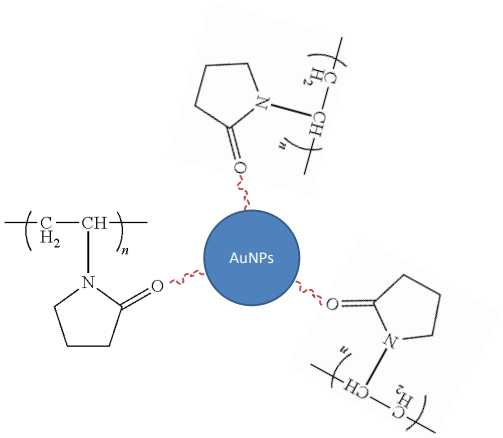
Figura 16 - O mecanismo de "*zipping*" na presença de $AgNO_3$ mostrando a formação da bicamada de CTAB sobre os AuNRs e a ligação de íons brometo do CTAB com íons Ag^+. Esta ligação diminui as repulsões entre os grupos de cabeça vizinhos ao longo das faces laterais {110} e os pares Ag-Br atuam como um estabilizador para inibir o crescimento nestas, servindo, portanto, como um molde de crescimento anisotrópico para redução adicional do precursor de Au na direção de crescimento [111].



Fonte: Ref (48).

grupo carbonila do PVP com a superfície de Au (Figura 17), como indicado por um aumento na energia de ligação do pico de XPS O1*s* do grupo carbonila e uma ligeira diminuição na energia de ligação do pico de Au4*f* (99). Wu *et al.* estudaram a redução e estabilização de íons Ag^+ utilizando PVP como agente estabilizante e redutor e sugeriu a formação do complexo Ag^+–PVP através da coordenação do átomo de O da carbonila com Ag^+, o que facilita a troca de elétrons entre Ag^+ e o anel de pirrolidona , reduzindo assim o Ag^+ para Ag^0.

Figura 17 - Representação esquemática do modo de ligação de PVP na superfície de AuNPs



Fonte: (Zhou et al., 2009, Ref. (99)*)*

Wang *et al.* propuseram que o PVP estabiliza as AgNPs formando uma camada protetora em torno de AgNPs devido a coordenação da prata com o átomo N do PVP (104) no caso de nanopartículas inferiores a 50 nm, enquanto que para partículas maiores a prata também pode formar coordenação com o átomo de oxigénio do PVP.

1.5. Síntese e estabilização de NPs sem uso de ligantes estabilizadores

As vantagens do controle de tamanho/forma das nanopartículas alcançados utilizando ligantes estabilizadores são parcialmente contrabalanceadas pelo fato de que estes estabilizadores bloqueam os sítos ativos na superfície de AuNPs, que são essenciais para muitas aplicações relacionadas com a superfície. Consequentemente, muitas aplicações, particularmente na área de catálise, exigem a remoção destes estabilizadores de superfície, que é muitas vezes difícil e problemática (81,105,106). Várias estratégias para a remoção de estabilizadores de superfície foram exploradas tais como calcinação, lavagem com ácido, tratamento com ozônio e UV e extração com solvente (105,106). Tais tratamentos, no entanto, além de remover os ligantes estabilizadores, muitas vezes também alteram a distribuição de tamanho e a morfologia das partículas, o que pode ser prejudicial à sua atividade catalítica e afetar negativamente sua eficácia em muitas aplicações (105,106).

Para evitar problemas associados à presença de ligantes estabilizadores, muitos esforços têm sido direcionados para sintetizar nanopartículas metálicas para aplicações associadas à superfície (por exemplo, catálise e detecção) por métodos livres de surfactante (107) incluindo métodos fotoquímicos, ultra-sonoquímicos (108,109) e métodos baseados em plasma (110). Em diversos casos, moléculas biológicas, tais como o oligonucleótidos (111), os aminoácidos (107), o cloridrato de éster metílico de L-cisteína (86) ou moléculas orgânicas relativamente mais verdes como citrato (84,109) e o dodecanotiol (112) foram utilizados no lugar de surfactantes para estabilizar AuNPs.

Um dos objetivos desta tese foi utilizar glicerol tanto como solvente quanto como agente estabilizante e redutor, com as vantagens de baixo custo, boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e longa vida útil. Nesta tese, demonstramos que AuNPs com razoavelmente boa distribuição de tamanho e estabilidade pode ser obtidas usando glicerol em meio alcalino simultaneamente como um agente redutor e estabilizador de baixo custo e

mais verde. O método *one-pot* para a preparação de AuNPs desenvolvido nesses trabalho que emprega glicerol como um agente redutor e estabilizador mais verde e de baixo custo não requere a utilização de qualquer agente estabilizante externo ou solvente orgânico e atende os princípios da química verde.

1.6. Preparação de AuNPs e AgNPs utilizando Glicerol como agente redutor

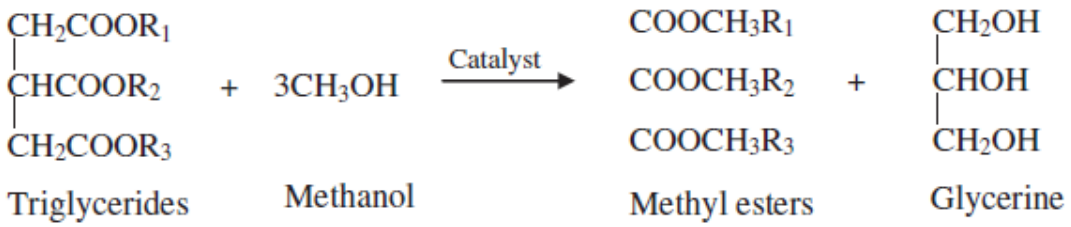
Estudos recentes demonstraram que o glicerol (propano-1,2,3-triol) em meio alcalino pode reduzir os íons Ag^{+} e Au^{3+} a nanopartículas metálicas à temperatura ambiente na presença de PVP, PDAC ou CTAB como agente estabilizante (65,76,77,113–117). O uso de glicerol como um agente redutor de baixo custo e mais verde é uma opção atraente para preparar AuNPs devido a muitas vantagens inerentes, tais como baixo custo e alta estabilidade química. De forma semelhante, foram preparadas AuNPs de 2–8 nm utilizando lipossomos como nanorreatores e glicerol, incorporado nos nanorreatores como agente redutor (67), além de PVP e 6-mercapto-1-hexanol como agentes estabilizantes.

Nalawade *et al.* também relataram a preparação de AuNPs na faixa de tamanho de 8–50 nm usando glicerol puro ou mistura de glicerol-PVP (65). Similarmente, Grace e Pandian empregaram glicerol como agente redutor para preparar AuNPs protegidos com PVP usando métodos de microondas e refluxo à temperatura de ebulição do glicerol (290 °C) (66). Eles conseguiram a formação de AuNPs esféricos (7 nm de diâmetro) usando condições de refluxo a 290 °C, enquanto que as nanopartículas de ouro prismáticas triangulares foram formadas à mesma temperatura sob o modo de aquecimento por microondas (66).

O glicerol é um reagente biodegradável de baixo custo, não tóxico, não volátil, que é produzido como subproduto em grandes quantidades pela indústria de biodiesel. O glicerol bruto é o principal subproduto da reação de transesterificação (Figura 18) na indústria do biodiesel e da reação de saponificação na indústria do sabão (118–120). Este subproduto encontra muitas aplicações industriais, for exemplo, na produção de cosméticos, resinas, medicamentos, alimentos, tecidos e produtos químicos de maior valor agregado (121), etc. No entanto, para tais aplicações, o glicerol deve ser

purificado e este processo de purificação é um aspecto econômico e tecnológico importante na indústria de biodiesel. Além disso, como o biodiesel é produzido em grande escala, produz-se excesso de glicerol bruto como subproduto (2 bilhões de lbs em 2009) (119), o que torna o glicerol um reagente economicamente atrativo para aplicações em processos e reações químicas, além de ser considerado como um agente redutor/solvente sustentável (118,119,121).

Figura 18 - Reação de transesterificação em que as gorduras e óleos (triglicéridos) reagem com um álcool tal como metanol, na presença de um catalisador (ácidos (HCl, H_2SO_4), bases (NaOH, KOH, CaO, MgO), ácidos sólidos (óxido de zircónio ou óxido de titânio) ou enzimas (lipozima, novozima)) para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerol como subproduto



Font: Ref. (120)

Uma propriedade importante do glicerol é sua alta estabilidade na maioria das condições, podendo ser armazenado por um longo período de tempo, mesmo em soluções aquosas. Comparado com o método do poliol (100) e os métodos assistidos por microondas (64), que têm sido amplamente utilizados na preparação de catalisadores baseados em Au, o método do glicerol é muito mais rápido e simples. O método do poliol consiste tipicamente em refluxar uma mistura de um sal precursor (ex: $AuCl_3$ ou $AgNO_3$), um agente estabilizante (ex: PVP) e um poliálcool (ex etilenoglicol) a 160–240 °C durante 2–12h, um processo que é tedioso e que consume tempo e energia. A abordagem que emprega o uso de microondas também demanda alta temperatura e requere um gerador de microondas. Além disso, em comparação com os métodos mencionados acima, o glicerol é uma opção mais verde, uma vez que o glicerol é não tóxico e prontamente biodegradável sob condições aeróbicas.

Outra característica importante do glicerol é que este pode atuar como um agente de redução fraco ou relativamente mais forte dependendo do pH da solução, podendo ser utilizado como agente redutor ajustável ao pH.

A partir desta breve revisão da literatura, torna-se claro que o glicerol tem potencial para ser empregado como agente redutor de baixo custo e mais verde. Entretanto, os estudos relatados acima empregaram glicerol comercial de alta pureza (pureza ≥ 99,5%) (65,76,113,114,122), ou requerem instrumentos de alto custo (66), reagentes caros [68] ou procedimento complicado (67).

Neste estudo, tentou-se empregar glicerol bruto (crude glycerol (CG)) obtido como subproduto da reação de transesterificação (118) em indústrias de biodiesel como agente redutor para preparar AuNPs de 10 nm ou menores com boa homogeneidade de tamanho. Não se utilizou nenhum passo de purificação exceto filtração simples para purificar o CG. A motivação por trás dessas tentativas foi (i) substituir os agentes redutores menos estáveis e perigosos, tais como o borohidreto de sódio e a hidrazina, pelo glicerol, especialmente na sua forma bruta (CG), que é ambientalmente benigno, quimicamente estável, biodegradável e abundantemente disponível, (ii) explorar novas possibilidades para a preparação de nanopartículas metálicas utilizando CG como agente redutor, (iii) comparar a eficiência de glicerol comercial (alta pureza) e CG na síntese de AuNPs e (iv) se beneficiar da natureza sustentável do glicerol e empregá-lo como um agente redutor de baixo custo e abundantemente disponível.

Também preparou-se com sucesso AuNRs por um método *one-pot* usando glicerol como agente redutor e CTAB e $AgNO_3$ como agente de controle de forma das partículas. Demonstramos que a formação de sementes e o crescimento de partículas ocorrem na mesma solução, levando à formação de AuNRs na presença de CTAB. Verificou-se que o rendimento de AuNR foi de 100% à temperatura ambiente e sob condições de redução suaves. Por conseguinte, o método proposto aqui pela primeira vez apresenta as seguintes vantagens em relação aos métodos mais comumente encotrados na literatura: (i) simplicidade, (ii) rendimento elevado à temperatura

ambiente, utilizando reagentes facilmente manipuláveis, de baixo custo e ambientalmente seguros e (iii) boa reprodutibilidade.

1.7. Objetivos do projeto

O objetivo geral dessa tese foi preparar e caracterizar nanopartículas de ouro com controle de tamanho e forma usando glicerol (puro e cru) como agente redutor de baixo custo e ambientalmente amigável, bem como agente estabilizante.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos do projeto estão descritos a seguir.

1) Preparar nanobastões de ouro (AuNRs) usando glicerol como agente redutor e CTAB como agente de controle da forma.

2) Verificar o efeito dos parâmetros de síntese (pH e concentrações de glicerol, CTAB e $AgNO_3$) no rendimento e razão de aspecto (AR= aspect ratio) dos AuNRs

3) Preparar AuNPs e AgNPs utilizando glicerol (puro e bruto) como agente redutor na presença de diferentes agentes estabilizantes tais como CTAB, PVP e PDAC

4) Verificar o efeito das impurezas presentes no glicerol bruto obtido diretamente da reação de transesterificação sobre a forma, morfologia e distribuição de tamanho de partícula de AuNPs e AgNPs.

5) Verificar o efeito destes diferentes estabilizantes/polieletrólitos na morfologia e distribuição de tamanho dos NPs.

6) Síntese sem ligantes establizantes de AuNPs e AgNPs utilizando glicerol tanto como agentes redutores quanto estabilizador.

Capítulo 2

Parte experimental

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes químicos

Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), $AgNO_3$, $HAuCl_4$ e glicerol (~99,5%) foram comprados da Fluka, Merck, Sigma-Aldrich e Panreac, respectivamente. Polivinilpirrolidona (PVP, peso molecular médio de 10.000 g mol^{-1}), cloreto de polidialildimetilamônio (PDAC, 20% (m/v) em H_2O, peso molecular entre 100.000–200.000 g mol^{-1}) foram adquiridos da Sigma Aldrich. Todos estes reagentes químicos foram de qualidade analítica e foram utilizados sem purificação adicional. Também foram utilizadas amostras de glicerol bruto (crude glycerol (CG)), localmente conhecido como Glicerina Loira, de cor amarela acastanhada e industrialmente preparadas por reação de transesterificação empregando-se uma mistura de óleos vegetais e gorduras animais. O CG foi fornecido pela industria BioBrotas Oleoquímica (Brotas, SP).

Dois tipos de amostras de CG (CG-73 e CG-65) foram utilizadas neste trabalho. As amostras CG-73 (contendo 73% de glicerol e baixo teor de impurezas orgânicas e elevado teor de impurezas inorgânicas) foram duplamente filtradas a vácuo através de papel de filtro de 7 µm e na sequência em 0,2 µm, com o objetivo de remover a materia partículada. Utilizou-se o CG-65 (contendo 65% de glicerol e elevado teor de impurezas orgânicas), sem qualquer pré-tratamento. Todas as soluções aquosas utilizadas na síntese foram preparadas com água de alta pureza (18,2 MΩcm) purificada por sistema Millipore Milli-Q Plus. Os aparatos de vidraria utilizados nos experimentos foram primeiramente limpos com solução de permanganato de potássio, depois com solução piranha (3 mL H_2SO_4 : 1 mL de H_2O_2) e finalmente lavados com uma quantidade abundante de água Milli-Q.

2.2. Preparação de nanobastões de ouro (AuNRs) pelo método denominado "*one-pot*" utilizando glycerol de alta pureza como agente redutor

O procedimento geral para a preparação de AuNRs é mostrado na Figura 19 e os detalhes das condições experimentais utilizadas na síntese de AuNRs pelo método one-pot são reportados na Tabela 1. Todas as concentrações mencionadas são as concentrações iniciais.

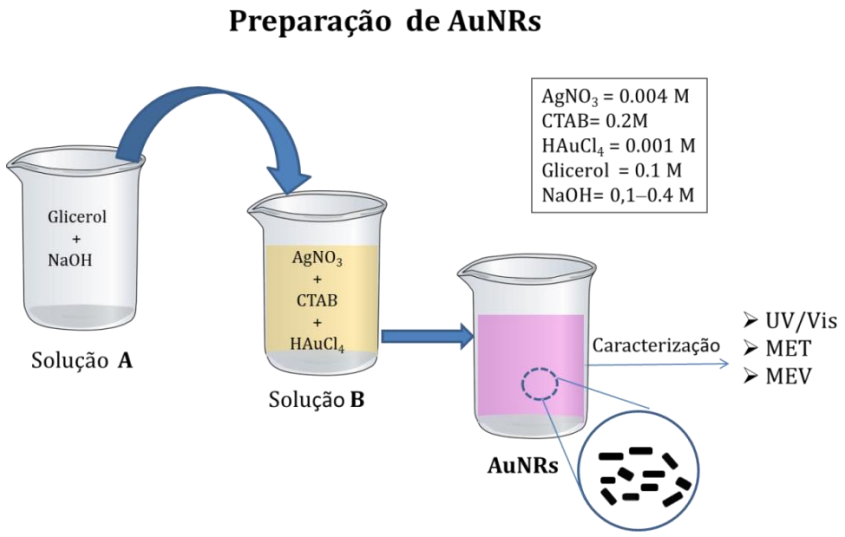
O protocolo típico de síntese consistiu na preparação de duas soluções (A e B) e depois a solução A é adicionada à solução B (Figura 19).

Solução A: Num balão volumétrico de polipropileno, prepararam-se soluções de glicerol 0,1 mol L^{-1} em diferentes pH por diluição do volume necessário de glicerol em solução aquosa de NaOH de diferentes concentrações (0,01, 0,1, 0,2 e 0,3 mol L^{-1}).

Solução B: A Solução B foi preparada por adição de 5 mL de solução aquosa de CTAB (0,2 mol L^{-1}) a 150 µL (a menos que especificado de outra forma) de uma solução aquosa de $AgNO_3$ (0,004 mol L^{-1}) num tubo falcon de polipropileno de 50 mL de volume. Em seguida, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de $HAuCl_4$ (0,001 mol L^{-1}) o que resultou na formação de uma solução amarelo-alaranjada.

Finalmente, foram adicionados volumes diferentes de solução A (glicerol 0,1 mol L^{-1} em meio alcalino) à solução B num tubo de polipropileno, o que resultou numa descoloração completa da solução da mistura ou, em alguns casos, numa cor amarela muito fraca, dependendo do pH e volume da solução de glicerol adicionada. Posteriormente, esta cor amarelada desapareceu.

Figura 19 - Esquema geral para peparação de AuNRs utilizando glicerol como agente redutor e CTAB como agente de controle-de-forma. A letra M significa concentração em mol L^{-1}.



Fonte: Autoria própria

Tabela 1 - Parâmetros experimentais utilizados na síntese de AuNRs. A concentração de CTAB, $HAuCl_4$ e $AgNO_3$ foi de 0,2 mol L^{-1}, 0,001 mol L^{-1} e 0,004 mol L^{-1}, respectivamente.

Código	**CTAB (mol L^{-1})**	**Glycerol (mL)**	**NaOH (mol L^{-1})**	**Au^{3+} (mol L^{-1})**	**$AgNO_3$ (mL)**	**T (°C)**
NR-1	0,2	10	0,01	0,001	0,15	25
NR-2	0,2	10	0,01	0,001	0,15	30
NR-3	0,2	10	0,01	0,001	0,15	50
NR-4	0,2	10	0,01	0,001	0,30	50
NR-5	0,2	10	0,01	0,001	0,15	60
NR-6	0,2	2	0,1	0,001	0,10–0,35	30
NR-7	0,2	2	0,2	0,001	0,15	30
NR-8	0,2	2	0,3	0,001	0,15	30

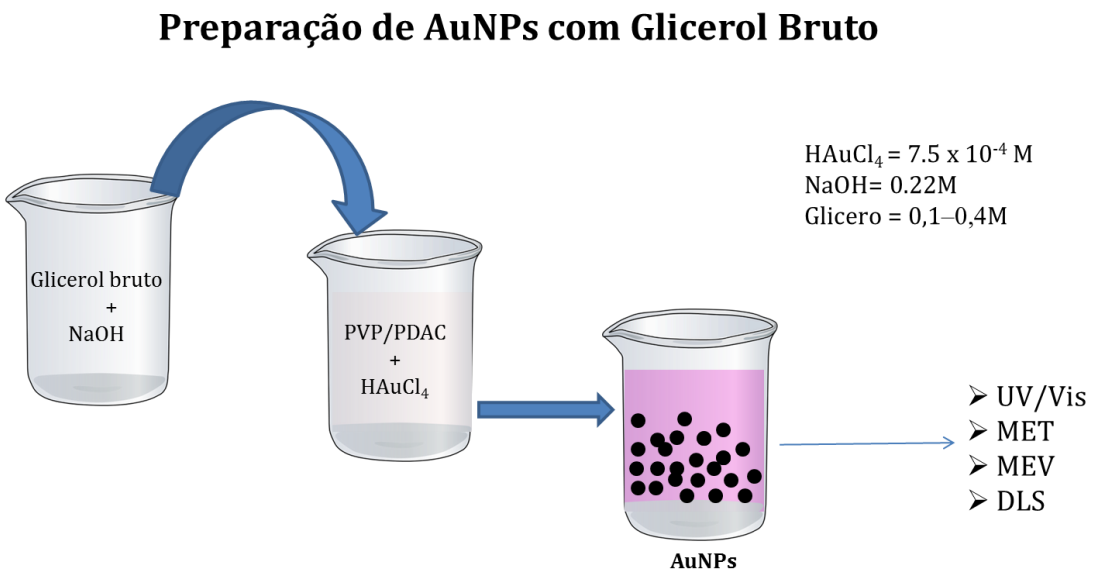
Fonte: Autoria própria

A formação das AuNRs por este procedimento é normalmente lenta e pode levar de 0,5 hora a 72 horas dependendo da temperatura e pH da solução. Na concentração de NaOH de 0,1 M ou mais, a cor da solução de crescimento (growth solution) muda de incolor para purpura-rosada clara dentro de 15-20 minutos, e a formação de AuNR começa dentro de 1h. A formação das AuNRs é acompanhada por uma mudança de cor, de rosa para roxo. Após a conclusão da formação de AuNRs, a amostra foi centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos para remover o excesso de CTAB e procedida a lavagem por duas vezes com água deionizada.

2.3. Preparação de AuNPs pelo método denominado "*one-pot*" utilizando glicerol bruto como agente redutor

O esquema geral para a síntese das AuNPs pelo método one-pot utilizando CG é mostrado na Figura 20 enquanto os detalhes das condições experimentais utilizadas são apresentados na Tabela 2. Tipicamente, foram utilizados diferentes volumes (0,5–2,0 mL) de CG diluído para 50 mL com solução de NaOH num tubo de plástico polipropileno para se obter a solução básica de glicerol (solução A) de diferentes concentrações (0,1–0,4 mol L^{-1}). O pH da solução de glicerol foi variado utilizando solução de NaOH de diferentes concentrações (0,1–0,4 mol L^{-1}). Depois adicionou-se 2 mL desta solução básica de glicerol (solução A) a uma mistura (solução B) consistindo de 5 mL de agente estabilizante (PVP ou PDAC, ambos 1%) e 5,0 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}) num tubo de polipropileno, o que resultou na formação de AuNPs como indicado pelo aparecimento da cor rosa avermelha. Após completar a formação das AuNPs, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos e 13.000 rpm durante 30 minutos para remover o excesso de surfactante.

Figura 20 - Esquema geral para a preparação das AuNPS utilizando CG como agente redutor e PVP ou PDAC como agentes estabilizantes. A letra M significa concentração em mol L^{-1}.



Fonte: Autoria própria

2.4. Síntese de AuNPs livres de ligantes (Ligand-Free synthesis) e utilizando glicerol para atuar parcialmente como agente redutor e parcialmente como estabilizador

Os detalhes das condições de síntese das AuNPs utilizando glicerol como agente redutor-estabilizador estão apresentados na Tabela 3. Num procedimento típico, as AuNP foram preparadas adicionando-se 2 mL de glicerol puro (99,5%, d = 1,26 g mL^{-1}) ou uma mistura de glicerol-água, com 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}), esta mistura foi vigorosamente agitada. Em seguida, adicionou-se 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}) e agitou-se a mistura suavemente para misturar os reagentes. A cor rosa avermelhada aparece em 1 minuto apos misturar todos os reagentes, mostrando que o Au^{3+} foi reduzido para Au^0 com a consequente formação das AuNPs.

Tabela 2 - Condições de síntese das AuNPs utilizando CG em meio alcalino; a quantidade de $HAuCl_4$ era de 3,75 x 10^{-3} mmoles e a temperatura era de 25 °C em todos os experimentos. Todas as concentrações nesta Tabela são as concentrações iniciais e o volume total da mistura reacional foi fixado em 12 mL em cada caso.

Parameter	**Glycerol (mol L^{-1})**	**NaOH (mol L^{-1})***	**PVP % (m/v)**	**PDAC % (m/v)**
Efeito de PVP	0,2	0,3	0,03, 0,05, 1,0, 1,3	-
Efeito do Glicerol	0,1, 0,2, 0,3, 0,4	0,3	1,0	-
Efeito do NaOH	0,2	0,1, 0,2, 0,3, 0,4	1,0	-
Efeito do PDAC	0,2	0,3	-	0,03, 0,05, 1,0, 1,3
Efeito do NaOH	0,2	0,1, 0,2, 0,3, 0,4	-	1,0

*concentração de NaOH utilizada na preparação da solução de glicerol para ajustar o pH

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Condições de síntese das AuNPs utilizando glicerol em meio alcalino como agente redutor e estabilizador. Todas as concentrações nesta Tabela são concentrações iniciais e o volume total da mistura reacional foi fixado em 3,04 mL em cada caso. A concentração de $HAuCl_4$ foi constante (7,5 x10^{-4} mol L^{-1}, 1 mL) em todos os casos.

Parâmetros	**Glicerol (mL)**	**Água (mL)**	**NaOH (0,04 mL)**	**Temperatura (°C)**
Razão glicerol/agua	2	0	0,2 mol L^{-1}	25
	1,5	0,5	0,2 mol L^{-1}	25
	1	1	0,2 mol L^{-1}	25
	0,5	1,5	0,2 mol L^{-1}	25
Temperatura	2	0	0,2 mol L^{-1}	10, 25, 40, 60
NaOH	2	0	0,05–0,3 mol L^{-1}	25

Fonte: Autoria própria

2.5. Técnicas de caracterização

2.5.1. Análise de espectroscopia UV/Visível (monitoramento da formação das NPs)

A formação de AuNPs, AgNPs e AuNRs foi monitorizada por espectroscopia de absorção eletrônica na região de 300–1200 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis-NIR (Shimadzu) ou um espectrofotômetro V-630 UV-Vis (Jasco, EUA) (300–800 nm). A estabilidade coloidal das AuNPs preparadas em função da temperatura foi avaliada por aquecimento da suspensão das AuNPs a diferentes temperaturas (entre 25 e 100 °C) durante 10 minutos ou 30 minutos e tirando os espectros na região UV-Vis.

2.5.2. Análise de microscopia eletrônica (tamanho e morfologia das NPs)

A distribuição de tamanho das NPs e a morfologia das NPs preparadas (AuNPs, AgNPs e AuNRs) foram estudadas usando microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (FEG-MEV). As imagens de MET foram

obtidas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão ((G2F20, FEI TECNAI) operado a uma tensão de aceleração de 200 kV e equipado com um detector de raios-X do tipo dispersivo-por-energia (EDX). Para o estudo de MET, as amostras foram preparadas por *drop-casting* de 10 μL da suspensão das AuNPs sobre uma grade de cobre revestida com carbono (CFC-200Cu, Electron Microscopy Sciences, EUA). As imagens de FEG-MEV foram obtidas utilizando um microscópio Inspect F-50 (FEI, Nederland) a uma tensão de aceleração de feixe de eletrons de 15 kV. As amostras foram depositadas a partir de uma suspensão aquosa diluída na forma de uma camada fina sobre placas de silício monocristalino e deixadas secar sob condições ambientais. O diâmetro médio das AuNPs foi calculado medindo o diâmetro de pelo menos 200 AuNPs a partir das imagens TEM e FEG-SEM.

Antes de preparar as amostras para análise por FEG-MEV e MET, as suspensões de AuNPs e AuNRs foram bem dispersas por sonicação. A razão de aspecto (AR = comprimento dividido pela largura) de AuNRs foi calculada medindo o comprimento e a largura de pelo menos 200 AuNRs a partir das imagens MET e FEG-MEV. Os histogramas mostrando a distribuição de largura, comprimento e ARs foram assim obtidos. O desvio padrão (± DP) de ARs relatado nesta tese representa a largura de distribuição dos ARs, ou polidispersidade. O rendimento percentual (%) foi obtido medindo o número de AuNRs como fração do número total de partículas de todas as formas observadas nas imagens de MET e FEG-MEV utilizando a seguinte fórmula (123):

$$Rendimento\ de\ AuNRs\ (\%) = \frac{\text{número de AuNRs}}{\text{número total de partículas (AuNRs + outras formas)}}\ x\ 100$$

2.5.3 Medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) (análise da distribuição de tamanho de partícula)

A distribuição de tamanho de partícula (por número) também foi medida por técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS do Dynamic Light Scattering) utilizando o sistema DLS de Zetatrac (Microtrac, EUA) equipado com um laser de diodo emissor de 780 nm. O tempo de execução e o número de ciclos utilizadas para cada medida da amostra foram de 60 s e 3 ciclos, respectivamente.

2.5.4. Análise por difração de raio X (DRX) (fase cristalina e tamanho de cristalito)

Os difratogramas de raios-X das nanopartículas metálicas foram registados na faixa de 2θ de 10–90° a uma varredura de 0,5° min^{-1} com um difractômetro Rigaku Rotaflex RU-200 (Japão) utilizando radiação de raios-X de Cu-Kα (λ= 0,1540 nm). O tamanho dos cristalitos foi estimado utilizando a fórmula de Scherrer, $D = 0{,}9\lambda/\beta\cos\theta_B$, (124) com base no alargamento dos picos de difração nos difratogramas de raios-X, onde D é o tamanho médio de cristalito (em nm), λ é o comprimento de onda do raio-X (0,1540 nm), β é a largura a meia altura do pico (em radianos) e θ_B é o ângulo de Bragg obtido dividindo-se por 2 o valor 2θ do pico correspondente.

2.6. Análise do glicerol bruto (Crude Glycerol (CG))

2.6.1. Análise por HPLC (determinação do teor de glicerol e nível de impurezas)

O teor de glicerol das amostras de CG foi analisado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu) equipada com uma bomba (LC-10ADVP), auto amostrador (SIL-20A HT), forno de coluna (CTO-20A) a 43°C , Detector de índice de refração (RID-10A), controlador de sistema (SCL-10AVP) e uma coluna Aminex HPX-87H (300 mm, 7,8 mm, BioRad). Utilizou-se uma solução aquosa de H_2SO_4 (5 mmol L^{-1}) como fase móvel. Para análise por HPLC, 35,2 mg de amostra filtrada de CG foram diluídos para 25 mL num balão volumétrico e injetados no HPLC. O teor de glicerol (X) da amostra foi obtido comparando a área do pico de glicerol a um tempo de retenção de 16,1 min no cromatograma com o de uma série de padrões obtidos nas mesmas condições utilizando uma curva de calibração. O teor de glicerol (X) foi calculado utilizando a fórmula: $X = Y - C/S$, onde Y é a área do pico da amostra, S é a inclinação e C é a intercepção da curva de calibração. O teor de glicerol na amostra CG-73 assim obtido a partir da análise por HPLC foi de 73% (9,8M).

2.6.2. Cromatografia de troca iónica (análise de cátions)

O teor de sódio e potássio do CG foi determinado usando um Cromatógrafo de troca iónica, IEC (*ion exchange chromatograph* do Inglês), (Metrohm) equipado com uma coluna (Metrosep-C4-150/4,0) e um detetor de condutividade. Utilizou-se como fase móvel uma solução aquosa de ácido nítrico/ácido dipicolônico (ácido 2,6-

piridinodicarboxílico) com pH ajustado entre 2 a 7. Utilizou-se a fase estacionária com base em gel de sílica com grupos funcionais carbonilo e tamanho de partícula de cerca de 5 µm. O fluxo da fase móvel foi mantido a 0,9 mL min^{-1}. Para a análise por IEC, a amostra filtrada de CG foi diluída para 10 mL com a fase móvel e injetada no IEC. O teor de sódio ou de potássio (X) da amostra foi obtido comparando a área dos picos no cromatograma com a de uma série de padrões obtidos nas mesmas condições usando uma curva de calibração. O teor de sódio e potássio (X) foi calculado utilizando a fórmula: X = Y - C/S, onde Y é a área do pico da amostra, S é a inclinação e C é a intercepção da curva de calibração. Verificou-se que a concentração de sódio e potássio na amostra de CG-73 era de 4,6% (p/v) e 0,33% (p/v), respectivamente.

2.6.3. Titulação Karl Fischer (determinação do teor de água)

O teor de água das amostras de CG foi determinado por titulação volumétrica de Karl Fischer (KF) utilizando o titulador Titrino 870 KF Plus (Metrohm, Suíça). Utilizou-se o Hydranal® composito-5 como reagente KF. Antes da determinação de água em amostra do CG, determinou-se o fator (F) de equivalência de água (F = mg de água que reage com 1 mL de reagente KF) de composito-5 contra a quantidade conhecida de água pura e verificou-se que o F era de 4,58 mg mL^{-1}. O teor de água (W), determinado pela fórmula W = F x V, onde V é o volume usado do reagente KF, foi de 17,8±1,4% (CG-73) e 3,5±0,1% (CG-65).

2.6.4. Análise por RMN, FTIR e GC-MS (impurezas orgânicas)

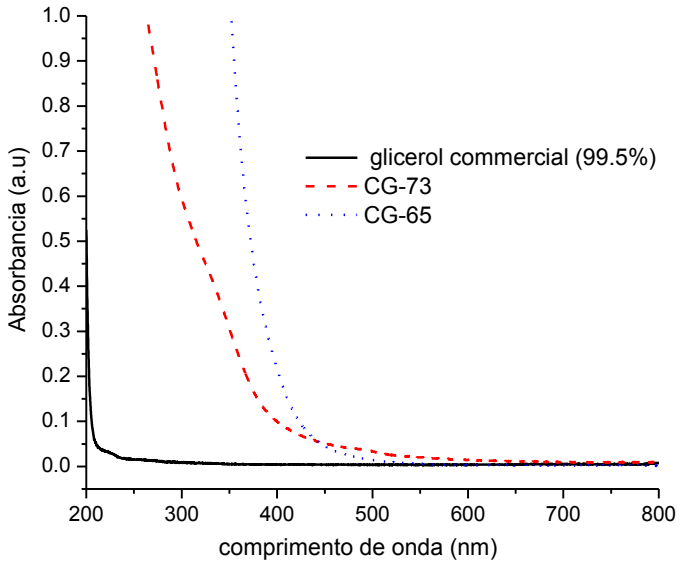
Para caracterizar o glicerol e as possíveis impurezas presentes no mesmo, foi realizada a análise de FTIR, RMN e GC-MS (Cromatógrafo de Gás acoplado a um espectrômetro de massa). Os espectros FTIR na faixa de 400–4000 cm^{-1} com na resolução espectral de 4 cm^{-1} foram adquiridos utilizando um espectrofotómetro MB-102 (Bomem, Canadá). Os espectros de RMN de ^{13}C das amostras de glicerol foram adquiridos com um espectrofotômetro 400 MHz de RMN (Agilent Technologies 400/54) a 25°C. A análise GC-MS da amostra do CG foi realizada utilizando a técnica hifenização de GC-MS empregando-se o equipmento GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu)

equipado com coluna MS-5 (30m x 0,2mm). A programação da temperatura foi feita mantendo a temperatura a 80 °C durante dois minutos e depois aumentou de 80 °C para 300 °C a uma velocidade de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

2.6.5. Outras caracterizações

Determinou-se a densidade da amostras de CG medindo a massa de um dado volume da amostra e verificou-se valores de 1,25 e 1,03 g mL^{-1} para amostra CG-73 e CG-65, respectivamente. O pH das amostras de CG foi cerca de 10±1 e as amostras tinham uma cor amarelada com absorção significativa abaixo de 450 nm (Figura 21).

Figura 21 - Espectro UV-Visível de glicerol puro (curva preta), CG-73 (curva vermelha) CG-65 (curva azul)



Capítulo 3

Preparação de nanobastões de ouro (AuNRs) utilizando o método glicerol de baixo custo e ambientalmente seguro

3. Preparação de nanobastões de ouro (AuNRs) utilizando o método glicerol de baixo custo e ambientalmente seguro

Introdução ao Capítulo

Entre os diferentes tipos de nanopartículas, nanobastões de ouro (AuNRs) vem atraindo recentemente grande atenção devido às suas propriedades óticas dependentes de tamanho que permitem a sua aplicação no diagnóstico e tratamento de doenças, em sensores, imagens e como agentes terapêuticos térmicos, entre outros. Assim, métodos reprodutíveis, de baixo custo, mais fáceis e mais ecológicos para a preparação de AuNRs são bastante importantes. Baseado nesta ideia, foi desenvolvido um método *one-pot* que é simples e mais seguro para a preparação de AuNRs monocristalinos com alto rendimento. O método foi criado com base no uso de glicerol em meio alcalino como agente redutor ajustável e CTAB e $AgNO_3$ como agentes de controle de morfologia. Este é o primeiro relato sobre a utilização de glicerol na preparação de AuNRs utilizando o glicerol e com um rendimento tão elevado (~100%). O método permite controlar o rendimento (% de AuNRs em relação aos outros tipos/forma de AuNPs) e a razão do aspecto do AuNRs, simplesmente variando os parâmetros experimentais como pH, concentração de $AgNO_3$ ou temperatura de reacção.

Palavras-chave: Nanobastões de Ouro, Nanopartículas de Ouro, Glicerol, CTAB, Ouro monocristalino, Síntese verde.

3.1. Formação de AuNRs utilizando glicerol

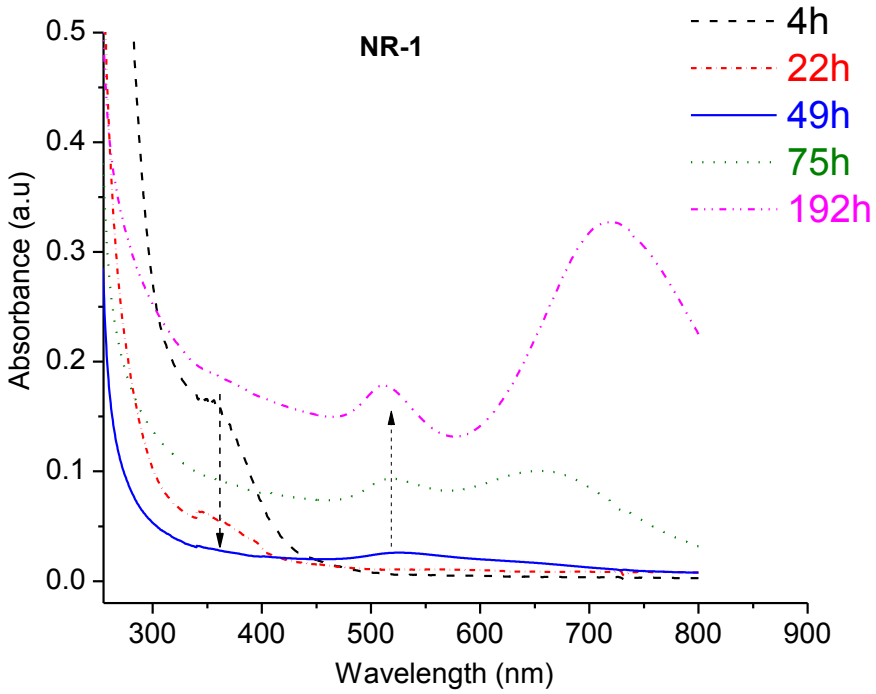
Os espectros UV-Vis-NIR da amostra NR-1 foram retirados em diferentes intervalos de tempo após a preparação. Estes espectros podem ser observados na Figura 22. A solução de $AuCl_4$-CTAB antes da adição de glicerol tem uma cor característica alaranjada e possuí um pico de absorção em torno de 395 nm (linha tracejada em preto). Este pico de absorção está relacionado com o complexo $[AuBr_4]^-$ que é formado pela reação de troca de ligantes entre o $[AuCl_4]^-$ e o CTAB (125). Após a adição do glicerol à solução de $AuCl_4^-$–CTAB, a banda de absorção situada em 395 nm diminui gradualmente (como indicado com a seta na Figura 22) com uma correspondente diminuição da cor laranja da solução até que a solução da mistura se torne incolor conforme a adiçao de glicerol. Isto é seguido pelo aparecimento de

uma nova banda (banda LSP_T, do Localized Surface Plasmon (Transverse) do ingles) em torno de 520 nm (indicada com uma seta para cima), confirmando a formação de nanoesferas de ouro (45). Verifica-se que sob as condições de redução suaves utilizadas na síntese da amostra NR-1, a redução dos íons Au^{3+} para Au^{1+} ocorre primeiro, como indicado com formação da solução incolor (126). Os ions Au^{1+} são então reduzidos a átomos metálicos de Au conduzindo assim a formação de nanoesferas de ouro (AuNPs) como indicado pelo aparecimento da cor rosa e absorção da solução acontece em torno de 520 nm. Essas nanoesferas atuam como *semente* internas (*internal seed*). Esta partículas de semente crescem então a partir de átomos metálicos da solução.

A Figura 22 mostra que o aparecimento da banda LSP_T é acompanhado pelo aparecimento da banda LSP_L (Localized Surface Plasmon (Longtudinal) do inglês) em torno de 661 nm (curva verde) indicando a formação de AuNR curtos de ARs menores. Estes AuNRs curtos crescem gradualmente (com um AR de 3,6 ± 1,1, como confirmado pelos resultados de TEM (Figura 23) e sua correspondente banda LSP ocorre em torno de 720 nm (curva rosa). O crescimento de AuNRs é lento sob as condições do experimento (ver Tabela 1). Isso é explicado pelo fato do glicerol ser um ácido muito fraco (*p*Ka = 14,16) e, a um pH de 11–12, a desprotonação do glicerol para formar a espécie de alcóxido carregado negativamente ($-CO^-$) ocorre apenas parcialmente.

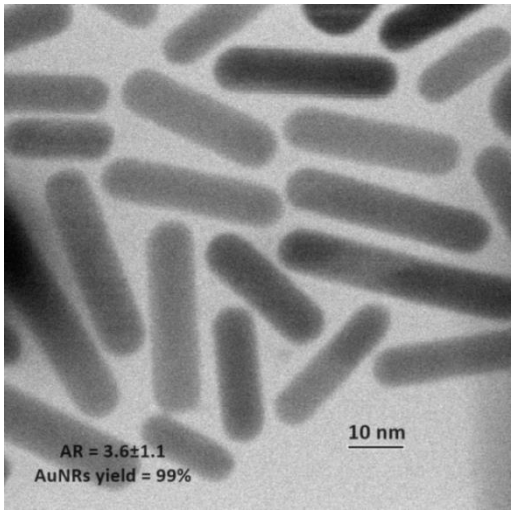
Uma vantagem desta formação lenta de Au metálico na mistura reacional é que os AuNRs são formados em elevado rendimento e seletividade morfologica, assim o rendimento de nanoesferas é reduzido quase a zero. As imagens de TEM da amostra NR-1 (Figura 23) mostram a formação de AuNRs de AR de 3,6±1,1 em rendimento elevado (~ 99%) sob estas condições de redução suaves à temperatura ambiente (25 ° C). Este alto rendimento de AuNRs é uma característica notável deste método baseado em glicerol e é comparável ao método mediado por sementes (*seed-mediated method* do inglês) relatado anteriormente (55). Até onde sabemos, não houve relato na literatura sobre a síntese de AuNRs em tão alto rendimento usando glicerol como agente redutor à temperatura ambiente.

Figura 22 - Espectro de UV–Vis–NIR da amostra NR-1 preparada a temperatura ambiente (25 °C) usando glicerol (0.1 mol L^{-1}) em NaOH 0.01 mol L^{-1} (ver Tabela 1)



Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

Figura 23 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) da amostra NR-1 preparada a temperatura ambiente (25 °C) usando glicerol 0.1 mol L^{-1} em NaOH 0.001 mol L^{-1}.



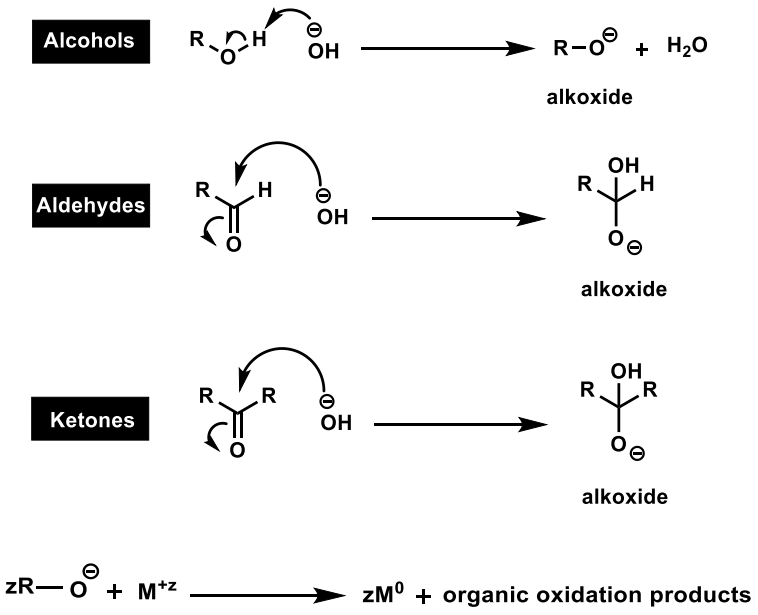
Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

Em relação ao mecanismo de formação de AuNRs através da redução de $HAuCl_4$ com glicerol, tem sido proposto que a espécie alcóxido é o agente redutor ativo (113,115) e a redução de Au^{3+} depende fortemente da formação deste ânion a partir do glicerol e, portanto, do pH da solução. De fato, Gomes *et al.* mostraram que outras moléculas (metanol, etanol, formaldeído, acetaldeído e acetona) contendo um grupo hidroxila ou qualquer outro grupo funcional (tal como o grupo carbonila) capaz de gerar grupos hidroxilas em meio alcalino é potencialmente capaz de reduzir os iõns Ag^+ ou Au^{3+} para NPs metálicas (115). No entanto, não são formados AgNPs ou AuNPs em meio neutro ou ácido, o que implica que condições alcalinas são imperativas para a desprotonação do grupo hidroxilo ou formação de radical alcóxido. O mecanismo de formação de Au metálico no método baseado em alcóxido consiste em duas etapas:

1ª etapa: Desprotonação do álcool em meio alcalino ou adição nucleofílica de íon OH^- ao grupo carbonilo, conduzindo ambos à formação de íon alcóxido (-C–O^-).

2ª etapa: Redução do sal metálico pelos alcóxidos gerados em NPs metálicas correspondentes. O mecanismo de formação de Au ou Ag metálicos é explicado na Figura 24 abaixo (115).

Figura 24 - Mecanismo de formação de íons alcóxidos por grupos alcólicos ou carbonilas e a redução dos ions metálicos em NPs metálicas.

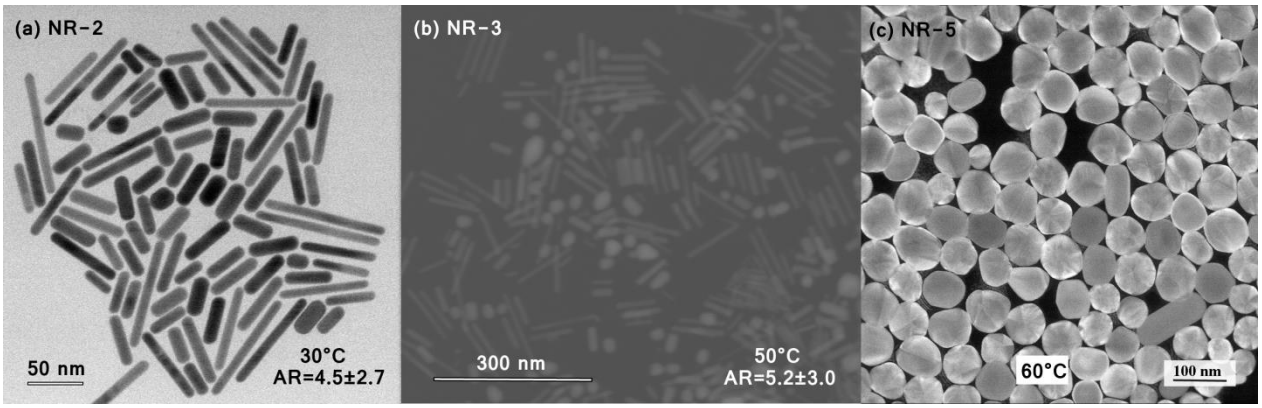


Fonte: adotado de Gomes et al. (2015) Ref. (115)

3.2. Efeito da temperatura

Foi estudado também como a temperatura influencia na formação das AuNRs. A Figura 25a mostra as imagens de MET da amostra NR-2 preparada a 30 °C. A NR-2 apresenta AuNRs com AR de 4,5±2,7 (Figura 25a e Figura 26) e com 98% de rendimento (Tabela 4). Os AuNRs NR-2 são portanto mais longos do que os NR-1 e o rendimento em % de NR-2 é ligeiramente inferior ao de NR-1. A banda de LSP correspondente situa-se entre 620-800 nm para esta amostra (Figura 27).

Figura 25 – Imagem de MET de campo claro da amostra NR-2 preparada a 30 °C (a), imagem de FEG-SEM da amostra NR-3 preparada a 50 °C (b) e imagem de MET de campo escuro da amostra NR-5 preparada a 60 °C.



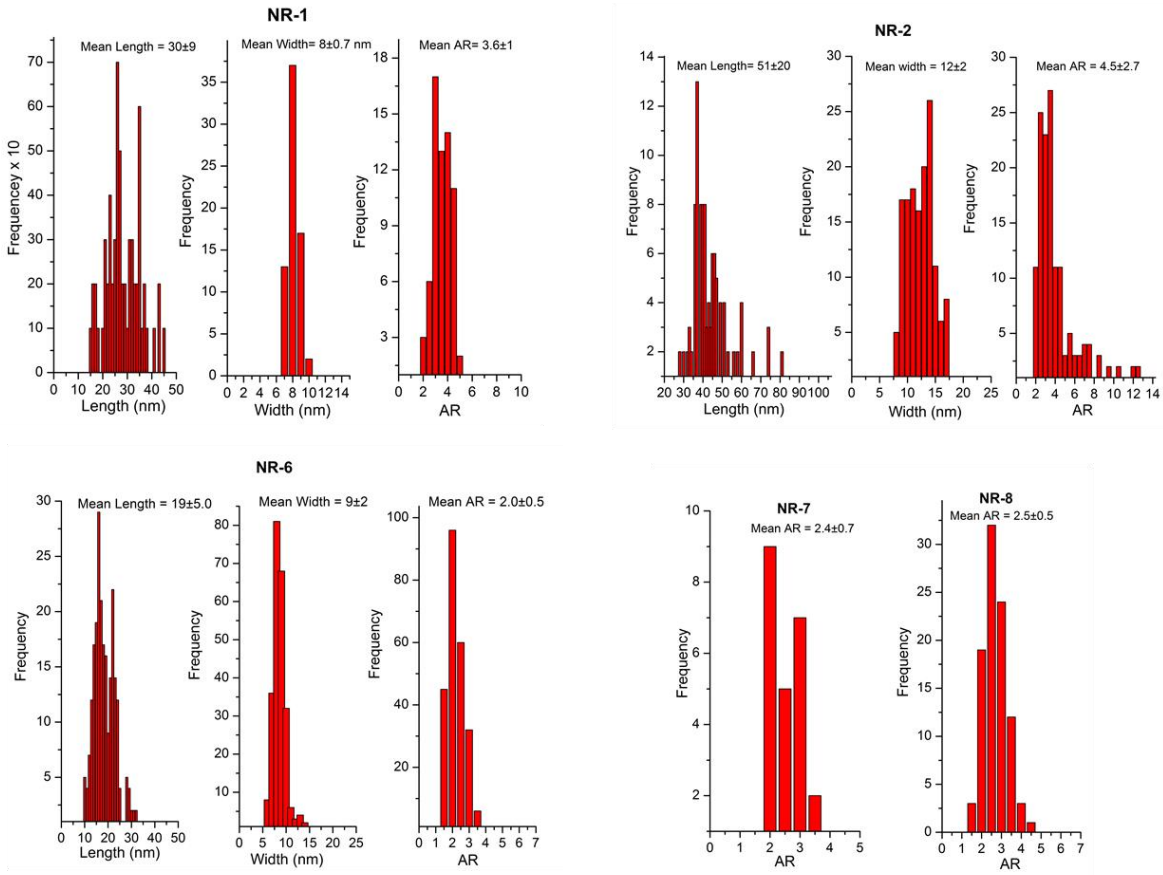
Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)).

A imagem de FEG-SEM da amostra NR-3 preparada a 50 °C mostra a formação de AuNRs com uma AR de 5,2 ± 3,0 (Figura 25b). A banda LSP destas AuNRs alongadas da amostra NR-3 estende-se desde a região visível para a NIR e situa-se entre 700–1200 nm (Figura 27). As AuNRs da amostra NR-3 são mais longas do que as das amostras NR-1 e NR-2 mas o rendimento em % da NR-3 é consideravelmente mais baixo (70 %) do que as de NR-1 e NR-2. O rendimento mais baixo pode ser devido a alteração na capacidade de ligação/adsorção superficial de CTAB a temperaturas mais elevadas.

Estes resultados corroboram um efeito da temperatura tanto na AR quanto no rendimento percentual de AuNRs. Entre 25 °C e 50 °C, quanto maior a temperatura, mais rápida é a reação de redução, maior é a AR e menor é o rendimeno percentual. Nota-se que o tempo

necessário para a formação de AuNRs é reduzido de 75h para 18h quando a síntese de AuNRs é realizada a 50 °C (NR-3). Uma possível explicação para isto pode estar relacionada com: (i) O aumento do transporte, devido à diminuição da viscosidade ou agitação térmica, das espécies Au^{1+}–CTAB ou $AuCl_4^-$ para as faces em crescimento da semente de Au formadas na solução e (ii) A redução de íons de ouro sobre faces em crescimento de semente. Tanto o processo (i) quanto o (ii) podem ser favorecidos por uma temperatura mais elevada.

Figura 26 - Histogramas da distribuição do tamanho de particulas, comprimento e largura para diferentes amostras de AuNRs.



Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

Uma vez que a temperatura do meio reacional é aumentada para 60 °C (NR-5), o rendimento de AuNRs é quase desprezível e só são formadas partículas decaédricas tipo esfera de 72 ± 11 nm (Figura 25c) que mostram apenas um pico de absorção em torno de 540 nm (NR-5 na Figura 27). Isto pode ser devido ao movimento rápido e aleatório das

espécies de solução para várias faces crescentes dos nanocristais de semente devido à agitação térmica assim como à variação no grau de adsorção preferencial de CTAB em faces específicas quando a temperatura é elevada para 60 °C. Como a adsorção de CTAB em faces específicas da espécie intermediária é importante para a formação de AuNRs (55), esse processo pode ser menos eficiente a temperaturas superiores a 50 °C, levando à formação de partículas esféricas, como também observado anteriormente (127). A forma da partícula resultante no método mediado por semente, além dos fatores termodinâmicos, também depende muito de fatores cinéticos, como taxa de crescimento de partículas, taxas de difusão, adsorção e dessorção (128), que por sua vez depende da temperatura. Com o aumento da temperatura, o resultado global é o crescimento rápido, aleatório e não preferencial de partículas, o que favorece a formação de partículas não cilíndricas.

Tabela 4 - Propriedades óticas, ARs e % de rendimento das AuNRs

codigo	**Banda TSP (nm)**	**Banda LSP band (nm)**	**AR**	**Rendimento**
NR-1	522	630—900	3,6±1,1	99
NR-2	515	620— 800	4,5±2,7	98
NR-3	517	650— above 1100	5,2±3,0	70
NR-4	532	650—above 11 00	5,8±2,4	27
NR-5	540	–	–	1
NR-6	528	614	2,2±0,4	42
NR-7	528	700	2,4±0,7	48
NR-8	528	714	2,4±0,5	41

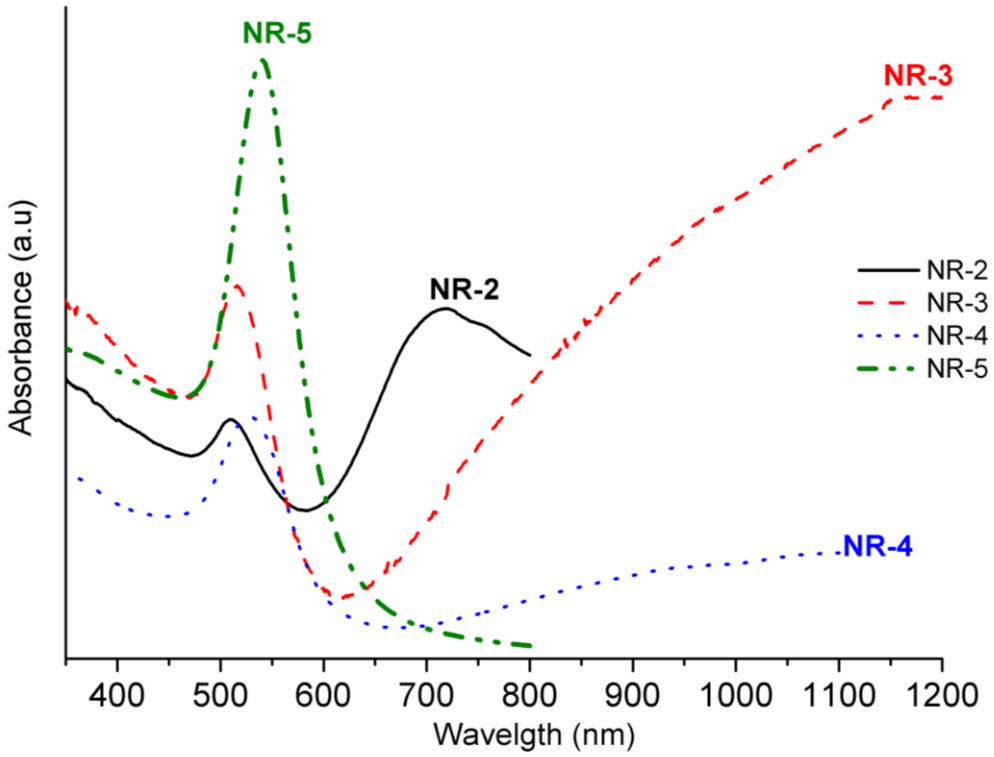
Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

A Figura 27 também mostra como a banda LSP pode ser encontrada entre 620 e 1200 nm controlando os parâmetros de síntese. Essa ampla gama de LSP é importante do ponto de vista das aplicações.

3.3. Efeito da concentração de $AgNO_3$

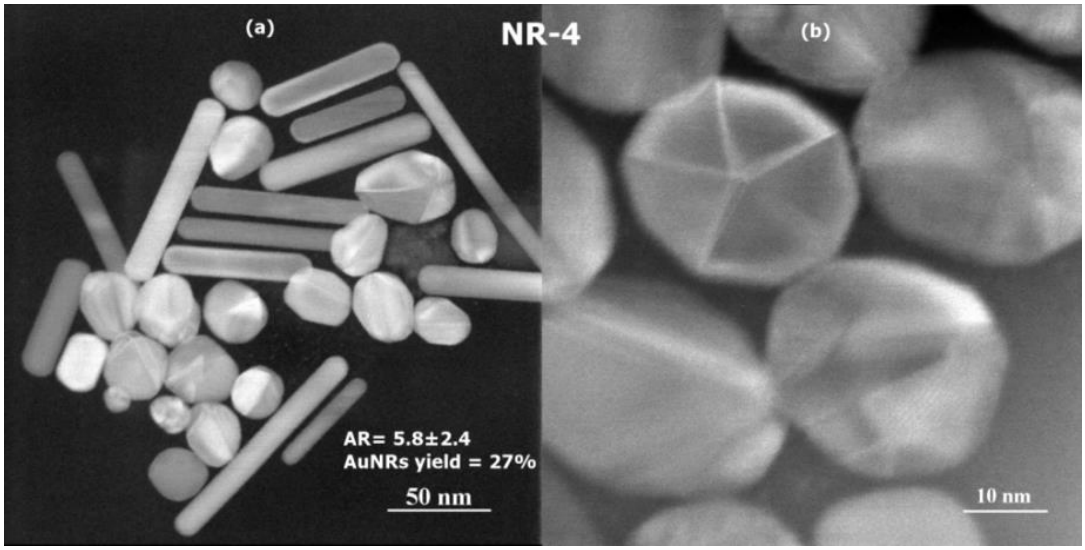
Também foi avaliado o efeito da concentração de $AgNO_3$ nas características das partículas sintetizadas a duas temperaturas diferentes (30 °C e 50 °C). Para a amostra NR-4, preparada a 50 °C, o volume de $AgNO_3$ foi aumentado de 0,15 mL para 0,30 mL. As AuNRs com AR de 5,8±2 foram produzidas com rendimento de 27% (Figura 28a). Além disso, a adição de maior teor de prata (0,30 mL) levou à formação de partículas esféricas decaédricas com um diâmetro médio de 28±4 nm (Figura 28b) que foram menos evidentes na amostra NR-3. Estas partículas decaédricas deslocam a banda TSP da amostra para cerca de 532 nm enquanto a banda LSP de baixa intensidade situa-se entre 650 nm e 1100 nm (Figura 27). Tais estruturas decaédricas e icosaédricas, encapsuladas pelas faces {111} (53) são comumente formadas por causa de sua menor energia (129). Com base nestes resultados, pode-se afirmar que $AgNO_3$ influencia na forma da partícula e no rendimento percentual dos AuNRs.

Figura 27 - Espectro de Absorção Eletrônica de diferentes amostras de AuNRs.



Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

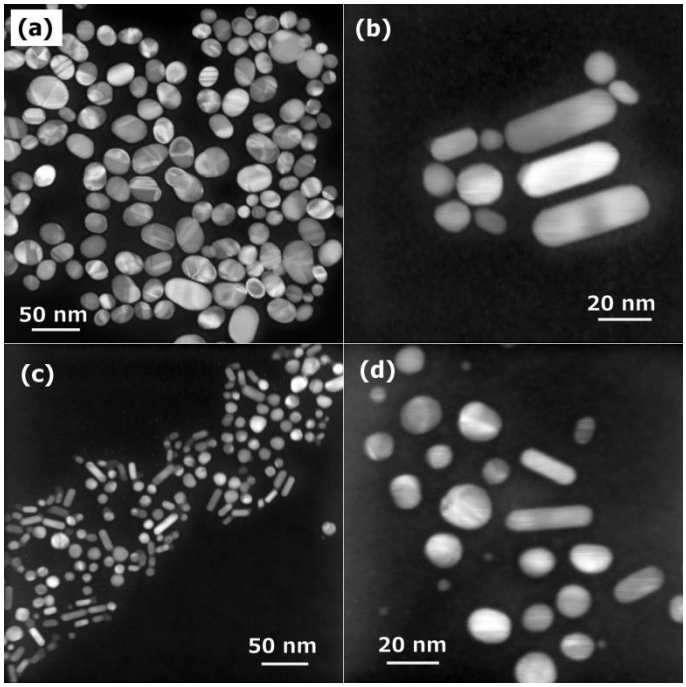
Figura 28 – Imagens de MET da amostra NR-4 (a) e imagem de MET apenas de partículas esféricas decaédricas da mesma amostra (b) preparada utilizando 0,3 mL de $AgNO_3$ 0,004 mol L^{-1}. O resto das condições experimentais foram semelhantes às da NR-3 (ver Tabela 1).



Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

O efeito do volume de $AgNO_3$ sobre o crescimento de partícula, AR e rendimento (%) foi estudado de forma mais sistemática variando o volume de solução de $AgNO_3$ (0,004 mol L^{-1}) adicionado na preparação da amostra NR-6; O restante das condições de síntese foram mantidos constantes (ver Tabela 1). A Figura 29 mostra as imagens de MET da amostra preparada com diferentes volumes de $AgNO_3$. Nenhuma formação de AuNRs foi observada na ausência de $AgNO_3$ (Figura 29a). Isso indica que o $AgNO_3$ desempenha papel fundamental na formação de AuNRs (55,98). A adição de $AgNO_3$ à mistura reacional levou à formação de AuNRs com rendimento variável dependendo do volume adicionado (Figura 29b-d). Acredita-se que os íons Ag^+ formam AgBr (Br^- vindo de CTAB), que não só restringe o crescimento ao forma de bastonetes mas também estabiliza os esferóides e as bastonetes formadas em solução (98). Também é possível que o AgBr insolúvel precipite deixando a parte CTA^+ livre para interação/adsorção com a superfície das partículas em crescimento, estabilizando-as. No entanto, tem sido proposto que o AgBr adsorve seletivamente sobre as faces {110} da partícula semente em crescimento, o que retarda o crescimento destas faces (98).

Figura 29 - Imagens de MET de campo escuro da amostra NR-6 preparada na ausência de $AgNO_3$ (a) e 0,1 mL (b) 0,25 mL (c) e 0,35 mL (d) de $AgNO_3$. A concentração de $AgNO_3$ foi de 0,004 mol L^{-1} em cada caso.

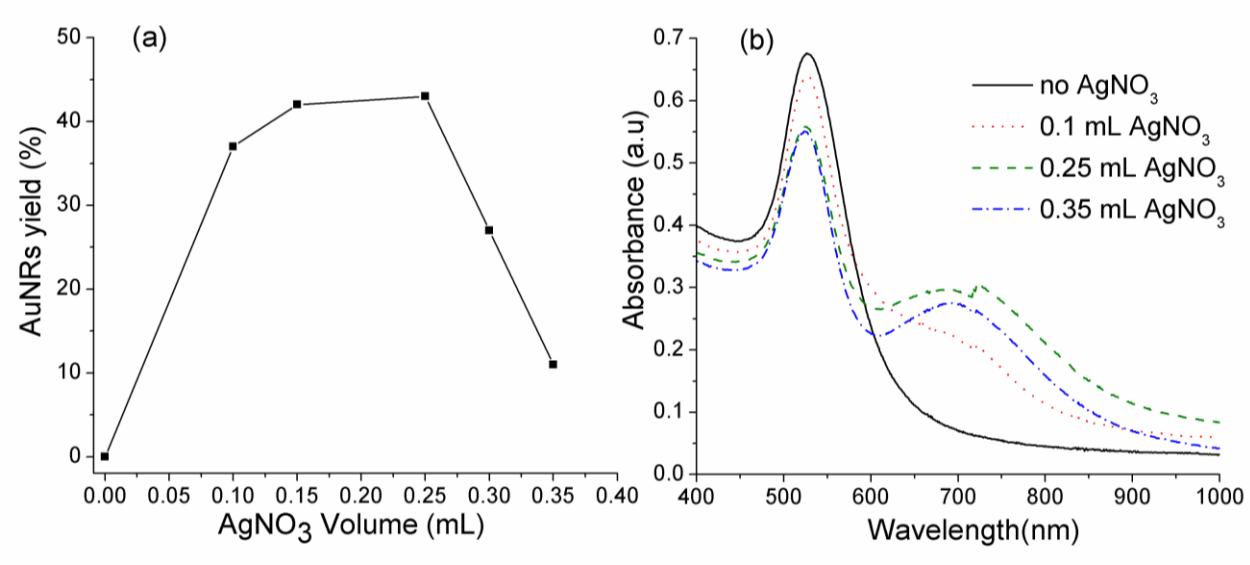


Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

Recentemente, foi proposto que a prata possa ser preferencialmente adsorvida nas faces {250} de energia mais elevada que são mais abertas e acessíveis para tal deposição (130). Em ambos os casos as faces {100}, sendo apenas parcialmente cobertas por prata, crescem predominantemente de forma que um crescimento unidimensional ao longo da direção [100] leva à formação de AuNRs (97,123,130), como as estudadas neste estudo (veja resultados de HRTEM frente).

O aumento de rendimento de AuNRs foi proporcional ao aumento do volume de $AgNO_3$ (0,004 mol L^{-1}) até 0,25 mL e depois diminuiu com aumento de volume de $AgNO_3$ (Figura 30a), de acordo com os resultados previamente relatados (55,131). Assim, apenas uma pequena quantidade de íons Ag^+ é necessária para a formação de AuNPs. Nikoobakht e colaboradores têm atribuído este efeito adverso de maior concentração de $AgNO_3$ sobre o rendimento e ARs de AuNRs ao aumento da força iónica que leva uma mudança na tamanho de micelas de surfactante (55).

Figura 30 - Mudança de rendimento percentual (%) (a) e espectros Vis-NIR (b) de amostras preparadas variando os volumes (mL) de $AgNO_3$ 0,004 mol L^{-1} na amostra NR-6.



Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

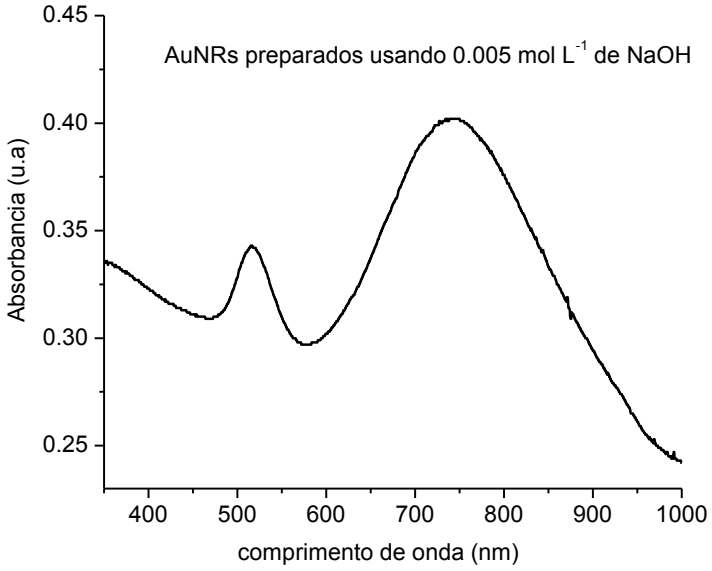
Sugere-se que quando usamos uma quantidade maior (> 0,25 mL) de $AgNO_3$ na síntese, a faces {250} pode ser completamente bloqueada por AgBr (123) e assim o crescimento ocorre predominantemente nas faces {100} e {111} que leva à formação de partículas esféricas (53,130). O rendimento das AuNRs é em torno de 10% para a amostra contendo 0,35 mL de $AgNO_3$ (Figura 30a). Sob as presentes condições experimentais, não se observou diferença significativa nas ARs (2,3±0,5) das AuNRs obtidas com diferentes volumes (0,1–0,35 mL) de $AgNO_3$. Os espectros electrônicos das amostras correspondentes são semelhantes devido as ARs semelhantes de cada amostra (Figura 30b).

3.4. Efeito da [OH] na solução de Glicerol

O glicerol é um álcool triol que possui dois grupos OH primários e um grupo OH secundário, sendo os grupos primários mais reativos do que o secundário. Assim, o grau de deprotonação do glicerol depende das condições experimentais, especialmente do pH do meio. Observamos acima que o crescimento de AuNRs foi lento (Figura 22) e o rendimento de AuNRs foi alto, em torno de 99% (Figura 23 e Figura 25a) sob o ambiente de redução suave (amostras NR-1 e NR-2). A solução de glicerol na síntese destas amostras foi preparada em NaOH 0,01 mol L^{-1} (pH~ 11–12). Também se obtiveram AuNRs quando a

concentração de NaOH utilizada na síntese foi mantida a 0,005 mol L^{-1} (Figura 31). Isto é explicado pelo fato de o glicerol ser um ácido muito fraco (*p*Ka = 14,16) e a um pH da solução de 11–12, a deprotonação de glicerol para formar a espécie de alcóxido ($-CO^-$) pode ocorrer apenas parcialmente. A espécie alcóxido é o agente redutor ativo (113,115) e a redução de Au^{3+} depende fortemente da formação deste anion a partir do glicerol e, portanto, sobre a [OH] da solução.

Figura 31 – Espectro UV-Vis-NIR da AuNRs preparada usando 0,1 mol L^{-1} de glycerol em solução de NaOH 0,005 mol L^{-1}. A presença da banda LSP indica a formação de AuNRs



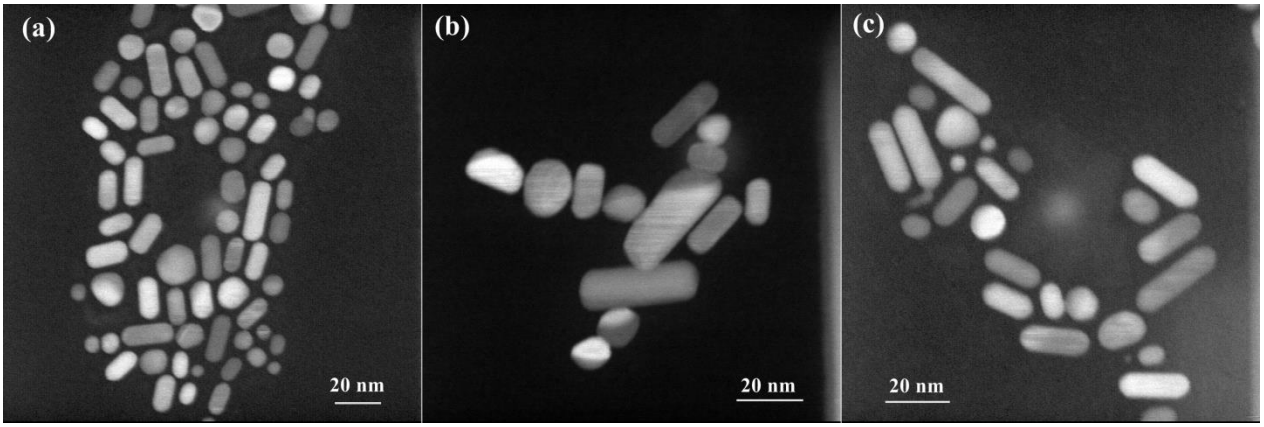
Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

É evidente que o pH da solução tem um papel decisivo na formação de nanopartículas metálicas. Assim, investigou-se o efeito do pH sobre o ARs e o rendimento percentual das AuNRs. A solução de glicerol (0,1 mol L^{-1}) foi preparada em soluções de 0,1, 0,2 e 0,3 mol L^{-1} de NaOH no caso de NR-6, NR-7 e NR-8, respectivamente. O pH da solução variou assim entre 12,0 e 13,5 nestas 3 amostras e a temperatura foi mantida constante a 30 °C.

A Figura 32 mostra as imagens de MET das amostras preparadas com solução de glicerol 0,1 mol L^{-1} na presença de diferentes concentrações iniciais de NaOH. Quando o pH da solução de glicerol aumentou de 12 para 13-13,5 (ou aumentando a concentração de NaOH de 0,01 mol L^{-1} para 0,1-0,3 mol L^{-1}), a formação de AuNRs começou dentro de 1h de reação, mais

rapidamente do que a pH 11. Mas tanto a AR quanto o rendimento (%) das AuNRs diminuíram (Tabela 4). Em particular, para amostra NR-6, NR-7 e NR-8, o valor médio de ARs era de cerca de 2,2–2,4 (Figura 32) e o rendimento está entre 40–50% (Tabela 4). Devido ao seu ARs pequeno, estas pequenas AuNRs absorvem na região visível abaixo de 800 nm (Figura 33). Estas pequenas AuNRs podem ser importantes para aplicações de deteção na região visível.

Figura 32 – Imagens de MET de campo escuro das amostras NR-6 (a), NR-7 (b) e NR-8 (c) preparadas com glicerol 0,1 M e diferente pHs; a solução de glicerol utilizada na síntese das amostras NR-6, NR-7 e NR-8 foi preparada em 0,1, 0,2 e 0,3 mol L^{-1} de NaOH, respectivamente. Todas as outras condições são semelhantes para as três amostras.

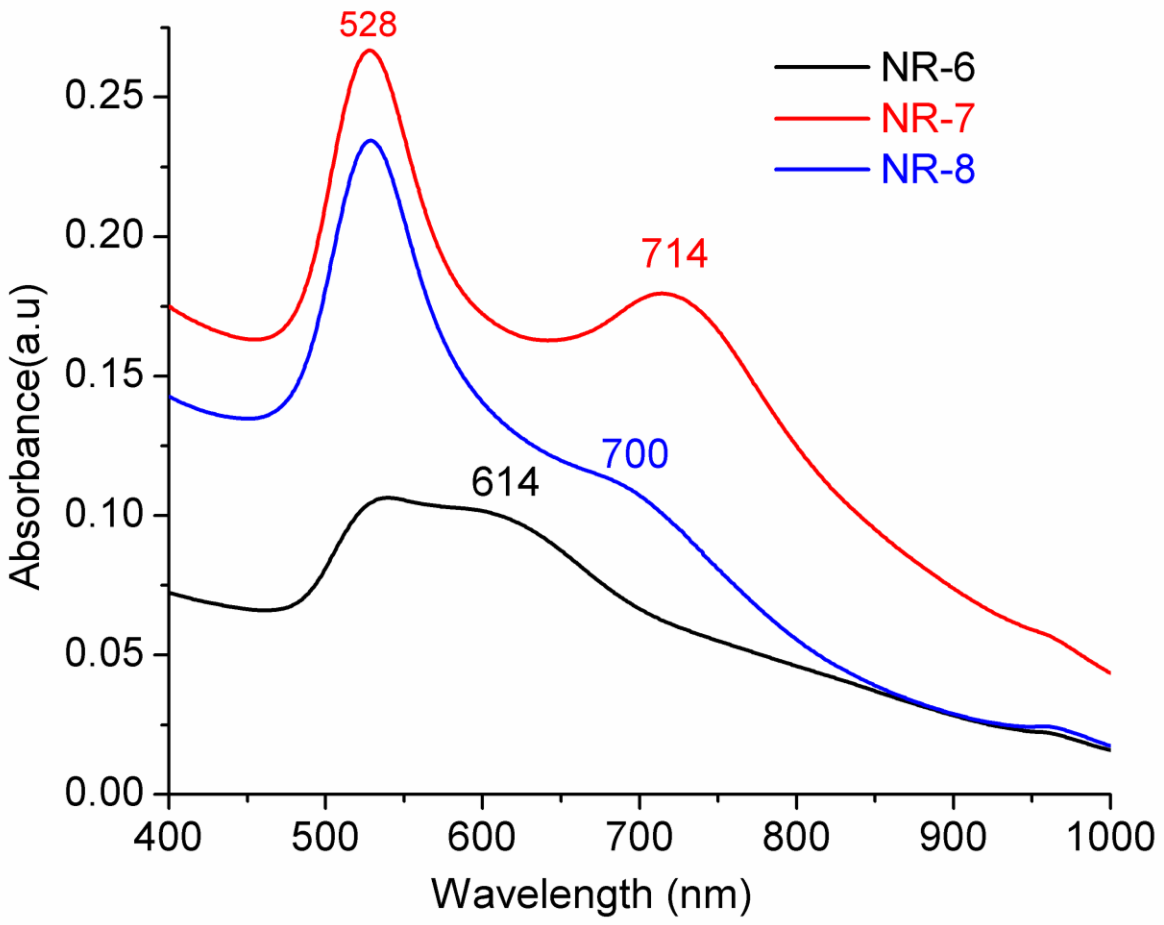


Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

A diminuição do rendimento percentual das AuNRs pode ser explicada com base no fato do glicerol atuar como agente redutor relativamente mais forte a um pH mais elevado (> 12). Neste caso, há uma rápida formação de um grande número de átomos de Au metálicos, que depositam aleatoriamente nas partículas de Au sem muita preferência por uma face especifica, produzindo assim partículas esféricas com rendimento maior do que a de pH 11. A AR diminui também porque o processo de deposição não é preferencial e, além de as faces {110} ou {250}, a deposição de átomos de Au em outras faces também pode ser favorecida devido à rápida formação de grande número de átomos metálicos. A alteração da força iônica total da solução pode ser outra razão para a diminuição do rendimento e ARs de AuNRs a concentrações mais elevadas de NaOH. A alteração da força iônica pode afetar o tamanho da micela do surfactante e, portanto, sua interação com as partículas em

crescimento (55). Estudando a formação de AuNRs sob diferentes condições de pH, verificou-se que a concentração de NaOH na preparação de solução de glicerol deve ser mantida entre 0,01–0,005 mol L^{-1} de modo a obter AuNRs puras (Figura 23 e Figura 31).

Figura 33 - Espectros Vis-NIR das amostras NR-6, NR-7 e NR-8, que diferem na quantidade de NaOH utilizada na preparação da solução de glicerol 0,1 mol L^{-1}. Todas as outras condições são as mesmas para as três amostras. O crescimento de AuNRs começa dentro de 1h sob estas condições experimentais.



Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

3.5. Estrutura Cristalográfica das AuNRs

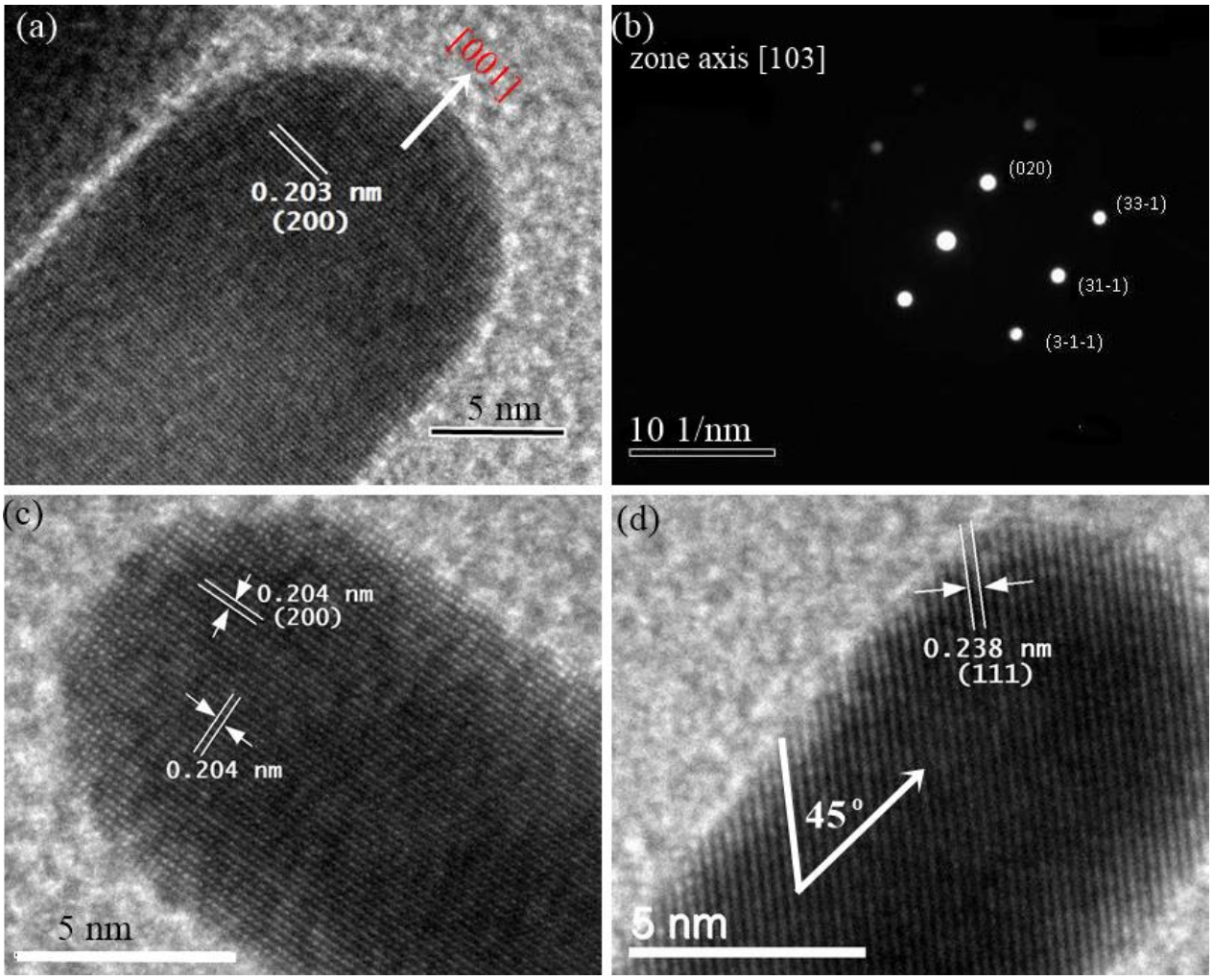
A estrutura cristalográfica das AuNRs depende do método de preparação (97), da estrutura cristalográfica de partícula semente (132) e da AR das AuNRs (53), podendo-se obter estrutura penta-geminada (133) ou estrutura monocristalina (53,96), com crescimento

preferencial na direção [001]. Geralmente, as AuNRs têm uma direção do crescimento axial ([001]) (53,96,130) e sua superfície é delimitada por faces laterais do tipo {250} (130) e faces terminais {110} e {111}. As partículas de ouro tipo esfera por sua vez são normalmente fechadas por faces {100} e {111} (53). A forma final das AuNRs depende de qual das quatro faces ({100}, {110}, {111}, {250}) cresce predominantemente (53,130).

A Figura 34 mostra os detalhes da análise de HRTEM da amostra de NR1. Nenhuma falha estrutural ou deslocamento foi observado e são vistos planos idênticos confirmando a estrutura monocristalina perfeita do tipo fcc das AuNRs (Figura 34a). A estrutura monocristalina de fcc das AuNRs é clara a partir do padrão de difração de elétrons (Figura 34b) registado com o eixo paralelo à direção [103] (consistente com o código ISCD 163723 ou 53764). A existência da estrutura monocristalina e a ausência de planos idênticos (twin planes) pode ser explicada considerando a presença de faces {250} de alta energia com estrutura mais aberta e flexível, como proposto por Carbó-Argibay e colaboradores (130). Essa estrutura aberta e flexível de faces {250} pode reduzir o estresse que resulta da estrutura monocristalina e que, de outra forma, leva à formação de planos idênticos.

A imagem de HRTEM das AuNRs (Figura 34a) obtida usando o feixe de elétrons perpendicular à direção de crescimento mostra os planos com distâncias interplanares (DIPs) de 0,203 nm que correspondem à família de planos {200} da estrutura fcc de Au (JCPDS # 65-2870, ICSD # 163723) (134). Como as AuNRs estão deitados na telas (grid) de MET (supporte), nem todas as orientações das AuNRs são acessíveis e apenas a familia de planos {200} é predominantemente observada na amostra como-depositada (*as-deposited*). As famílias de planos {111} e {200} foram predominantemente observadas nas AuNRs que ficam deitas na grid de TEM (96). A presença de faces {250} só pôde ser observada quando foram analisadas as AuNRs supportadas perpendiculares ao substrato (130). Mesmo após inclinar ligeiramente a amostra, pudemos observar os mesmos DIPs, 0,204 nm Figura 34c). O contraste de massa-espessura nas bordas mostra uma estrutura de nanopartículas cilíndricas com terminação arredondada ou esférica.

Figura 34 – Imagem de HRTEM (a) e padrão de difração de eletrons da amostra NR1 registrada com o eixo da zona paralela à direção [103] (b); HRTEM obtidas após inclinação da amostra (c, d). A direção de crescimento [001] é marcada em (a). A direção {111} de planos situa-se a cerca de 45° em relação à direção de crescimento

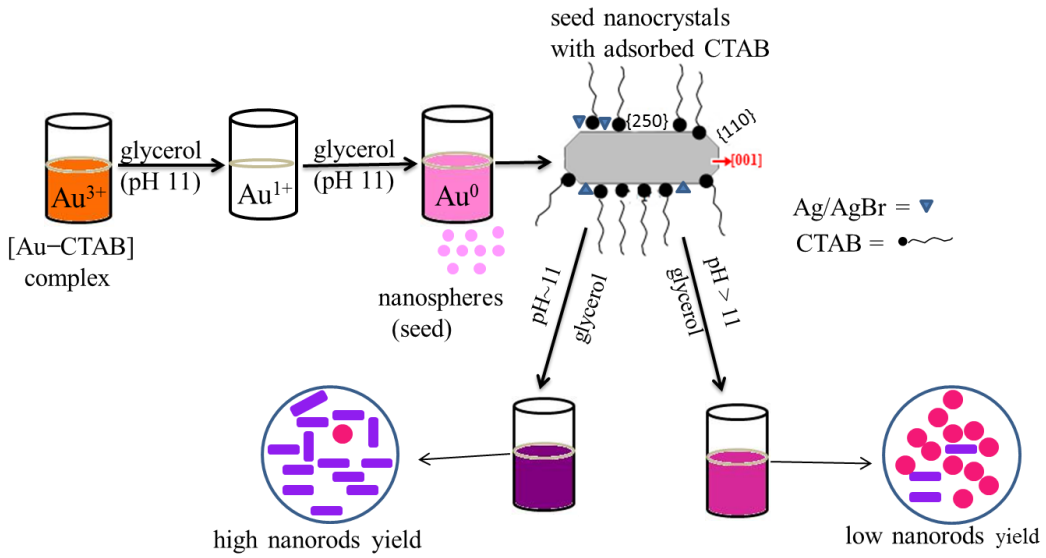


Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

Considerando [001] como a direção de crescimento, a familia de planos {111} com DIP de 0,238 nm pode ser observada no HRTEM num ângulo de 45° quando observada a partir da direção [110] (Figura 34d) Pode notar-se na Figura 34d que o ângulo entre a família de planos {111} e a direção de crescimento é de aproximadamente 45°. Isto só é possível se a direção de crescimento for [001]. Com base na Figura 34 a direção de crescimento é identificada como [001], de acordo com os estudos anteriores (53,130) (ver Figura 35).

A Figura 35 resume os resultados discutidos anteriormente, bem como as várias fases na formação de AuNRs. A adição de uma solução alcalina de glicerol a uma mistura de $HAuCl_4$ e CTAB conduz à redução dos ions Au^{3+} para Au^{1+}. Estes ions Au^{1+} são ainda reduzidos a átomos de Au metálicos que conduzem à formação de nanoesferas de Au (particlulas sementes) como indicado pelo aparecimento da banda de absorção em 520 nm na Figura 22. A estrutura cristalina da particulas semente é o fator mais importante na determinação da forma final da partícula (53,96,130,132,135). Quando estas partículas sementes crescem até um tamanho considerável, as faces de cristal começam a desenvolver-se devido a taxa de crescimento variável de diferentes planos de cristal e ligação preferencial de CTAB e AgBr a certas faces, levando à formação de esferas facetadas (126), que fornecem a base para a formação de AuNRs. CTAB, juntamente com Ag ou AgBr adsorvem-se preferencialmente nas faces {250} da partícula de ouro (130) e impede a deposição rápida de Au metálico sobre essas faces em comparação com as outras (55,128). Deste modo, o crescimento ocorre predominantemente na direção [001] (53,54,130) conduzindo à formação de AuNRs (Figura 35). O rendimento em porcentagem (%) de AuNRs depende do pH da mistura reacional, sendo o rendimento mais elevado a pH em torno de 11.

Figura 35 - Representação esquemática das várias fases da formação de AuNRs utilizando glicerol em meio alcalino como agente redutor.



Fonte: (Parveen et al. 2015, Ref (76)*).*

3.5. Conclusões

Devido às propriedades óticas dependentes do formato/forma das AuNRs, que são importantes para muitas aplicações, a formação de AuNRs é uma área de pesquisa ainda muito ativa. No presente estudo, relata-se pela primeira vez um método *one-pot* e sem semente (*seedless*) baseado na utilização de glicerol como agente redutor para a preparação de AuNRs. Demonstrou-se que a formação de partículas sementes e o crescimento das mesmas ocorrem na mesma solução, levando à formação de AuNRs na presença de CTAB e assim o número de passos necessários para a formação de AuNRs foi reduzido de dois para um. Não só substituímos $NaBH_4$ ou hidrazina pelo glicerol como um agente redutor mais ecológico e de baixo custo, mas também conseguimos a formação de AuNRs monocristalinos com rendimento muito elevado (~ 100%). O glicerol em meio alcalino atua como agente redutor ajustável e dependente do pH. A razão de aspectos (AR) e o rendimento de AuNRs mostraram uma clara dependência do pH e da temperatura da mistura reacional bem como da concentração de $AgNO_3$ adicionado como um reagente auxiliar. Mostramos como o ARs (2 a 6), o rendimento (22 a 99%) e a banda de absorção LSP (620 a 1200 nm) das AuNRs são controlados utilizando estes parâmetros de síntese. As AuNRs puras com quase nenhuma partícula esférica são obtidos à temperatura ambiente (25–30 °C) sob condições de crescimento de partículas lentas conseguidas usando ambiente de redução suave (pH 11–12). Com um pH mais elevado (pH 13–14) e a temperaturas superiores a 50 °C, a formação de AuNRs começa dentro de 1 hora de reação, mais rapidamente do que a pH 11, mas tanto a AR quanto o rendimento das AuNRs diminuem (27 a 50%). Uma pequena quantidade de $AgNO_3$ é necessária para a formação de AuNRs. A análise de HRTEM mostrou a formação de estrutura monocristalina perfeita do tipo fcc e sem quaisquer falhas estruturais e com [001] como direção de crescimento axial. A novidade do método de síntese de AuNRs relatado aqui consiste na simplicidade do método (sem instrumentos especiais, sem controle rigoroso da temperatura), alto rendimento das AuNRs (~99%), custo-eficácia (glicerol é um reagente químico de baixo custo e abundante e também ambientalmente seguro). Este novo método ecológico pode ainda ser melhorado para a síntese de AuNRs e outras nanopartículas metálicas utilizando glicerol como um reagente de baixo custo abundantemente disponível.

Capítuo 4

Síntese de nanopartículas monodispersas de ouro (AuNPs) usando glicerol bruto (CG) como um agente redutor verde e de baixo custo

4. Síntese de nanopartículas monodispersas de ouro (AuNPs) usando glicerol bruto (CG) como um agente redutor verde e de baixo custo

Introdução ao Capítulo

Este capítulo descreve a síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) quase monodispersas de cerca de 8 nm por um método verde empregando glicerol bruto (*crude glycerol* (CG)) como um agente redutor econômico e de baixo custo. Como prova de conceito, foram utilizadas para preparar AuNPs duas amostras distintas de glicerol cru (CG-65 e CG-75) com diferentes teores de glicerol (65% e 73%) e diferentes níveis (baixo e alto) e tipos (orgânicos e inorgânicos) de impurezas, como determinado por GC-MS, HPLC e IEC. O CG foi usado diretamente como obtido da usina de biodiesel, sem qualquer tratamento químico ou físico especial, exceto filtração simples. Para comparação, as AuNPs foram também preparadas utilizando glicerol comercial puro (99,5%) em condições idênticas. Foram obtidas AuNPs com tamanho e forma semelhantes em ambos os casos (glicerol comercial puro, bem como CG de conteúdo variável de glicerol e impurezas) indicando que o glicerol comercial pode ser substituído por CG na síntese de AuNPs e que as impurezas orgânicas e inorgânicas não afetam significativamente a distribuição de tamanho de partícula de AuNPs. Apresentamos uma discussão detalhada sobre o efeito de possíveis impurezas no CG, bem como parâmetros de síntese (pH, concentração de glicerol e concentração de estabilizador) na forma e distribuição de tamanho de partícula (PSD para *Particle Size Distribution*) das AuNPs. Verificou-se que a forma e PSD das AuNPs é controlada pela concentração de agente estabilizante (polivinilpirrolidona (PVP) e cloreto de polidialildimetilamónio (PDAC)), enquanto o número ou concentração de AuNPs depende do pH do meio reacional. Tanto o PVP quanto o PDAC, além de atuarem como agentes estabilizadores, também ajudam na redução de nanopartículas metálicas em meio básico. Este estudo abre novas possibilidades para a preparação ecológica de nanopartículas metálicas utilizando como agente redutor o CG, um reagente de baixo custo, não tóxico e biodegradável.

Palavras-chave: glicerol bruto, nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata, síntese verde

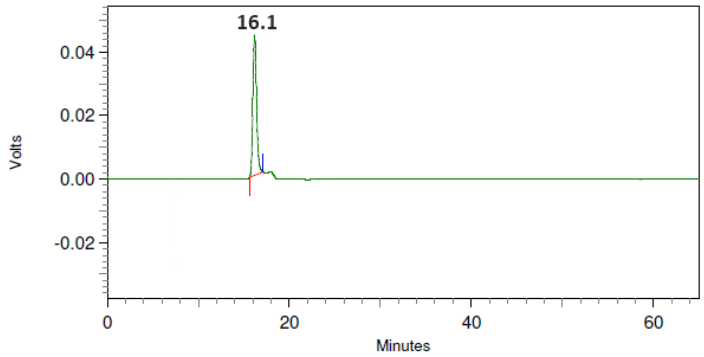
4.1. Caracterização de glicerol bruto (*crude glycerol* (CG))

Antes de empregar o CG na síntese de AuNPs, os dois tipos de CG (CG-65 e CG-73) foram detalhadamente caracterizados quanto ao teor de glicerol, impurezas orgânicas e inorgânicas, bem como em relação ao teor de umidade utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia de troca iônica (IEC) e técnica de titulação Karl-Fisher.

4.1.1. Análise por HPLC e GC-MS (teor de glicerol e impurezas orgânicas)

O teor de glicerol das amostras CG foi analisado utilizando as técnicas de HPLC e GC-MS. O teor de glicerol (X) da amostra de CG-73 foi determinado comparando área do pico de glicerol com um tempo de retenção de 16,1 min no cromatograma (Figura 36) com uma curva analítica construída a partir dos cromatogramas de uma série de soluções-padrão de glicerol obtidos nas mesmas condições. O teor de glicerol (X) foi calculado utilizando a fórmula: X = Y - C/S, onde Y é a área do pico da amostra, S é a inclinação e C é o intercepto da curva analítica. O teor de glicerol da amostra CG-73, assim determinado a partir da análise por HPLC, foi de 73% (9,8 mol L^{-1}). É importante notar que o cromatograma de HPLC da amostra CG-73 mostra um pico proeminente de glicerol e não apresenta quaisquer impurezas orgânicas significativas.

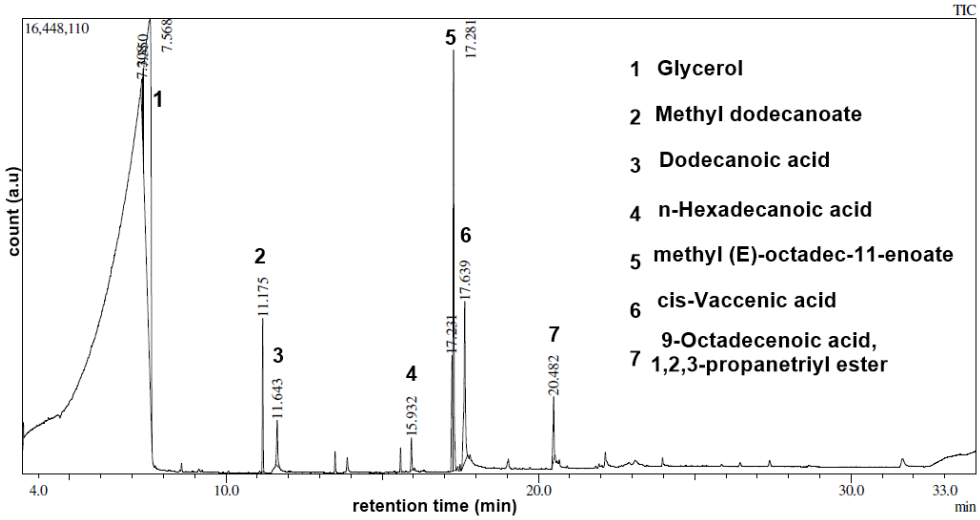
Figura 36 - Cromatograma de HPLC da amostra de CG-73 mostrando o pico de eluição de glicerol em 16,1 min.



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Por outro lado, a análise GC-MS da amostra CG-65 (Figura 37 e Figura 38) mostrou a presença de alto nível de impurezas orgânicas incluindo vários ácidos graxos (ácido dodecanóico, ácido n-hexadecanóico, ácido cis-vaccênico etc.) e ésteres (dodecanoato de metilo, (E)-octadec-11-enoato de metilo, etc.) como relatado na Tabela 5. O glicerol comercial (99-99,5% de Panreac) também apresentou a presença de uma pequena quantidade (~ 0,4%) de ácido cis-vacenico como impureza.

Figura 37 - Cromatograma gasoso da amostra CG-65. Os compostos responsáveis por estes picos, tal como identificados a partir de espectrogramas de massa (Figura 38) foram indicados no lado direito da Figura.



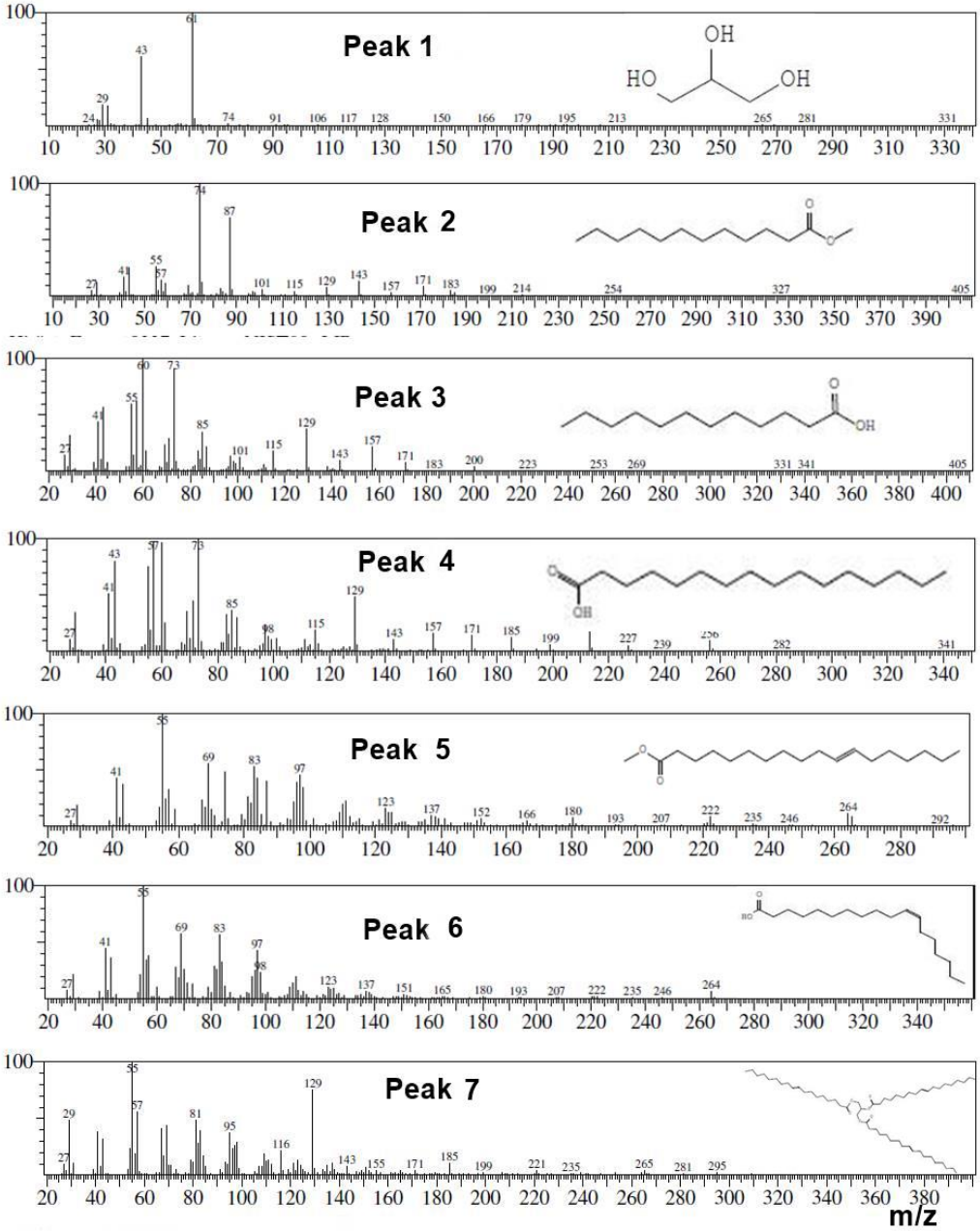
Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

4.1.2. Análise de RMN e FTIR (impurezas orgânicas)

As impurezas orgânicas presentes no CG foram também analisadas utilizando espectroscopia de RMN de ^{13}C e espectroscopia FTIR e são reportadas na Tabela 5 juntamente com outras propriedades físicas das amostras de glicerol. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39) do glicerol comercial (Panreac) apresenta dois sinais em 62,4 ppm e 72,0 ppm, que são atribuídos a átomos de carbono alifáticos primários e secundários, respectivamente. O espectro da amostra CG-73 mostra os mesmos picos na mesma posição que o glicerol comercial puro, não sendo observados picos adicionais. Isso indica a ausência

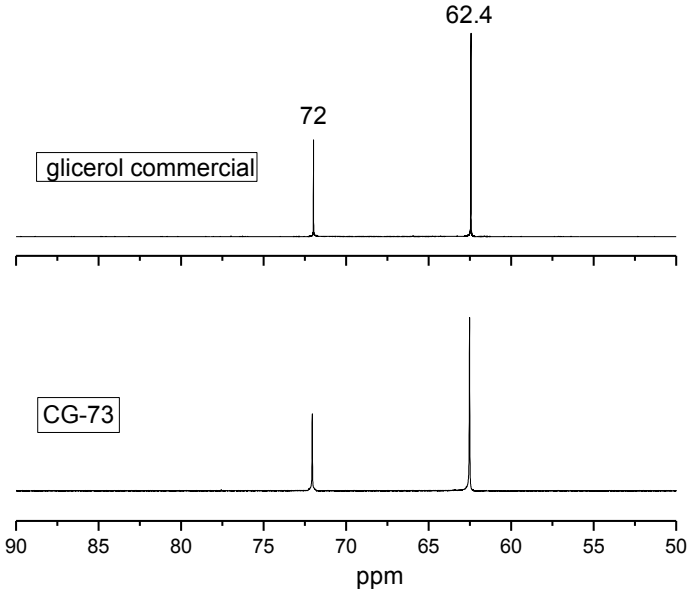
de uma quantidade significativa de impurezas orgânicas, como também sugerido pela análise de FTIR (Figura 40).

Figura 38 - Espectros de massas dos componentes separados na amostra CG-65. As estruturas químicas dos compostos correspondentes, como identificadas por MS, também são mostradas na Figura.



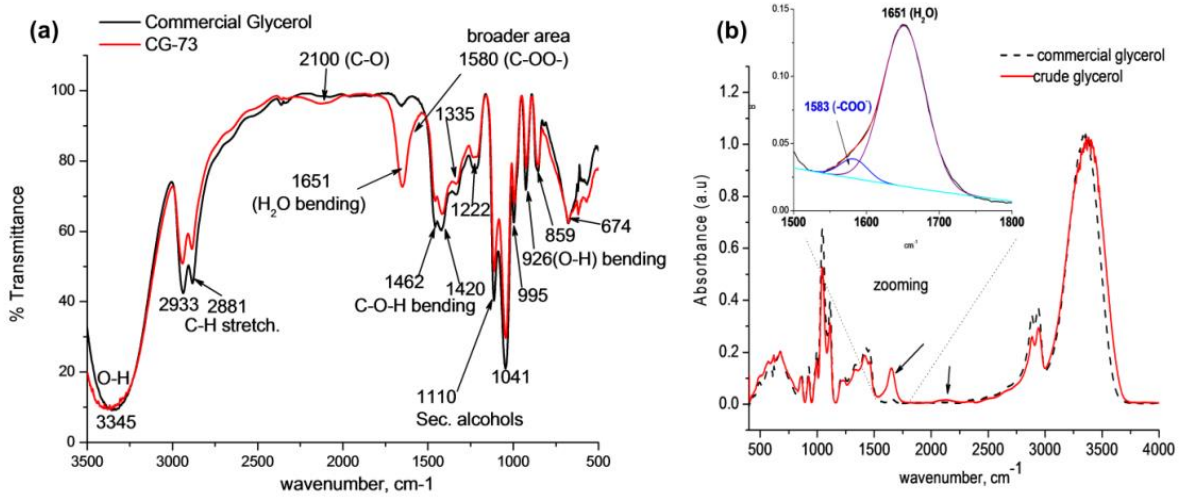
Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Figura 39 - Espectros de ^{13}C-NMR de glicerol comercial (acima) e CG-73 após filtração simples através de um filtro de 0,2 µm (abaixo).



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Figura 40 - (a) Espectro FTIR da amostra CG-73 em comparação com glicerol comercial (99,5%) e (b) o mesmo espectro em unidades de absorbância ampliado na região de 1500–1800 cm^{-1} , com o intuito de mostrar os detalhes das bandas nesta região (*inset*). Vários modos vibracionas são indicados na Figura.



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Os espectros de FTIR das amostras CG-73 e do glicerol comercial na Figura 40a são quase iguais e mostram picos em 3345 cm^{-1} (estiramento O–H), 2933–2881 cm^{-1} (estiramento C–H), 1652 cm^{-1} (deformação angular da H_2O) , 1420–1460 cm^{-1} (flexão C–O–H), 1110 cm^{-1} (estiramento C–O de álcoois secundários) e 926 cm^{-1} (deformação angular O–H). O espectro de FTIR de CG-73, no entanto, mostra uma banda mais proeminente e ampla centrada em 1651 cm^{-1}. Esta banda larga na região de 1500–1800 cm^{-1} pode ser resolvida em dois componentes, sendo o componente em 1583 cm^{-1} atribuído ao grupo funcional $–COO^-$ (Figura 40b). Assim, vestígios de ácidos graxos ou sabão podem estar presentes na amostra CG-73. A análise da amostra de CG-73 por espectroscopia de RMN e FTIR confirmou a ausência de qualquer quantidade significativa de impurezas orgânicas, com a exceção de traços de ácidos graxos ou sabão. Contudo, esta amostra contém uma quantidade significativa de sais e água como impurezas inorgânicas, tal como relatado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da caracterização das amostras de glicerol mostrando os parâmetros físicos e o nível de impurezas de amostras de CG em comparação com glicerol commercial

Sample	% glicerol	% agua	Densidade (g/mL)	pH	Impurezas organicas* e outras
Glicerol comercial	99,5	0,4±0,1	1,26	~5	cis-Vaccenic acid (0.48%)
CG-73	72,9	17,8±1,4	1,25	10±1	traces of fatty acid and soap, 7% salt
CG-65	65	3,5±0,1	1,03	10±1	Methyl dodecanoate (4%), Dodecanoic acid (1.8%), n-Hexadecanoic acid (1.1%), (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid (3,5%), Methyl (E)-octadec-11-enoate (13,6%), cis-Vaccenic acid (8,4%), 9-Octadecenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (2,3%)

*Percentagem relativa de impurezas orgânicas calculada a partir da análise GC-MS

Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)***)***

4.1.3. Outras caracterizações

Cromatografia de troca iónica (análise de cátions)

Determinou-se o teor de sódio e de potássio das amostras de CG utilizando uma cromatografo de troca iónica. O teor de sódio ou de potássio (X) da amostra foi obtido comparando a área dos picos no cromatograma com a de uma série de padrões obtidos nas mesmas condições utilizando uma curva analítica. O teor de sódio e potássio (X) foi calculado utilizando a fórmula: X = Y - C/S, onde Y é a área do pico da amostra, S é a inclinação e C é o intercepto da curva analítica. Verificou-se que a concentração de sódio e potássio na amostra de CG-73 era de 4,6 % (p/v) e 0,33 % (p/v), respectivamente.

Titulação de Karl Fischer (determinação do teor de água)

O teor de água das amostras CG foi determinado por titulação volumétrica de Karl Fischer (KF) utilizando o reagente KF padrão (Hydranal® composite-5) com a força ou o fator de equivalência de água (F) de 4,58 mg mL^{-1}. O teor de água (W), determinado pela fórmula W = F x V, onde V é o volume de reagente KR utilizado, foi de 17,8 ± 1,4% (CG-73) e 3,5 ± 0,1% (CG-65).

Determinação da densidade, pH e cor

As densidades das amostras de CG foram determinadas pela medida da massa de um dado volume da amostra e foram de 1,25 e 1,03 g mL^{-1} para CG-73 e CG-65, respectivamente. O pH das amostras CG era de cerca de 10±1 e estas apresentavam uma cor amarelada, com absorção significativa abaixo de 450 nm (Figura 21)

4.2. Preparação de nanoparticulas de Ouro (AuNPs)

As AuNPs foram preparadas utilizando CG em meio alcalino como agente redutor e PVP ou PDAC como agentes estabilizadores de partículas. Foram estudados os efeitos de impurezas no CG, concentração de glicerol e agente estabilizante e pH no tamanho de partícula, distribuição de tamanho e forma das AuNPs. Para verificar se o CG obtido diretamente a partir da reação de transesterificação tem a mesma (ou diferente) eficiência como agente redutor e resulta na formação de AuNPs

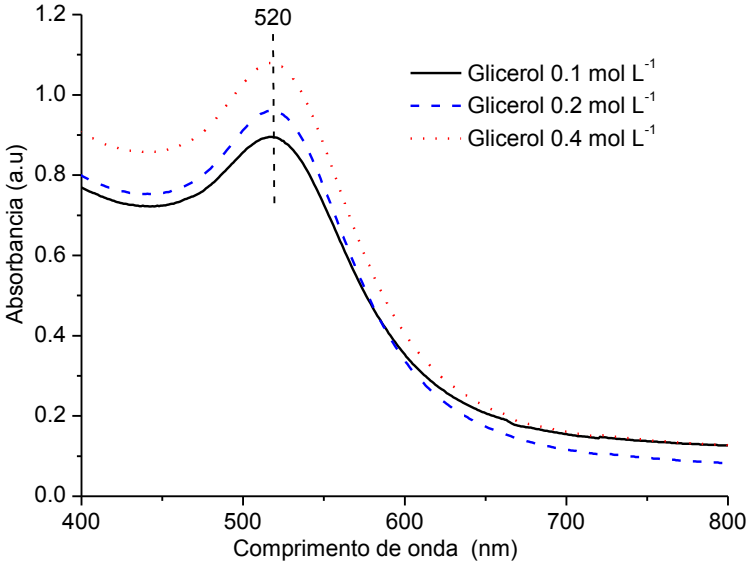
semelhantes (ou diferentes), as AuNPs foram também sintetizadas utilizando glicerol comercial (99,5% Panreac) sob as mesmas condições experimentais que o CG. Os resultados obtidos mostraram que CG pode ser empregado para obter AuNPs de tamanho de cristalito e cristalinidade similares a da partículas preparadas com o glicerol puro. Os detalhes da síntese de AuNPs usando CG são apresentados a seguir.

4.2.1. Preparação de AuNPs utilizando CG e PVP

Efeito da concentração de glicerol e sua pureza

Os espectros UV-Vis das AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações iniciais de CG-73 em um pH fixo (13,3 ± 0,2) e concentração de PVP constante (1%) são mostrados na Figura 41. Os espectros UV-Vis das suspensões de AuNPs preparados utilizando diferentes concentrações iniciais de glicerol (0,1–0,4 mol L^{-1}) são semelhantes na forma, mostrando uma banda LSP_T em torno de 520 nm, o que é característico de AuNPs esféricas (136).

Figura 41 - Espectro de absorção eletrônico na região visível de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações iniciais de CG-73 a concentrações fixas de PVP (1%), NaOH (0,3 mol L^{-1}) e $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles).



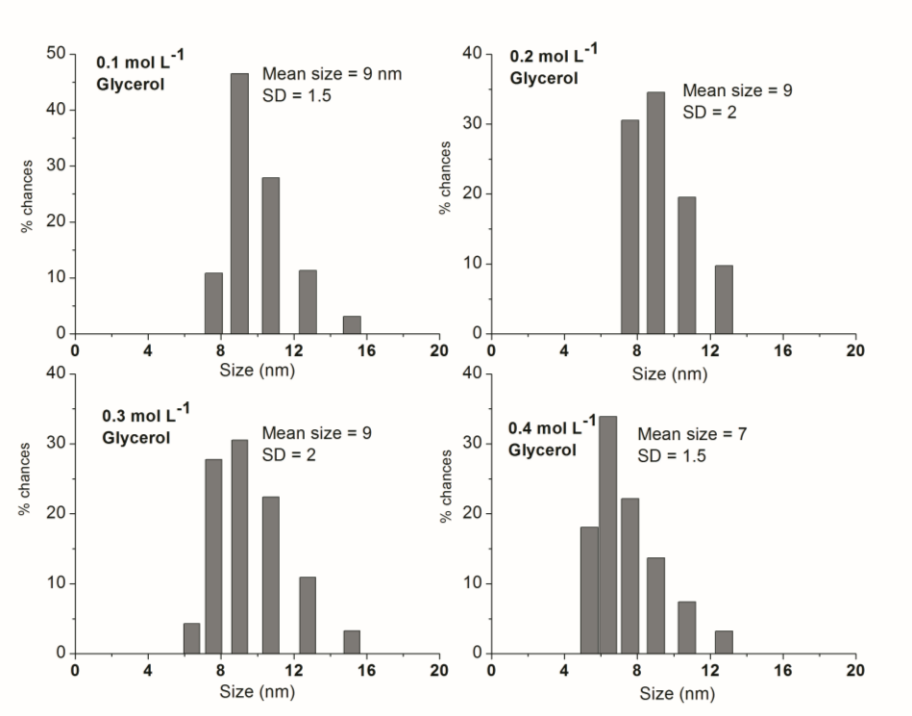
Fonte: : (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Como a posição do comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) está relacionada ao tamanho de partícula, inferimos que as AuNPs preparadas usando

diferentes concentrações de CG-73 possuem tamanhos semelhantes. No entanto, a intensidade de absorção é diferente entre as amostras e o valor de absorbância aumenta com o aumento da concentração de glicerol, indicando que mais AuNPs (espécies absorventes) são formadas com a maior concentração de glicerol (122).

Para melhor avaliar o efeito da concentração de glicerol no tamanho de partícula das AuNPs, foi realizada a análise DLS das amostras preparadas utilizando diferentes concentrações de glicerol (Figura 42). Os tamanhos ou diâmetros hidrodinâmicos de partícula medidos utilizando DLS confirmaram que todas as amostras apresentam um tamanho de partícula médio de cerca de 9 nm e que diferentes concentrações iniciais de glicerol não têm um efeito considerável na distribuição de tamanho de partícula, como também sugerido pelos resultados de espectroscopia de absorção eletrônica molecular.

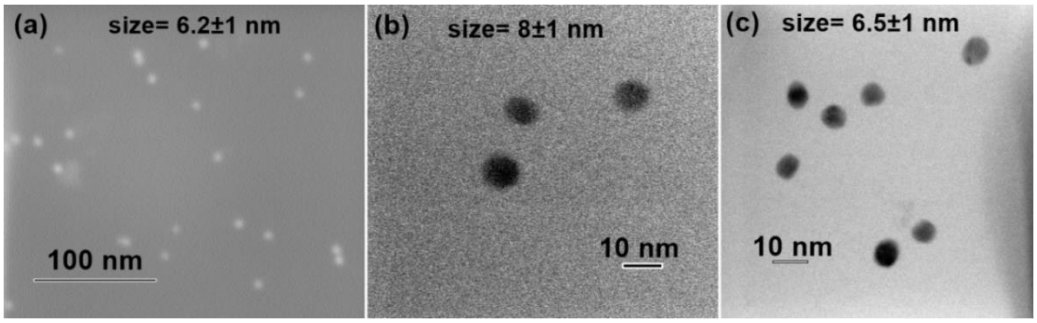
Figura 42 - Distribuição de tamanho de partículas medida utilizando DLS de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações iniciais de glicerol a pH fixo (13,3±0,2) e concentração fixa de PVP (1%) e $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles).



Fonte: : (Parveen 2016, Ref (117))

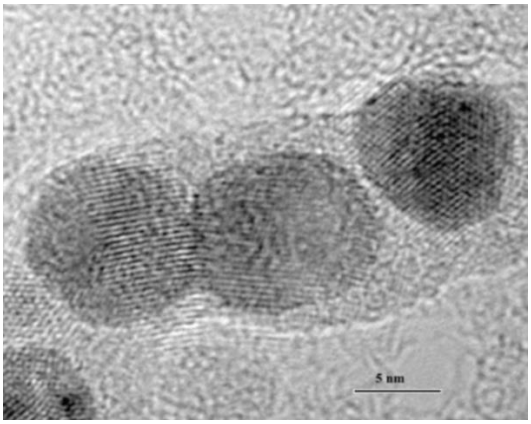
A análise de TEM foi também realizada para medir o tamanho de partícula das AuNPs preparadas com diferentes concentrações iniciais de glicerol. Os tamanhos de partícula de várias amostras medidos utilizando microscopia eletrônica de varredura (Figura 43) são bastante próximos aos diâmetros hidrodinâmicos medidos por DLS (Figura 42). As imagens de HRTEM das AuNPs preparadas utilizando CG-73 mostraram a natureza policristalina das partículas esféricas com alguns defeitos de cristal (Figura 44), como também observado em estudos anteriores no caso de AuNPs preparadas com glicerol puro (113).

Figura 43 - (a) Imagem de MEV de AuNPs preparadas utilizando 0,1 mol L^{-1} CG-73 e imagens de TEM de AuNPs preparadas utilizando (b) 0,2 mol L^{-1} e (c) 0,4 mol L^{-1} CG-73. O tamanho de partícula médio das AuNPs juntamente com o desvio padrão foi indicado acima de cada imagem.



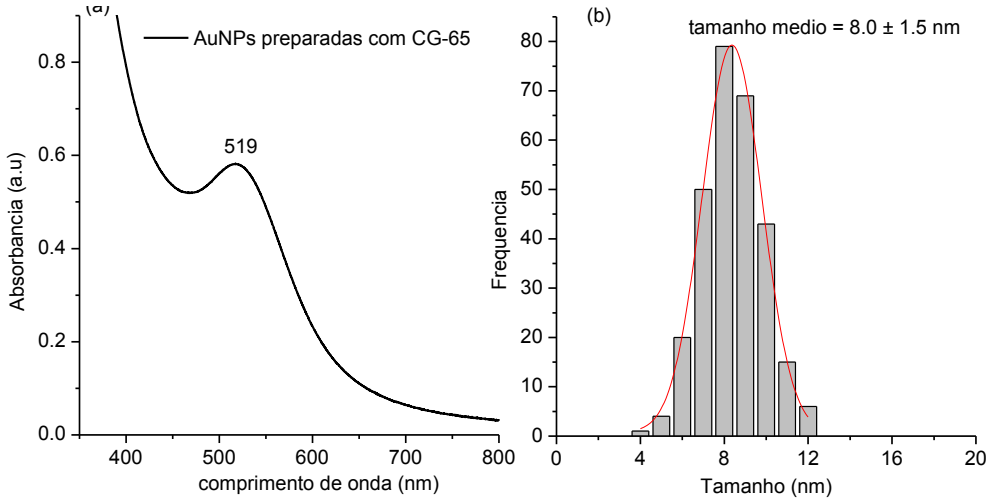
Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Figura 44 - Imagem de TEM representativa de alta resolução (HRTEM) de AuNPs preparada utilizando CG-73



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Figura 45 - (a) Espectro eletrônico na região do UV-Visível e (b) distribuição de tamanho de partícula medida por TEM das AuNPs preparadas utilizando CG-65. Condições de síntese 3,75 x 10^{-3} mmols de $HAuCl_4$, 1% de PVP e pH 13,2.



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

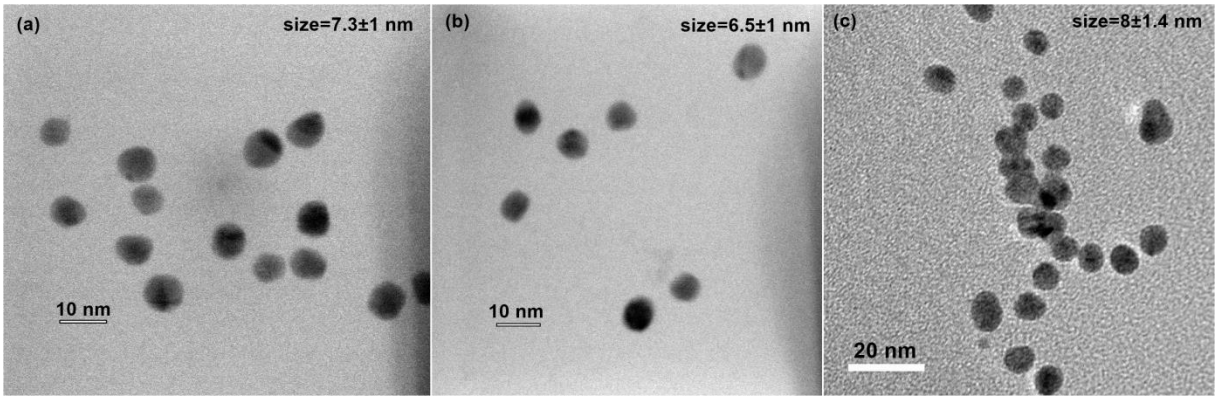
Resultados similares foram obtidos utilizando a amostra CG-65. As AuNPs preparadas utilizando CG-65 apresentam a banda de absorção plasmônica centrada em 519 nm (Figura 45a) e têm um tamanho médio de partícula de 8 ± 1,5 nm, tal como medido por TEM (Figura 45b).

Para fim de comparação, as AuNPs foram também preparadas utilizando glicerol comercial de elevada pureza (99,5%, Panreac) (Figura 46a) e CG com diferentes níveis de impurezas orgânicas e inorgânicas (Figura 46b and Figura 46c), mantendo outras condições experimentais constantes.

A partir da comparação das imagens de TEM de AuNPs preparadas com glicerol comercial, CG-73 e CG-65 (Figura 46), é evidente que AuNPs esféricas com tamanho e distribuição quase semelhantes são obtidas no utilizando glicerol comercial (puro) e CG . Estes resultados indicam que CG obtido diretamente a partir do processo de transesterificação pode ser eficientemente utilizado para sintetizar nanopartículas metálicas com boa distribuição de tamanho e as impurezas presentes no mesmo não afetam o tamanho de partícula das AuNPs. Esta abordagem verde da utilização de CG

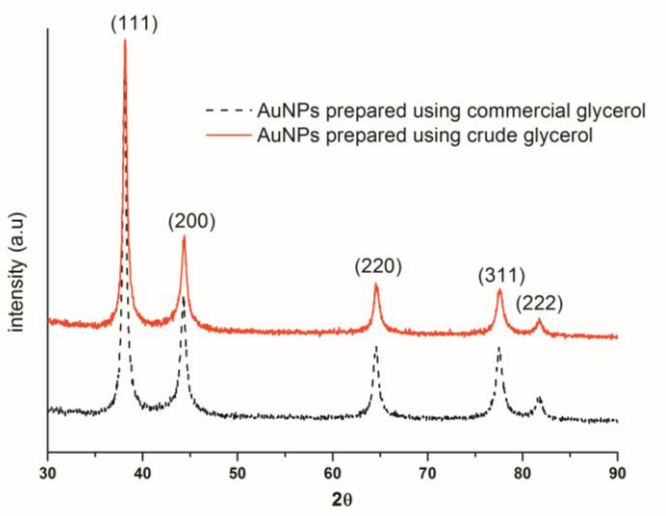
obtido como subproduto da indústria de biodiesel garante o uso sustentável do glicerol como agente redutor e solvente.

Figura 46 - Imagens de MET de AuNPs estabilizadas com PVP preparadas utilizando (a) glicerol comercial (99,5%, Panreac) (b) CG-73 e (c) CG-65 em condições experimentais idênticas. Condições: 3,75 x 10^{-3} mmoles de $HAuCl_4$, 0,4 M de glicerol, 1% de PVP e pH 13,2. O tamanho das AuNPs em cada caso é indicado na respectiva imagem TEM.



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Figura 47 - Difratogramas de XRD de AuNPs preparadas utilizando CG (linha sólida) comparado com o das AuNPs preparadas utilizando glicerol comercial puro (linha tracejada) como agente redutor.



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117))

Os difratogramas de raios-X das AuNPs suportadas em carbono preparadas utilizando CG e glicerol comercial são mostrados na Figura 47. Em ambos os casos, o difratograma de DRX revelou picos de difração claros com forma e relação de intensidade relativa semelhantes aos valores de 2-teta de 38,2° , 44,3°, 64,6°, 77,6° e 81,7° que correspondem aos planos (111), (200), (220), (311) e (320) da estrutura cúbica de face centrada (fcc) de ouro (pdf # 65-2870). Verificou-se que o tamanho médio de cristalitos de AuNPs, estimado utilizando a equação de Scherrer, foi de 13±3 nm para ambas as amostras preparadas com CG-73 e com glicerol comercial. Isto confirma que o CG pode ser empregado para obter AuNPs de tamanho de cristalito e cristalinidade semelhantes aos de glicerol comercial de elevada pureza, não sendo necessários passos de purificação especiais exceto a filtração simples através de um filtro de 0,2 μm.

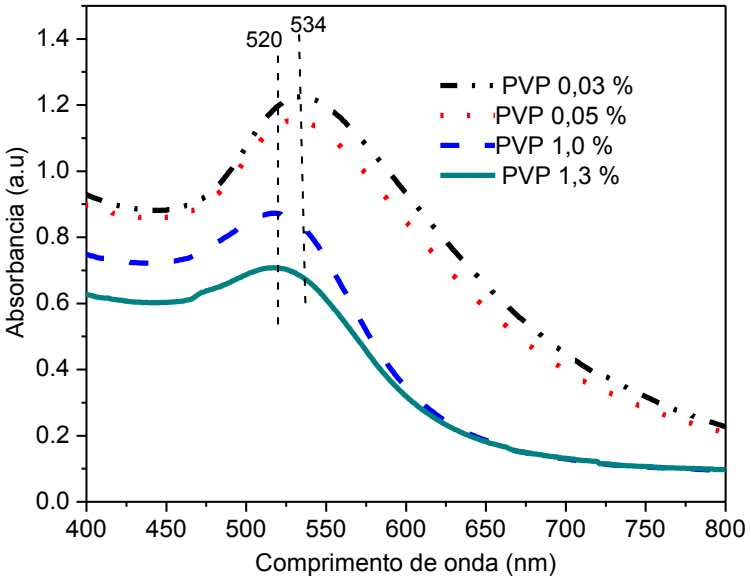
Efeito da concentração de PVP

A influência da concentração inicial de PVP sobre a distribuição de forma e tamanho de AuNPs foi estudada mantendo fixos a concentração de glicerol (0,3 mol L^{-1}) e o pH (13,3±0,2). A Figura 48 mostra os espectros de absorção na região do visível de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações iniciais de PVP. A mistura de $HAuCl_4$-PVP apresenta uma coloração amarela fraca. Após a adição de CG-73, coloração rosa avermelhado (para PVP ≥ 1%) ou roxo avermelhado (para PVP <1%) aparece dentro de 2-3 minutos, com o aparecimento correspondente de bandas de absorção transversais (LSP_T) em torno de 520 nm e 534 nm, respectivamente, indicando a formação de AuNPs. O pH cai um pouco de 13,2±0,2 para 13±0,1 após a conclusão da reação, o que pode estar relacionado com o consumo de íons OH^- na mistura reacional como será discutido posteriormente.

A banda de absorção em 520 nm indica a formação de nanoesferas de Au em concentrações de PVP ≥ 1%. Em concentrações menores de PVP, a banda de absorção ocorre em comprimentos de onda mais elevados (534 nm) e a amostra também apresenta uma absorbância significativa acima de 600 nm. Ambas as observações indicam a formação de AuNPs esferoidais maiores em concentrações de PVP <1%. Quando a concentração de PVP é baixa, as AuNPs não estão suficientemente

protegidas e a sua estabilidade é inferior. Além disso, devido a um estabilização menos eficiente, a taxa de redução de Au^{3+} é maior em concentrações menores de PVP, como indicado pelos valores de absorbância mais elevados para amostras de AuNPs sintetizadas em concentrações menores de PVP. O resultado global é a formação de partículas maiores com absorbância máxima em torno de 534 nm e com absorbância significativa acima de 600 nm.

Figura 48 - Espectro de absorção eletrônica na região do visível das AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações de PVP a pH fixo (13,3±0,2), concentração fixa de CG-73 (0,2 mol L^{-1}) e e concentração de fixa $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles).



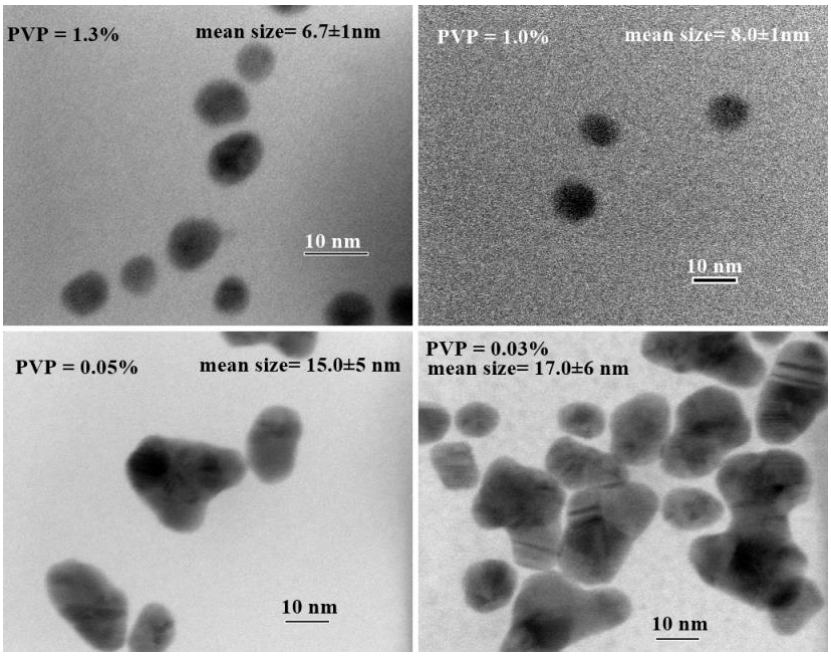
Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Uma vez que PVP é um polímero neutro, espera-se que a estabilização ocorra através de meios estéricos (99,102). Zhou *et al.* mostraram que o PVP estabiliza efetivamente as AuNPs através da coordenação do oxigênio da carbonila do PVP com a superfície de Au, como indicado por um aumento na energia de ligação do pico de O1*s* do grupo carbonila e uma ligeira diminuição na energia de ligação do pico de Au4*f* no espetro de XPS (99). Wang *et al.* propuseram que o PVP estabiliza os AgNPs formando uma camada protetora em torno de AgNPs como resultado da coordenação da prata com o átomo de N do PVP (104) para nanopartículas inferiores a 50 nm e, no caso de

partículas maiores, a prata pode formar coordenação com o átomo de oxigênio de PVP tambem.

As imagens de MET de AuNPs preparadas utilizando diferentes quantidades de PVP mostram claramente o efeito da concentração de PVP na forma da partículas e na sua distribuição de tamanho. A Figura 49 mostra que a uma maior concentração de PVP (> 1%) são formadas nanopartículas esféricas com distribuição uniforme (8±1 nm), mas à medida que diminuí-se a concentração de PVP para 0,05% ou menos, AuNPs maiores (cerca de 16±6 nm) são formadas por causa da aglomeração das nanopartículas.

Figura 49 - Imagens de MET das AuNPs estabilizados com PVP preparadas utilizando diferentes concentrações de PVP a pH fixo (13,3 ± 0,2), concentração de CG-73 fixa (0,2 mol L^{-1}) e concentração fixa de $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmols). O tamanho médio de partículas obtido a partir de imagens de MET também é indicado em cada imagem correspondente.



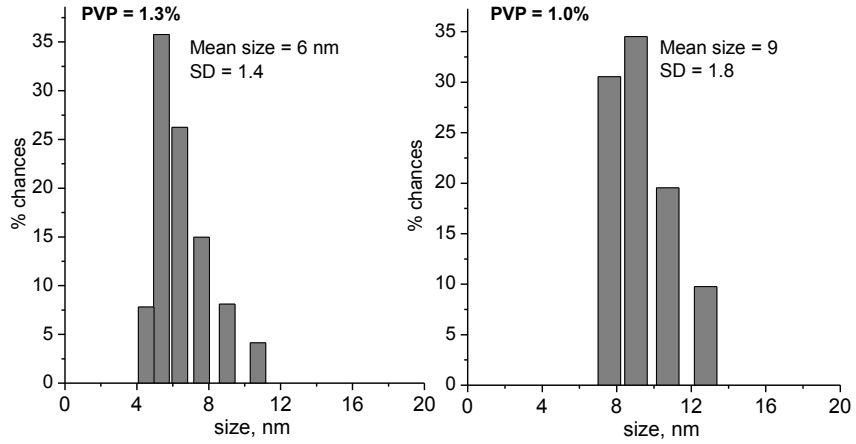
Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

O diâmetro hidrodinâmico das AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações de PVP foi também medido utilizando DLS (Figura 50). O tamanho da partículas obtida a partir da análise de DLS é de 6±1 nm e 9±1 nm para AuNPs

preparadas utilizando concentração de PVP de 1,3 e 1%, respectivamente, corroborando com os resultados da análise de MET.

Resumindo os resultados de espectroscopia eletrônica, análises de MET e DLS, observa-se que a concentração de PVP desempenha papel importante na estabilização de AuNPs e, portanto, no tamanho de partículas (102) A presença de partículas agregadas de grande dimensão em concentração menores de PVP também indicam que o próprio glicerol ou as impurezas traço presentes nele não desempenham um papel significativo na estabilização de partículas nas condições experimentais empregadas. A concentração final de PVP deve ser mantida em pelo menos 0,4% ou mais na mistura reacional contendo $AuCl_4^-$ e glicerol para se obter AuNPs com suficiente estabilidade e distribuição de tamanho uniforme.

Figura 50 – Distribuição de tamanho medida por DLS de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações de PVP a pH fixo (13,2), concentração de glicerol fixa (0,2 mol L^{-1}) e concentração fixa de $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3}). A sigla SD significa desvio padrão, que representa a largura da distribuição de tamanho de AuNPs.



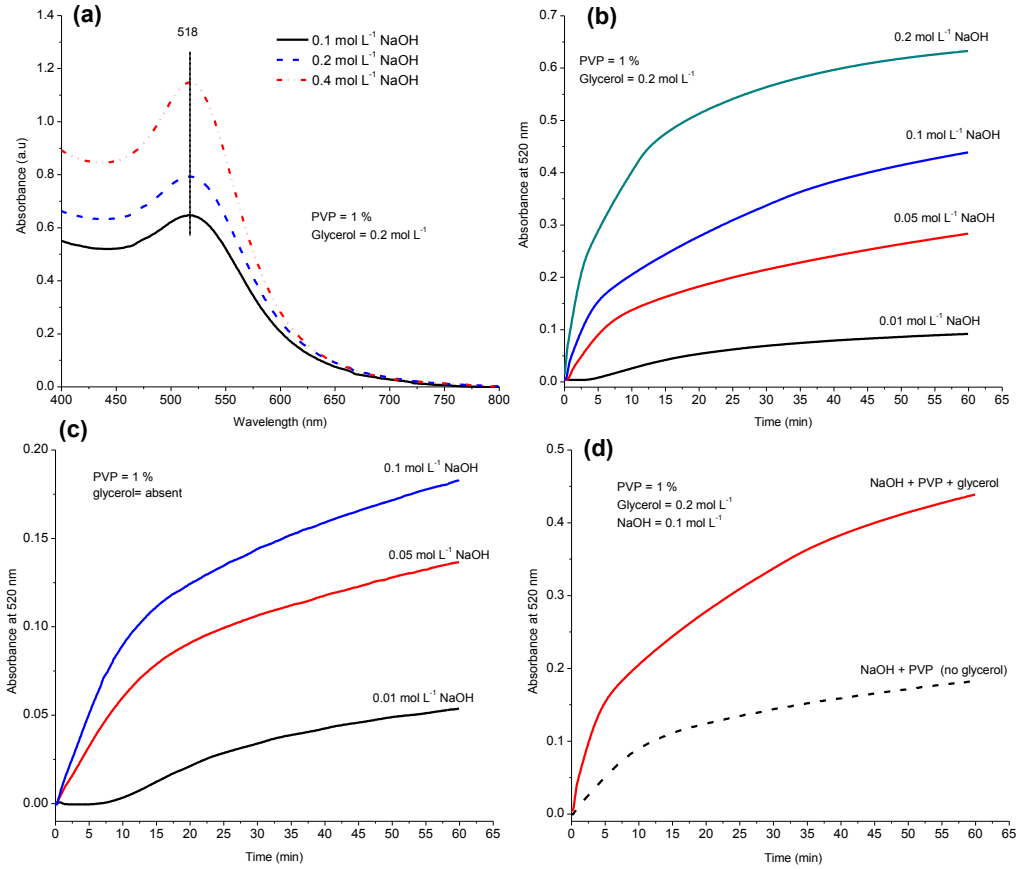
Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Efeito da [OH⁻]ou pH

Os espectros de UV-Vis das AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações de OH^- (0,1–0,4 mol L^{-1}), fixando a concentração de PVP (1%) e CG-73 (0,2 mol L^{-1}), são apresentados na Figura 51a. Os espectros de todas as amostras mostram a

absorbância máxima em cerca de 518 nm e não se espera, portanto, qualquer diferença acentuada no tamanho das partículas. A magnitude da absorbância, no entanto, aumenta com o aumento do pH da solução, indicando que um número maior de AuNPs são formadas a pH mais elevado. Assim, o pH parece afetar fortemente a etapa de nucleação ou número de partículas formadas, enquanto que o tamanho da partícula é principalmente controlado pela concentração de PVP neste caso (ver Figura 49).

Figura 51 - (a) Espectros de absorção na região do visível de AuNPs estabilizadas com PVP e preparadas utilizando concentraçoes diferentes de NaOH a uma concentração fixa de PVP (1%), glicerol (0,2 mol L^{-1}) e $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles), (b) evolução temporal da banda SPRT em 520 nm em função do pH na presença de 1% de PVP e 0,2 mol L^{-1} de glicerol e (c) evolução temporal da banda de SPR_T em 520 nm em função do pH na presença de apenas 1% de PVP (sem glicerol) e (d) comparação da taxa de formação de AuNPs utilizando apenas PVP em meio alcalino (linha tracejada) e PVP mais glicerol em meio alcalino (linha contínua).



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Em meio alcalino, tanto o glicerol (115,122) quanto o PVP (99) podem atuar como agentes redutores. Uma vez que a espécie alcóxido ($–CO^-$) formada a partir de glicerol após desprotonação em meio alcalino é o principal agente redutor ativo (115), sua formação pode ser favorecida a pH mais elevado, resultando na redução eficiente de íons Au^{3+} e, consequentemente, formação de nanopartículas, conforme indicado pelos maiores valores de absorbância em pH mais elevado (Figura 51a). Esta inferência é suportada pelo fato de que a taxa de formação de AuNPs aumenta em pH mais elevado na mistura reacional contendo glicerol (Figura 51b). No entanto, além de estabilizar as AuNPs, o papel da PVP como agente redutor (101) em meio alcalino não pode ser ignorado; as AuNPs são também formadas mesmo na ausência de glicerol na mistura reacional (Figura 51c). NaOH pode ajudar na abstração de átomos de H do carbono terciário do PVP ou causar degradação do polímero, produzindo radicais orgânicos que, por sua vez, podem participar na redução de íons Au^{3+} (99,136). Além disso, a redução de Au^{3+} por PVP mediada por NaOH resulta na formação de H^+ que deve ser neutralizado pelos íons OH^- presentes na mistura reacional (99). Esta pode ser uma das possíveis razões para a diminuição do pH à medida que a reação prossegue e para o aumento da taxa de reação em pH mais elevado. A Figura 51c mostra que a capacidade de redução do PVP também é dependente do pH. Por exemplo, a formação de AuNPs só começa após 7 minutos da mistura dos reagentes quando a concentração de NaOH é baixa (0,01 mol L^{-1}), mas começa imediatamente quando a concentração de NaOH é mais elevada. A inclinação das curvas de crescimento é diferente em pH diferentes, tornando-se mais acentuada em pH mais alto (Figura 51c).

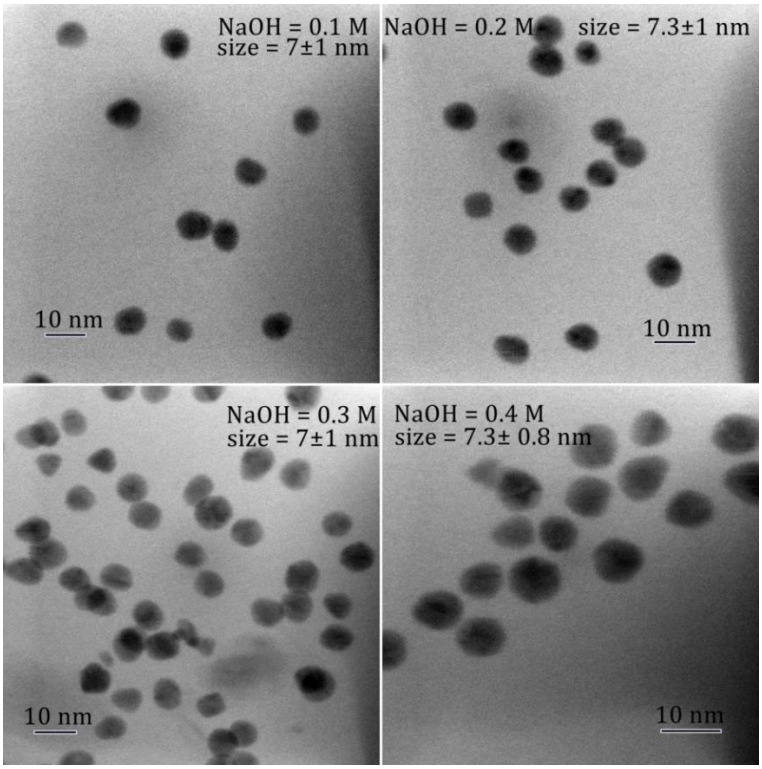
Embora o PVP atue como agente redutor em meio alcalino (99), a taxa de redução é mais rápida quando o glicerol está presente, indicando que o glicerol atua como o principal agente redutor (115) (Figura 51d). Gomes *et al*. propuseram que o alcóxido formado a partir de glicerol em meio alcalino é o agente redutor real e universal para íons de Ag^+ e Au^{3+}, sendo inferência baseada no fato de que as AuNPs poderiam ser formadas usando tert-butóxido de potássio como agente redutor na ausência de qualquer íons hidróxido (OH^-) no meio (115). No entanto, é importante mencionar

que não se formaram AuNPs na presença de apenas NaOH na mistura reacional contendo somente Au^{3+} e OH^{-}.

A análise MET, de fato, afirmou as inferências derivadas dos resultados de espectroscopia UV-Vis, mostrando que todas as amostras têm um tamanho médio de partícula de cerca de 6±1 nm (Figura 52).

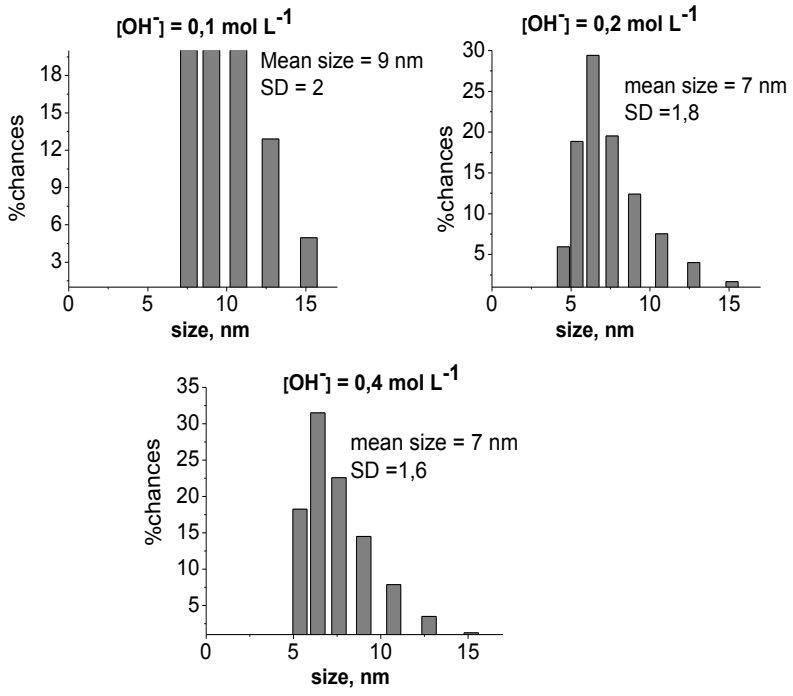
Além disso, o diâmetro hidrodinâmico medido por DLS para as diferentes amostras preparadas a pH diferente é de cerca de 7±2 nm (Figura 53). A pequena diferença de tamanho entre MET e DLS provavelmente está relacionada ao fato de que o DLS mede o diâmetro hidrodinâmico de um grande número de partículas, enquanto que a análise de MET é baseada na medição do diâmetro de um número limitado de nanopartículas.

Figura 52 – Imagens de MET de AuNPs estabilizadas com PVP e obtidas utilizando diferentes concentrações molares de NaOH (0,1–0,4 mol L^{-1}) a uma concentração fixa de PVP (1%) e CG-73 (0,2 mol L^{-1}).



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Figura 53 - Diâmetro hidrodinâmico de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações de OH^- a um concentração fixa de PVP (1 %), glicerol (0,2 mol L^{-1}) e $HAuCl_4$ (3,75 x 10^{-3} mmoles). A sigla SD significa desvio padrão, que representa a largura da distribuição de tamanho das AuNPs.



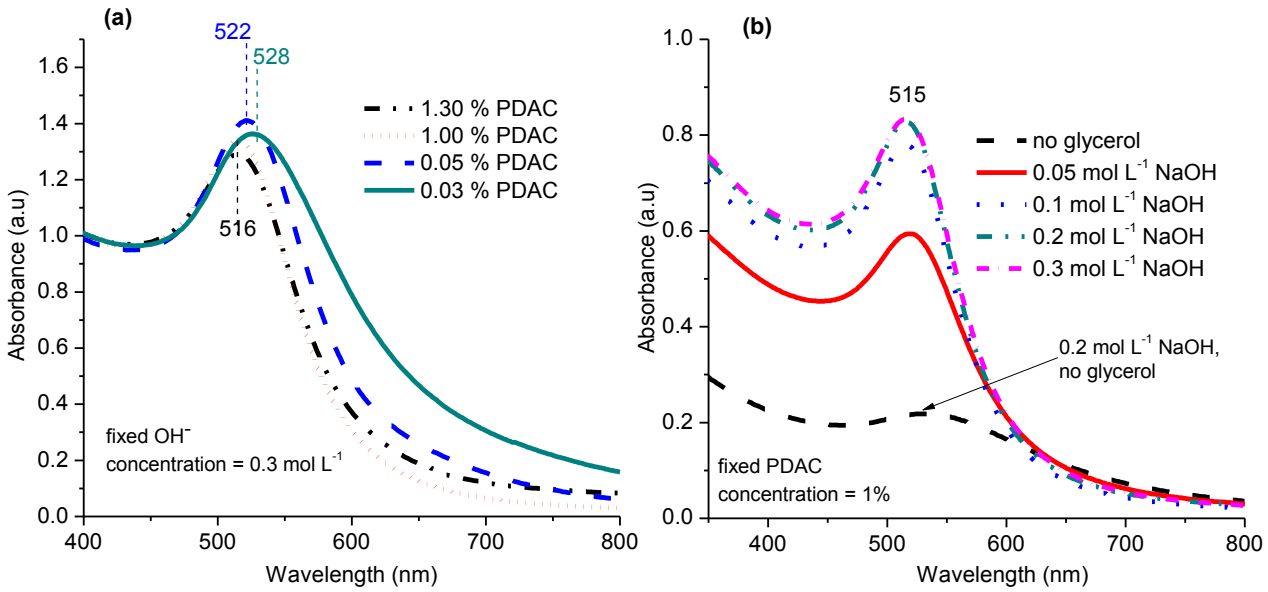
Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

4.2.2. Preparação de AuNPs utilizando glicerol bruto (CG) e PDAC

A Figura 54a mostra os espectros de absorção eletrônica de AuNPs preparadas utilizando diferentes concentrações do polieletrólito estabilizador PDAC, a uma concentração fixa de OH^- e glicerol. A banda LSP_T situa-se em cerca de 516 nm para uma concentração de PDAC igual ou superior a 1%, indicando a formação de nanopartículas esféricas (136). Além disso, não há absorção significativa acima de 600 nm o que sugere a ausência de grandes partículas agregadas e a formação de partículas pequenas com distribuição estreita de tamanho. O λ_{max}, no entanto, sofre um desvio batocromico e a absorbância acima de 600 nm torna-se significativa em concentrações de PDAC inferiores a 1%. Isto sugere a formação de partículas comparativamente maiores e elongadas que apresentam polidispersidade no

tamanho devido a establização insuficiente das AuNPs pelo PDAC durante o crescimento em concentrações mais baixas do polieletrólito (<1%).

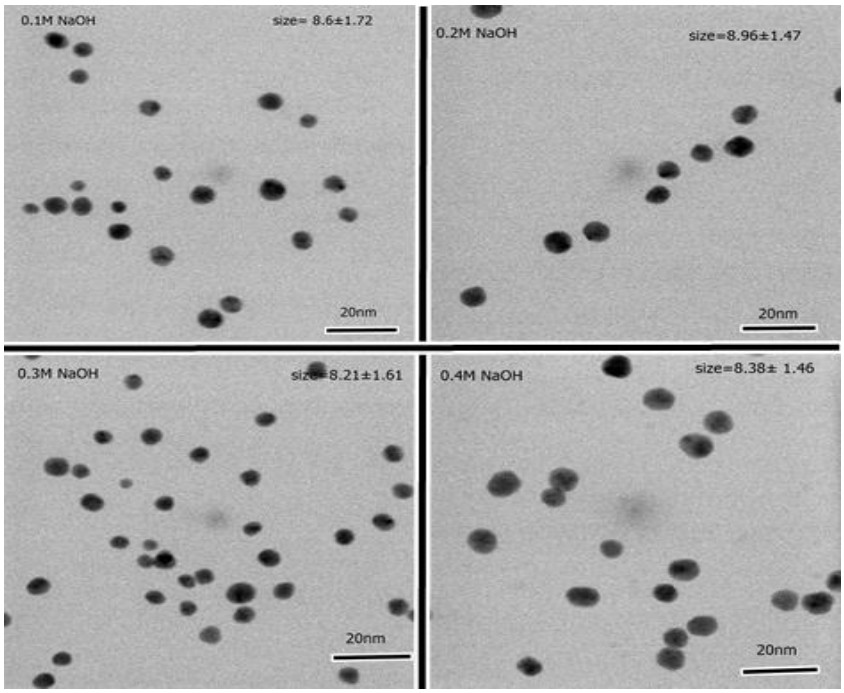
Figura 54 - Espectro de absorção eletrônica de AuNPs preparadas usando (a) diferentes concentrações de PDAC (0,03–1,3%) a uma concentração fixa de OH^- (0,3 mol L^{-1}) e (b) diferentes concentrações de OH^- (0,05–0,3 mol L^{-1}) a um concentração fixa de PDAC (1%). A curva inferior tracejada em *b* mostra os espectros de AuNPs preparados utilizando apenas PDAC em meio alcalino, sem a adição de glicerol.



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Mais uma vez, a presença de partículas maiores com uma concentração mais baixa de PDAC sugere que o próprio CG ou as possíveis impurezas presentes nele não desempenham um papel significativo na estabilização das nanopartículas nas condições experimentais empregradas, sendo que um agente estabilizador deve ser adicionado para obter partículas pequenas e monodispersas.

Figura 55 - Imagens de MET de AuNPs estabilizadas com PDAC e preparadas em pH diferentes mantendo outros parâmetros constantes.

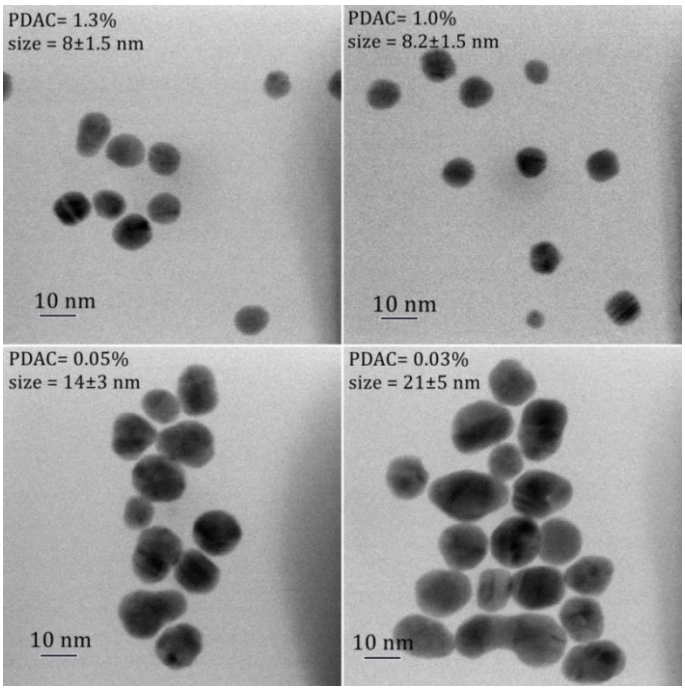


Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Tal como no caso do PVP, o pH da solução tem pouco efeito na distribuição de tamanho das AuNPs estabilizadas com PDAC (Figura 54b e Figura 55), mas afeta significativamente o número de partículas e a taxa de formação destas. A curva tracejada mais baixa na Figura 54b é o espectro das AuNPs preparadas na ausência de glicerol na mistura reaccional. A presença de uma banda SPR_T de baixa intensidade centrada a 530 nm neste espectro mostra que o PDAC em meio alcalino também pode reduzir os íons Au^{3+} formando AuNPs metálicas (137).

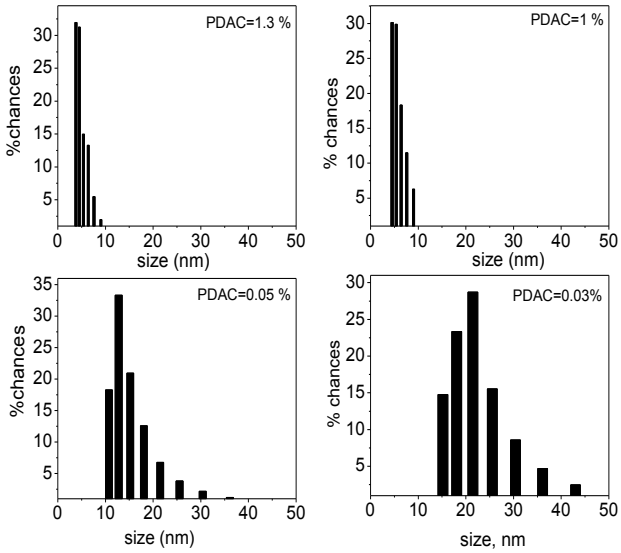
A análise dos tamanhos de partícula por MET (Figura 56) e DLS (Figura 57), de fato confirmou os resultados de espectroscopia electrónica mostrando que AuNPs de cerca de 8±2 nm com uma distribuição estreita de tamanho são formadas em concentrações de PDAC superiores a 1%, enquanto que partículas polidispersas e maiores de 14 nm e 20 nm são formadas em concentrações de PDAC de 0,05% e 0,03%, respectivamente.

Figura 56 - Imagens de MET das AuNPs estabilizadas com diferentes concentrações de PDAC (0,03%–1,3%) mantendo outros parâmetros constantes.



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

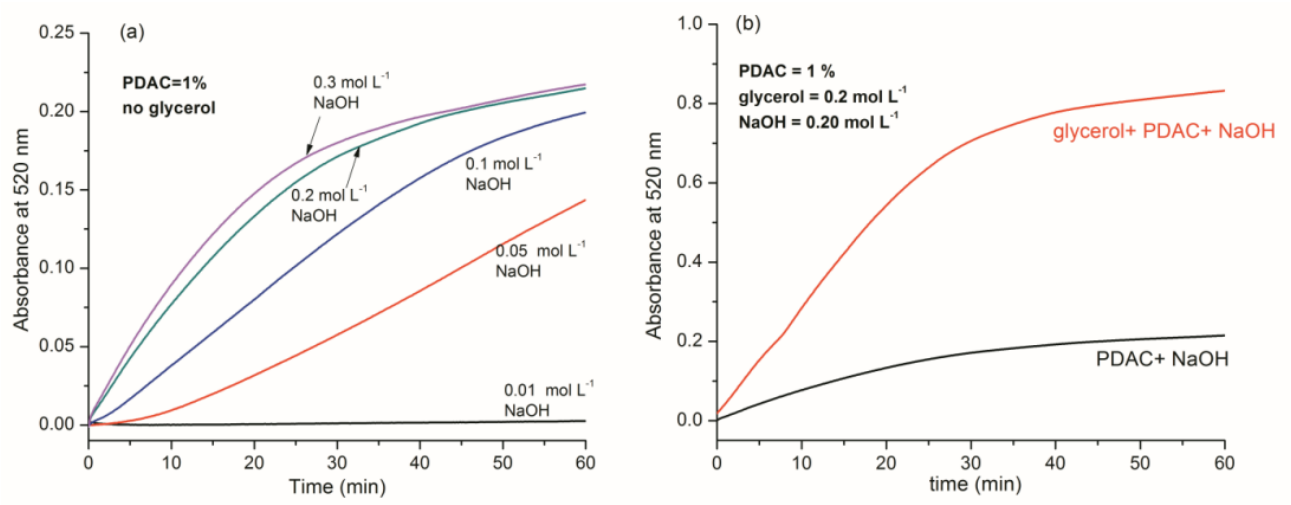
Figura 57 - Distribuição do tamanho de partículas determinado pelo DLS de AuNPS estabilizadas com PDAC e obtidas utilizando diferentes concentrações de PDAC; todas as outras condições experimentais são as mesmas para cada amostra.



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Tal como no caso de PVP, a habilidade redutora do PDAC é também dependente do pH da solução, sendo a reação mais rápida a uma concentração de OH^- mais elevada (Figura 58a). O PDAC, no entanto, é um agente redutor mais fraco em comparação ao glicerol e a formação de AuNPs é mais rápida quando o glicerol está presente na solução (Figura 58b).

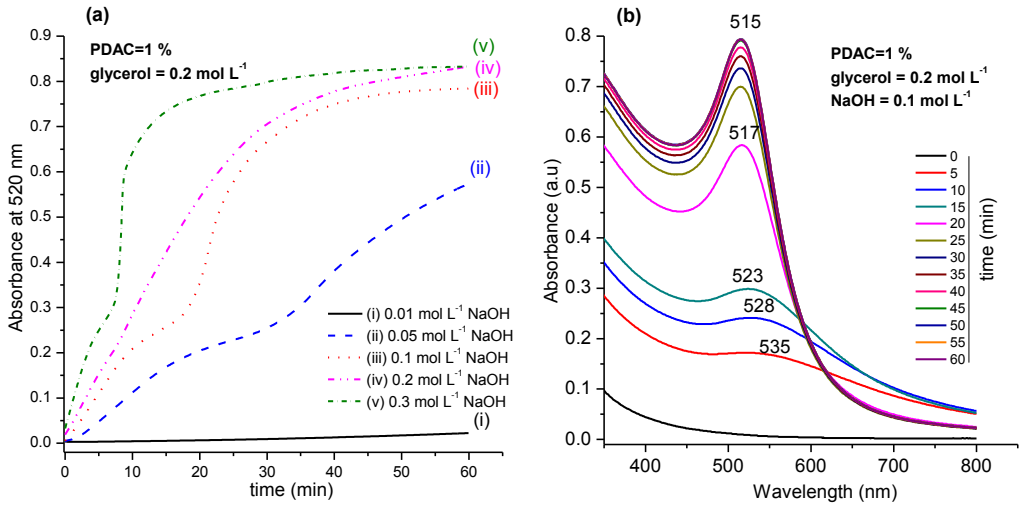
Figura 58 - (a) Alterações temporais na absorbância a 520 nm para AuNPs estabilizadas com PDAC preparadas utilizando diferentes concentrações de NaOH a uma concentração fixa de PDAC (1%) sem qualquer glicerol na mistura reaccional e (b) comparação de curvas de absorbância vs. tempo para as amostras de AuNPs com e sem glicerol na mistura reaccional a uma concentração fixa de PDAC (1%) e NaOH (0,2 mol L^{-1}).



A Figura 59a mostra as alterações temporais na absorbância da banda LSP_T em 520 nm. Pode ser observado que o crescimento das AuNPs é muito lento em concentração de 0,01 mol L^{-1} ou inferior de NaOH. As curvas mostram um aumento acentuado na absorbância a uma concentração mais elevada de NaOH (NaOH> 0,01 mol L^{-1}). A inclinação das curvas de absorbância mostra uma diminuição em algum ponto (a 18 min na curva (iii) e 6 min na curva (v), por exemplo). Tendo em vista o fato da absorbância ser medida apenas em 520 nm, esta alteração na inclinação está provavelmente relacionada com a alteração no tamanho de partícula e com a alteração correspondente no comprimento de onda de absorção à medida que a reação prossegue. A Figura 59b mostra claramente a alteração no

espectro ótico ou no máximo de absorção (λ_{max}) para a amostra preparada utilizando 0,1 mol L^{-1} de NaOH.

Figura 59 - (a) Evolução temporal da banda de absorbância a 520 nm em função do pH na presença de PDAC (1%) e glicerol (0,2 mol L^{-1}) e (b) e espectros eletrônicos de absorção molecular coletados de 0 min até 60 min a 05 minutos de intervalo de AuNPs estabilizadas com PDAC (amostra (iii) na Figura 59a) e preparadas utilizando NaOH 0,1 mol L^{-1}, PDAC 1%, glicerol 0,2 mol L^{-1} e $HAuCl_4$ 3,75 x 10^{-3} mmols



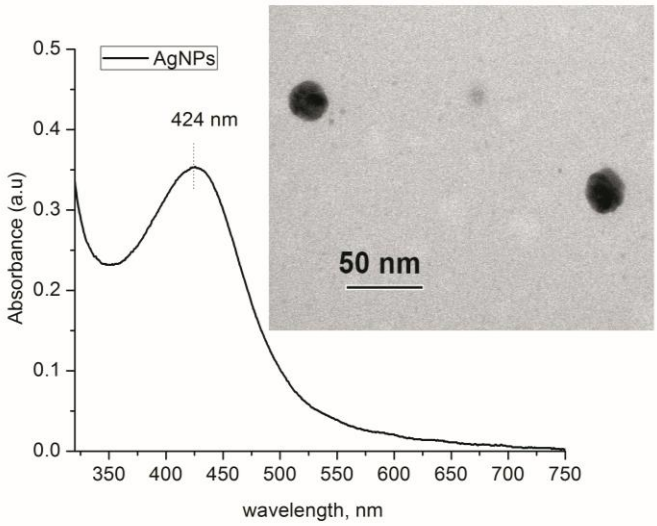
Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

4.3. Preparação de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando glicerol bruto

A eficiência do CG para reduzir os sais de metal para as respectivas nanopartículas metálicas não se limita à formação de AuNPs. Como prova do conceito, tentou-se preparar nanopartículas de prata (AgNPs) empregando CG-73 como agente redutor e PVP como agente estabilizante. A Figura 60 mostra o espectro UV/visível e a imagem de MET de AgNPs (inset) preparados utilizando CG-73 em meio alcalino. O espectro apresenta uma banda SPR_T centrada em 424 nm, que é característica de AgNPs (104). O tamanho médio de partícula estimado a partir das imagens TEM é de cerca de 25 nm. O número de partículas aumenta enquanto que o seu tamanho diminui com o aumento do pH do meio reacional, como indicado por uma absorbância maior e um ligeiro desvio hipsocrômico da banda SPR_T característica das AgNPs (Figura 61). Isto

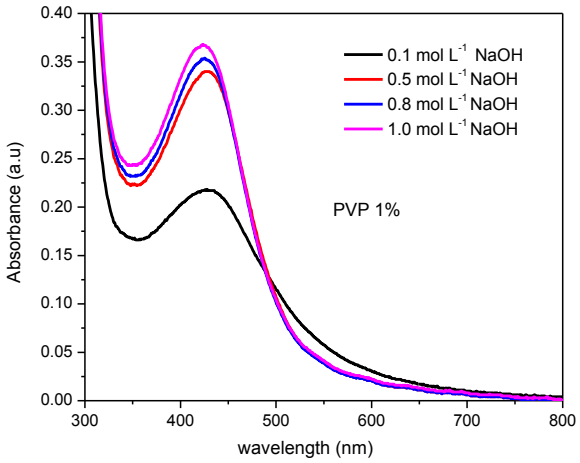
pode ser explicado com base no fato de que a formação de íons alcóxidos a partir de glicerol aumenta em pH mais elevado (115). O resultado é a formação de AgNPs menores e em maior número.

Figura 60 - Espectro UV-visível e imagens de MET (inset) de AgNPs preparadas utilizando glicerol bruto (CG) como agente redutor. Condições de síntese: 20 µL de $AgNO_3$ (0,005 mol L^{-1}), 1 ml de glicerol bruto (0,2 mol L^{-1} preparado em solução de NaOH 0,8 mol L^{-1}) e 1 ml de PVP (1%).



Fonte: (Parveen 2016, Ref (117)*)*

Figura 61 - Espectro UV-visível de AgNPs preparadas utilizando CG na presença de diferentes concentrações de NaOH em condições idênticas. Condições de síntese: 20 µL de $AgNO_3$ (0,005 mol L^{-1}), 1 mL de glicerol bruto (0,2 mol L^{-1} preparado em solução de NaOH de concentração variável) e 1 mL de PVP (1%).



4.4. Conclusões

A formação de AuNPs esféricas e quase monodispersas de cerca de 8 nm foi alcançada, pela primeira vez, utilizando o glicerol bruto (CG) como recebido da planta de biodiesel. Como prova de conceito, foram utilizadas duas amostras diferentes de glicerol bruto com diferentes teores de glicerol (65% e 73%) e diferentes níveis (baixa e alta) e tipos (orgânicos e inorgânicos) de impurezas para preparar AuNPs. Nossos resultados mostram que o CG (contendo sais, umidade e uma variedade de ácidos graxos e ésteres), após simples filtração através de um filtro de 0,2 μm, é tão eficaz quanto o glicerol comercial na produção de AuNPs quase monodispersas e as impurezas presentes no GC não afetam a distribuição de tamanho das AuNPs resultantes. A distribuição de tamanhos é principalmente controlada pela concentração de agentes estabilizadores e o próprio glicerol ou as impurezas presentes nele parecem não ter nenhum papel na estabilização das partículas. Tanto o PVP quanto o PDAC, além de estabilizar as AuNPs, também atuam como agentes redutores em meios alcalinos, embora muito mais fracos que o glicerol. A uma concentração fixa de agente de estabilizador, o pH da solução não afeta a distribuição de tamanho de partícula, mas afeta significativamente o número de partículas formadas e a velocidade de sua formação. O método de síntese desenvolvido permite a formação de AuNP uniformemente distribuídas de cerca de 7,0±1,5 nm sob amplas faixas de concentração de glicerol (0,1–0,4 mol L^{-1}) e concentração de OH^- (0,1–0,4 mol L^{-1}) utilizando 1,0% de concentração de agentes estabilizadores. Este estudo abre novas possibilidades para a preparação ecologicamanete correta de nanopartículas metálicas utilizando como agente redutor o CG, um reagente barato, não tóxico e biodegradável.

Capítulo 5

Síntese sem-ligante (*Ligand-Free synthesis*) de AuNPs utilizando glicerol atuando simultaneamente como agente redutor e estabilizador

5. Síntese de AuNPs livres de ligantes (*Ligand-Free synthesis*) e utilizando glicerol atuando simultaneamente como agente redutor e estabilizador

Introdução ao Capítulo

O controle e a homogeneidade do tamanho das nanopartículas é um desafio importante para se atingir as propriedades que são dependentes de tamanho e da forma dos nanosistemas. Este controle é usualmente conseguido utilizando ligantes estabilizadores de superfície. Infelizmente, estes agentes estabilizadores podem impedir a atividade catalítica e/ou afetar adversamente a biocompatibilidade dos sistemas surfactante/AuNP. Nesta parte do projeto, tentamos preparar e estabilizar AuNPs de um tamanho menor que 10 nm usando glicerol atuando parcialmente como agente redutor e parcialmente como estabilizador, simplificando significativamente o processo de síntese. Verificou-se que a eficiência da estabilização pelo glicerol depende da viscosidade (ou razão água: glicerol) do meio reacional. O efeito de outros parâmetros importantes (pH, temperatura e força iônica) na estabilidade e distribuição do tamanho de partículas também foi estudado. Tais AuNPs biocompatíveis preparadas utilizando glicerol ambientalmente amigável, sem nenhum surfactante/agente estabilizador podem encontrar aplicações úteis em catálise e aplicações biomédicas.

Palavras-Chave: Glicerol, AuNPs, nanopartículas, síntese sem ligantes, síntese verde

5.1. Preparação de AuNPs utilizando glicerol puro como agente redutor e estabilizador

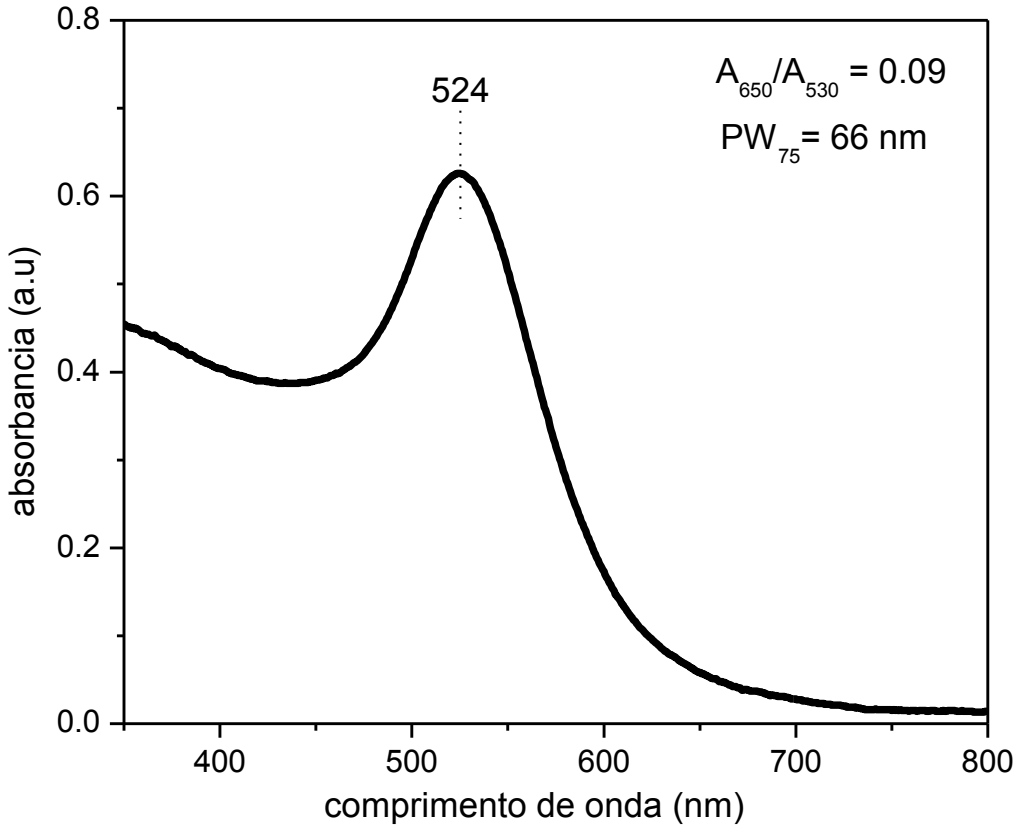
Uma característica ótica muito proeminente das AuNPs é a presença de uma banda de absorção distinta na região visível do seus espectro eletromagnético denominada banda de ressonância de plasma de superfície localizada (LSPR) que surge a partir de uma oscilação coerente coletiva dos seus elétrons superficiais em resposta a um comprimento de onda da luz incidente. Uma vez que a posição da banda LSPR depende tanto do tamanho quanto da forma ou razão de aspeto (AR) das AuNPs, a espectroscopia de absorção UV-visível pode ser utilizada como uma ferramenta de primeira mão para obter informações sobre a formação, o regime de tamanho, a estabilidade e o grau de agregação das AuNPs. Por exemplo, a

agregação de AuNPs ou a sua estabilidade coloidal pode ser avaliada a partir da razão entre a absorbância da banda LSPR e os sinais de espalhamento de partículas de ouro (A_{650}/A_{530}) (138). Em outras palavras, a razão de absorbância em 650 nm e 530 nm (A_{650} /A_{530}) pode ser utilizada como "indicador de agregação", sendo a razão mais elevada para partículas agregadas (139,140). Pode considerar-se que uma proporção inferior a 0,1 (A_{650} / A_{530} < 0,1) corresponde a partículas esféricas monodispersas e não agregadas. De forma semelhante, a esfericidade das AuNPs pode ser avaliada a partir da largura do pico a 75 por cento da sua altura (PW_{75}); partículas com alta esfericidade terão um valor de PW_{75} de 45 nm ou menos.

O espectro de absorção eletrônico das AuNPs preparadas usando glicerol em meio alcalino como agente redutor sem adição de qualquer estabilizador de partículas externo mostra uma banda LSPR simétrica, definida e centrada em 524 nm (Figura 62), sugerindo a formação de AuNPs esféricas (45,141). O valor de PW_{75} das AuNPs preparadas é de cerca de 66 nm mostrando que as partículas não têm uma estrutura esférica perfeita. Além disso, a região do espectro visível acima de 600 nm é sensível à forma da partícula e/ou ao grau de agregação. Uma vez que nos estados agregados, os elétrons de superfície de cada partículas se deslocalizam e são compartilhados entre as AuNPs adjacentes, eles requerem menor energia para sua ressonância e, portanto, a banda LSPR desloca para os maiores comprimentos de onda (a banda sofre um deslocamento batocrômico) (141). Um deslocamento batocrômico da banda LSPR por mais de 120 nm está geralmente associado à agregação de partículas pequenas. O espectro de AuNPs mostrado na Figura 62 não apresenta absorção significativa acima de 600 nm com a razão A_{650}/A_{530} de cerca de 0,09. Isto sugere a ausência de grandes partículas aglomeradas na amostra embora nenhum agente estabilizador externo tenha sido utilizado. Assim, o glicerol não só reduz Au^{3+} em meio alcalino, mas também pode proporcionar a estabilização necessária para as partículas. Uma vez que a posição de pico é apenas uma medida bruta do tamanho de partícula e uma vez que os espectros UV-vis sozinhos não podem determinar de forma exata e independente o tamanho de partículas, as inferências tentativas derivadas da análise por espectroscopia UV-visível foram verificadas por microscopia electrónica de transmissão (MET). A micrografia de MET mostrada na Figura 63 mostra claramente a formação de AuNPs

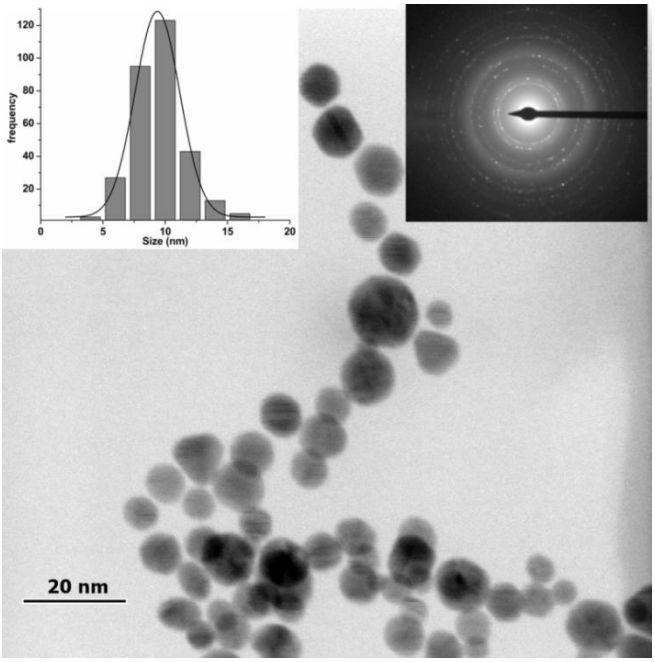
esféricas quase monodispersas com um tamanho médio de 9 nm com um desvio padrão de 2 nm de diâmetro e uma largura à meia altura (FWHM) de 4,2 nm (inserte à esquerda). O padrão de difração de elétrons ilustrado na Figura 63 (inserte) é típico de materiais policristalinos e assim confirma a natureza policristalina das AuNPs preparadas. Estes resultados mostram que, devido à sua alta viscosidade (1412 centipoises a 20 ˚C) (142), o glicerol puro pode ser usado para estabilizar os nano-sóis de ouro sem adicionar estabilizadores de partículas externos. Este aspecto da síntese baseada em glicerol é particularmente importante para aplicações que exigem a remoção dos ligantes adsorvidos na superfície das AuNPs, tais como catálise e bio-funcionalização.

Figura 62- Espectro de absorção na região visível de AuNPs preparadas utilizando glicerol puro como agente redutor e estabilizador em meio alcalino. Condições de síntese: 0,5 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 1 mL de glicerol; 0,02 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 1,5 mL



Fonte: Autoria própria

Figura 63 - Micrografias de MET de AuNPs preparadas utilizando glicerol puro como agente redutor e estabilizador em meio alcalino. Os insertos a esquerda e a direita mostram a distribuição de tamanho de partícula e padrão de difração de elétrons de AuNPs, respectivament. Condições de síntese: 0,5 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 1 mL de glicerol; 0,02 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 1,5 mL



Fonte: Autoria própria

5.2. Efeito da razão glicerol: água

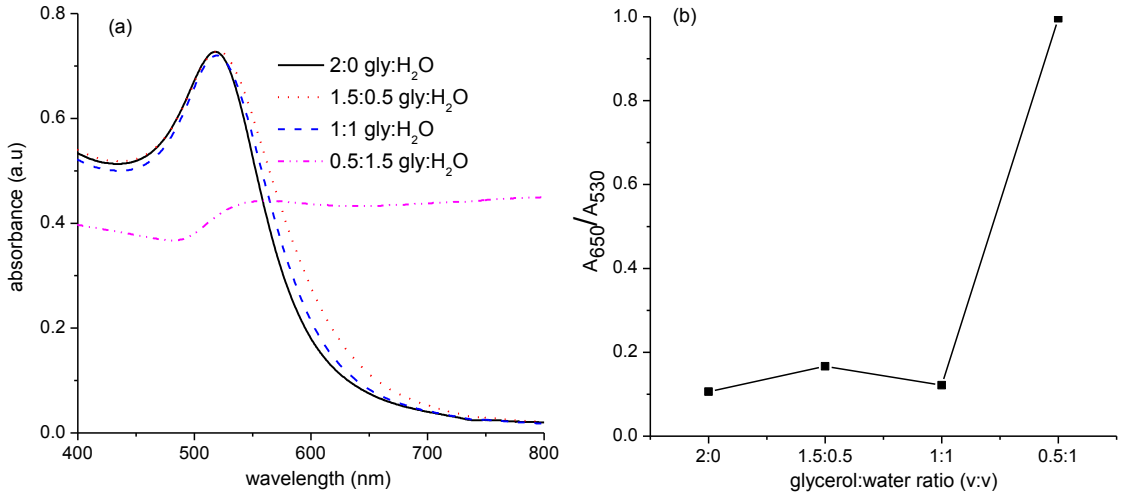
A viscosidade do glicerol parece desempenhar papel importante na estabilização de AuNPs e controle de tamanho. Esta hipótese foi verificada variando a razão (v/v) de glicerol: água na síntese de AuNPs em condições experimentais idênticas (ver Tabela 3).

A absorbância acima de 600 aumenta apenas ligeiramente quando a razão glicerol: água é de 1,5: 0,5 ou 1: 1, indicando que o glicerol pode estabilizar as AuNPs numa concentração final de glicerol tão baixa como a de 30% na mistura reacional. No entanto, quando a concentração final de glicerol na mistura reacional é de 16%, a banda LSPR torna-se totalmente assimétrica com uma mudança de absorbância máxima (λ_{max}) para cerca de 540 nm (Figura 64a) . Esta amostra com razão glicerol:água de 0,5: 1,5 apresenta um valor A_{650}/A_{530} de cerca de 1 que é indicativo de aglomeração extensa de partículas. Em geral, a razão A_{650}/A_{530} aumenta com a diminuição da razão glicerol/água (Figura 64b).

A Figura 64a mostra que a amostra preparada utilizando uma razão 2: 1 de glicerol: água (56,7% de concentração final de glicerol) exibe uma banda de absorção LSPR simétrica centrada em cerca de 520 nm e sem absorção significativa acima de 600 nm. A razão A_{650}/A_{530} para esta amostra é de 0,1 indicando boa distribuição de tamanho de partícula e falta de agregação (Figura 64b).

A informação obtida a partir da espectroscopia de absorção electrónica foi verificada através do microscopia eletrônica (Figura 65). As AuNPs preparadas com 65,7% de glicerol na mistura reacional (proporção glicerol: água = 2: 0) têm forma esférica e mostram um tamanho médio de partícula de 7.0±1,7 nm. O tamanho médio das partículas é de 7.0±2,2 quando as AuNPs são preparadas com uma concentração final de glicerol final de 49%.

Figura 64 - Espectro de absorção na região visível (a) e a razão A_{650} /A_{530} (b) de amostras de AuNPs preparadas utilizando diferentes proporções iniciais de glicerol: água (v:v) sob condições idênticas. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); 2 mL de solução de glicerol com diferentes proporções de volume de glicerol: água (2:0, 1,5:0,5, 1:1, 0,5:1,5); Uma vez que o volume de reação total é de 3,04 mL, a concentração final de glicerol nestas soluções é de 65,7%, 49,3%, 32,8% e 16,4%, respectivamente.

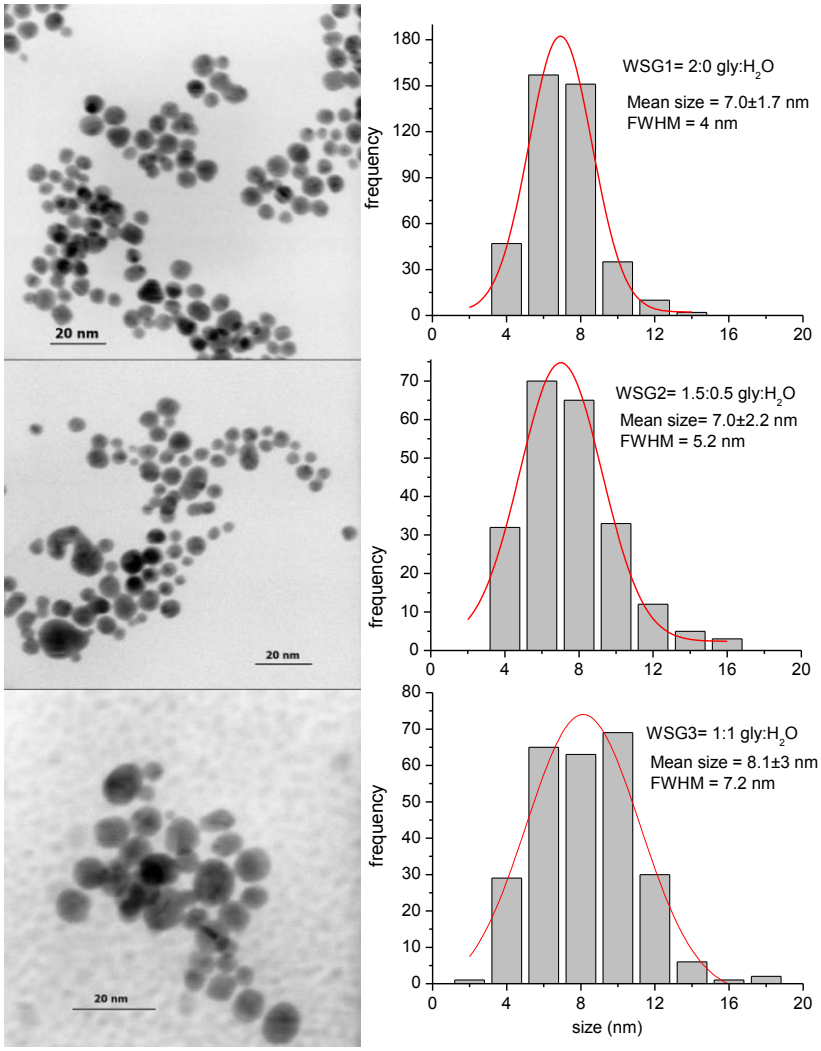


Fonte: Autoria própria

Embora o tamanho médio das partículas não tenha mudado significativamente, o desvio padrão (SD) que mostra a largura da distribuição de tamanho de partícula aumentou de 1,7

para 2,2. A imagem de MET da amostra preparada utilizando 33% de glicerol apresenta um ligeiro aumento no tamanho (8,1 nm) bem como na distribuição de tamanho (ou aglomeração de partículas), como também indicado por um valor de SD mais elevado (SD = 3).

Figura 65 - Micrografias de MET juntamente com os correspondentes histogramas de distribuição de tamanho de AuNPs preparadas utilizando diferentes proporções de glicerol:água, tal como identificadas nos histogramas, sob condições idênticas. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); 2 mL de solução de glicerol com diferentes proporções de volume de glicerol: água (2: 0, 1,5: 0,5 e 1: 1); Volume total ~ 3,04 mL



Fonte: Autoria própria

Resumindo os resultados da espectroscopia UV-visível e MET, pode concluir-se que a diminuição da proporção (%) de glicerol na mistura reacional conduz um aumento no tamanho médio de partícula e distribuição de tamanho de partícula como indicado pelos valores de SD. Isto pode ser explicado pelo fato de que a diluição de glicerol levar a uma diminuição na sua viscosidade. Conforme ilustrado na Figura 66, a viscosidade do glicerol diminui de 15,2 para 6 para 2,5 para 1,76 centipoises para solução aquosa de glicerol contendo 65, 50, 32 e 20% de glicerol, respectivamente, como indicado por um estudo detalhado em referência (142). Uma vez que a viscosidade da solução de glicerol pode ser considerada como o principal fator responsável pela estabilização das partículas, uma diminuição da viscosidade da mistura reacional leva à formação de partículas com maior tamanho e maior distribuição de tamanho.

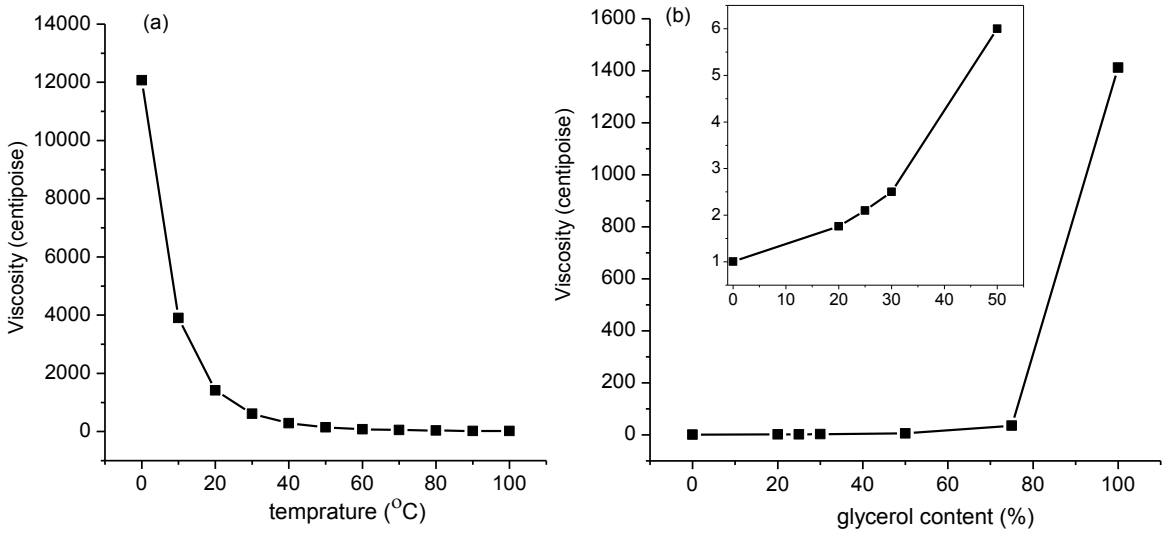
5.3. Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura de síntese na faixa de 10 ˚C a 60 ˚C foi estudado e seguido por espectroscopia UV-visível (Figura 67). Uma banda LSPR simétrica sem absorção significativa acima de 600 nm é observada para AuNPs preparadas a 10 ˚C e 25 ˚C. Assim, as partículas esféricas sem aglomeração são formadas a uma temperatura mais baixa, como também confirmado pela análise MET (Figura 68). No entanto, com um aumento da temperatura, os espectros eletrônicos de AuNPs mostram um deslocamento batocrômico da posição da banda LSPR (inserte Figura 67), indicando a formação de partículas ligeiramente maiores. O deslocamento batocrômico na banda de LSPR em função da temperatura é também acompanhado por um aumento na absorção acima de 600 nm e, portanto, a razão A_{650} / A_{530}. Este efeito é muito proeminente na amostra preparada a 60 °C (A_{650}/A_{530} = 0,36) em comparação com as outras três amostras preparadas a temperaturas mais baixas (A_{650}/A_{530}~0,1). Estes resultados confirmam a formação de partículas maiores ou aglomeração de partículas a temperaturas superiores que 25 ˚C.

Novamente, os resultados podem ser explicados considerando o efeito da temperatura na viscosidade do glicerol e a taxa de redução dos íons Au^{3+}. A viscosidade (centipoises) de glicerol puro diminui de 3900 para 1412 para 284 para 81,3 quando a temperatura aumenta de 10 para 20 para 40 a 60 ˚C, respectivamente (142) (Figura 66a). Assim, com o

aumento da temperatura, a viscosidade da mistura reacional contendo glicerol diminui e consequentemente a capacidade do glicerol para evitar a aglomeração. O aumento da temperatura também aumenta a taxa de redução dos íons Au^{3+} levando à formação de AuNPs maiores na ausência de condições de estabilização eficazes. Isto leva ao deslocamento batocrômico da banda de LSPR observado e o correspondente aumento na razão A_{650}/A_{530} e aglomeração de partículas.

Figura 66 - Diminuição da viscosidade do glicerol puro em função da temperatura (a) e aumento da viscosidade da solução aquosa de glicerol como função de teor de glicerol (%) 9b). O inserte em ***b*** é uma vista ampliada da faixa de temperatura de 0 a 55 °C (dados retirados Ref (142))

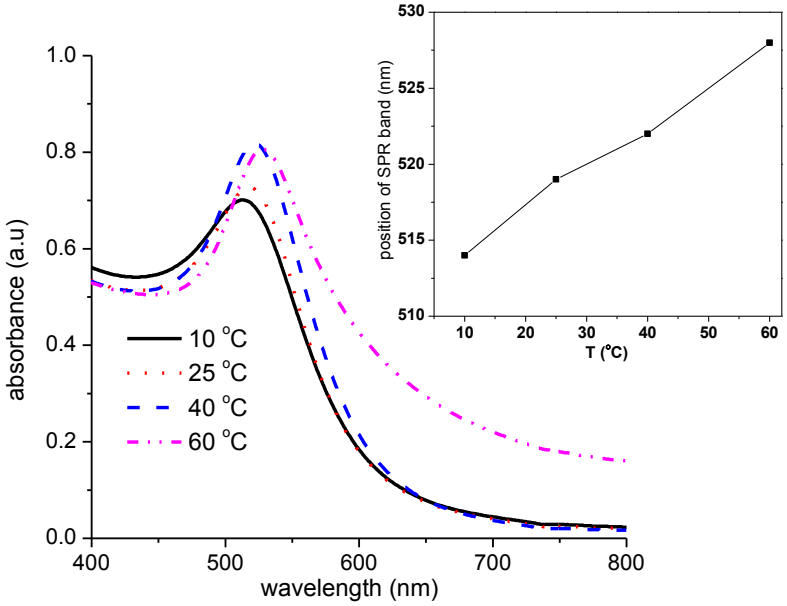


Fonte: (Segur *et al.,* 1951, Ref (142))

É importante observar que a intensidade de absorção, e portanto o número de partículas formadas, aumenta ligeiramente com o aumento da temperatura. Por exemplo, a amostra preparada a 40 °C mostra uma absorção de 0,82 em comparação com um valor de 0,7 para a amostra preparada a 10 °C. Deste modo, uma diminuição da viscosidade a uma temperatura mais elevada pode estar associada a um aumento do transporte de íons Au^{3+} para a superfície das partículas crescentes de Au e à sua subsequente redução na superfície do posterior (76). Isso, por sua vez, leva a um crescimento mais rápido das partículas, com

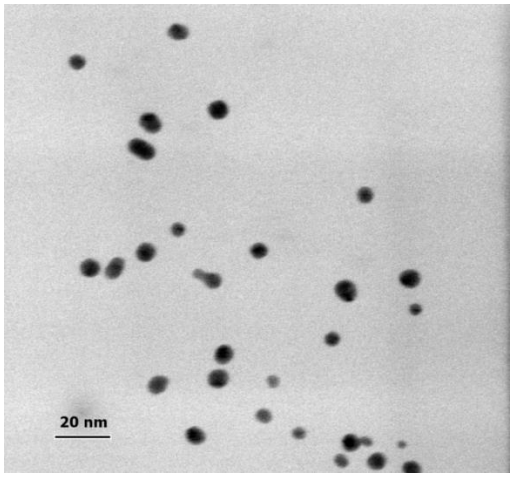
maiores chances de aglomeração e formação de partículas maiores, como sugerido pelo deslocamento batocrômico da banda LSPR e aumento das proporções A_{650}/A_{530} em temperatura mais alta (Figura 67). Assim, é melhor manter a temperatura abaixo de 30 ˚C quando se utiliza glicerol como agente estabilizante.

Figura 67 - Espectro de absorção visível de AuNPs preparadas utilizando diferentes temperaturas, mantendo as outras condições idênticas. O inserte mostra a mudança de posição da banda SPR em função da temperatura. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 2 mL de glicerol; 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 3 mL



Fonte: Autoria própria

Figura 68 - Micrografia de MET da amostra preparada a 10 °C (diâmetro médio das partículas = 6 ± 1,5 nm)

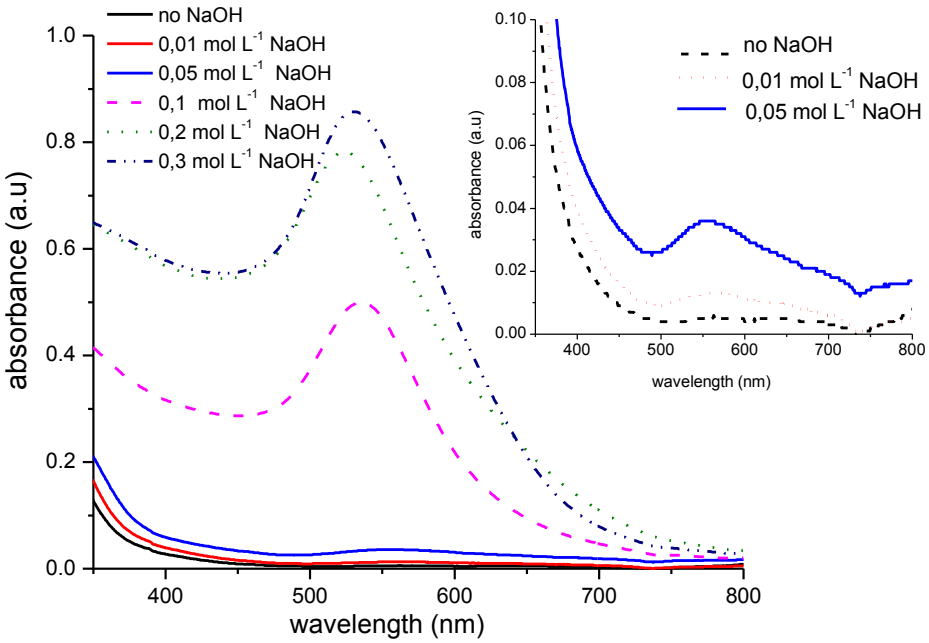


Fonte: Autoria própria

5.4. Efeito da concentração de NaOH (pH)

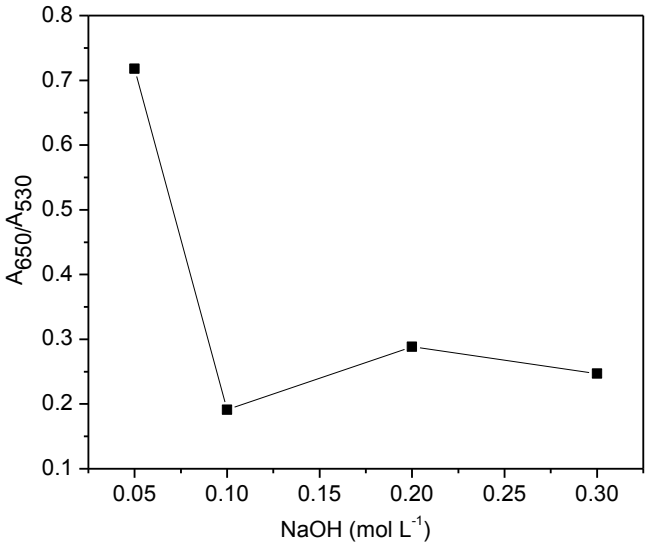
Uma vez que o glicerol é um ácido fraco e funciona como agente redutor à temperatura ambiente apenas em meios básicos, o efeito do pH na síntese de AuNPs também foi estudado sob uma faixa de pH utilizando diferentes concentrações (0,01 mol L^{-1} a 0,3 mol L^{-1}) de NaOH (Figura 69). Não se formam AuNPs na ausência de NaOH na mistura reacional como confirmado pela ausência de banda LSPR nos espectros (linha inferior na (Figura 69). Adicionando 40 µL de NaOH 0,01 mol L^{-1} à mistura reacional, uma fraca banda LSPR a cerca de 540 nm aparece mostrando que Au^{3+} é reduzido a Au metálico. Esta banda aumenta em intensidade e exibe um deslocamento hipsocrômico à medida que o pH da mistura reacional é aumentado pela adição de uma concentração mais elevada de NaOH. A relação A_{650}/A_{530} também diminui com o aumento do pH (Figura 70). Estas observações são indicativas do fato de serem produzidas AuNPs mais pequenas em maior número a pH mais elevado do meio reacional.

Figura 69 - Espectro de absorção visível de AuNPs preparadas em pH diferente utilizando diferentes concentrações de NaOH (0,01–0,3 mol L^{-1}), mantendo as outras condições idênticas. Por razões de clareza, os três espectros de fundo foram ampliados e mostrados como gráficos inserte. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 2 mL de glicerol; 0,04 mL de NaOH (0,01–0,3 mol L^{-1}); volume total = 3,04 mL



Fonte: Autoria própria

Figura 70 - A razão A650/A530 para AuNPs preparadas em pH diferente utilizando diferentes concentrações de NaOH (0,05–0,3 mol L^{-1}). Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 2 mL de glicerol; 0,04 mL de NaOH; Volume total ~ 3 mL



Fonte: Autoria própria

O fato por trás dessa observação reside na desprotonação das moléculas de glicerol que é altamente sensível ao pH. A ionização do íon H^+ a partir da molécula de glicerol aumenta com o aumento do pH, levando à formação da espécie de alcóxido carregada negativamente ($-CO^-$) que atua como agente redutor (115). Uma vez que a redução de Au^{+3} a Au^0 depende fortemente da formação de espécies de alcóxido, são formadas mais AuNPs a pH mais elevado. É assim aconselhável manter a concentração inicial de NaOH acima de 0,05 mol L^{-1} e uma concentração de NaOH de 0,2 mol L^{-1} foi escolhida para a maioria dos experimentos neste trabalho.

5.5. Estabilidade coloidal de AuNPs

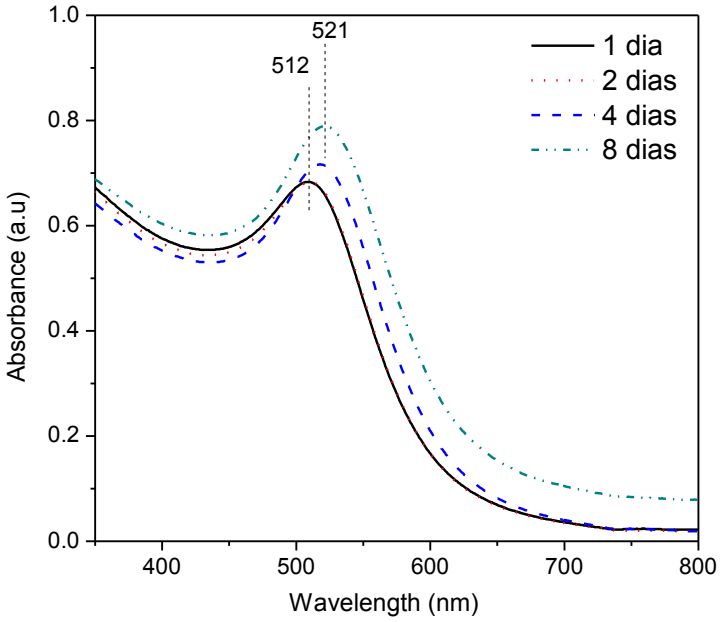
As propriedades óticas, eletrônicas e catalíticas das AuNPs são estreitamente dependentes da sua estabilidade coloidal ou grau de agregação ou dispersão. Isto também implica que a estabilidade coloidal de AuNPs sem uso de surfactantes deve ser um fator importante na determinação da eficácia do seu uso em catálise ou aplicação biomédica. Assim, realizou-se um estudo pormenorizado da estabilidade coloidal das AuNPs sintetizadas sem usar

estabilizantes/surfactantes como função do tempo, aquecimento pós-síntese e força iónica do meio como discutido abaixo.

5.5.1. Estabilidade coloidal de AuNPs em função do tempo

A estabilidade coloidal de AuNPs preparadas utilizando glicerol como agente redutor e estabilizador foi estudada em função do tempo. A Figura 71 mostra a evolução temporal dos espectros de absorção eletrónica de AuNPs até 8 dias depois da sua síntese. A posição das bandas LSPR características de AuNPs esféricas centradas em 512 nm e a forma ou largura do espectro não mostram alteração após dois dias mostrando que as partículas sintetizadas são completamente estáveis em pelo menos até 02 dias. Um ligeiro deslocamento batocrômico da posição da banda LSPR e aumento na absorção acima de 600 nm é observado após 04 dias e estas alterações tornam-se mais proeminentes após 08 dias, indicando aglomeração de AuNPs (143) como resultado da perda de estabilidade coloidal com o tempo.

Figura 71 - Evolução temporal dos espectros de absorção UV-visível da mesma amostra de AuNPs adquiridas em vários intervalos de tempo após a sua síntese. Condições: 1 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 2 mL de glicerol; 0,04 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 3 mL



Fonte: Autoria própria

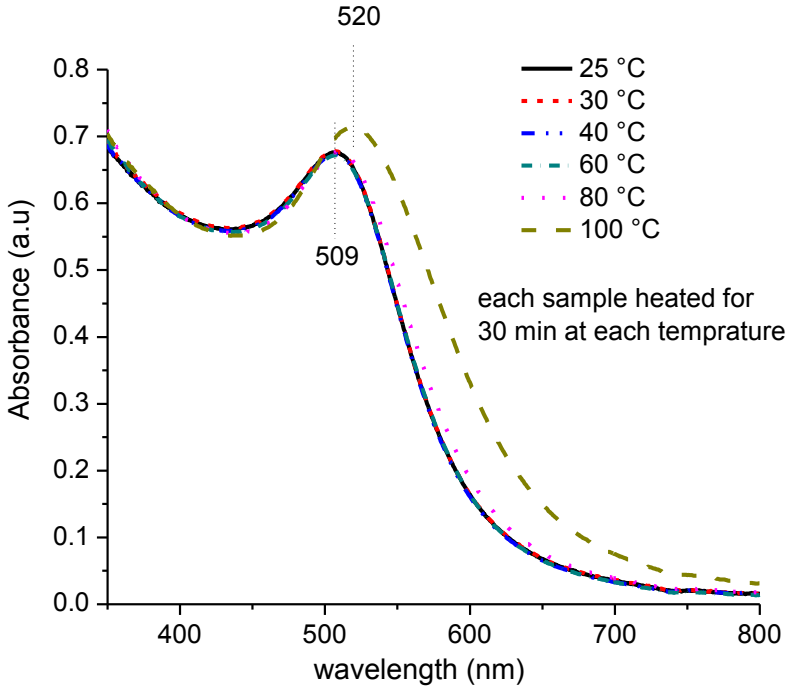
Parece que as partículas estabilizadas com glicerol move-se lentamente uma para a outra até um momento em que elas se aproximam o suficiente para começar a aglomerar e formar partículas maiores que absorvem no maior comprimento de onda. O aumento na absorção acima de 600 nm é devido a uma maior contribuição do espalhamento para a extinção ótica de AuNPs em comparação com a sua absorção a medida que aumenta o tamanho de partículas devido à sua aglomeração (143).

5.5.2. Estabilidade coloidal em função do aquecimento pós-síntese

Além de estudar o efeito da temperatura durante a síntese de AuNPs, também se estudou o efeito do aquecimento pós-síntese sobre a estabilidade coloidal de AuNPs estabilizadas com glicerol. As partículas sintetizadas foram submetidas a um aquecimento a diferentes temperaturas (25 °C a 100 °C) durante 30 minutos e os espectros eletrônicos registrados (Figura 72). A Figura 72 mostra que os espectros eletrônicos de AuNPs não sofreram alteração de forma ou posição após o aquecimento até 60 ˚C e apenas uma ligeira alteração ao aquecer a 80 ˚C durante 30 minutos. Apenas após a ebulição da suspensão aquosa de AuNPs durante 30 minutos, as AuNPs perdem a sua estabilidade e começam a aglomerar como indicado por um deslocamento batocrômico da posição da banda LSP_T de 510 nm a 520 nm e aumento do sinal de espalhamento.

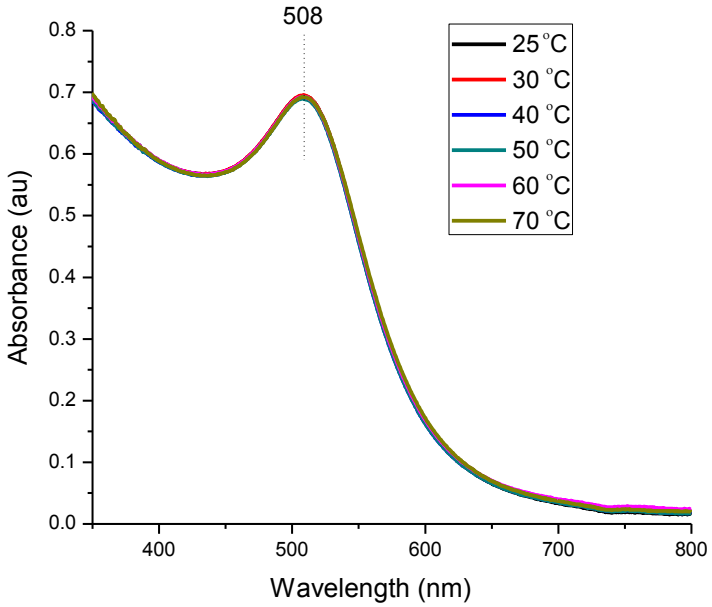
Isto mostra que o aquecimento pós-síntese tem menor efeito no tamanho e estabilidade das partículas em comparação com o aquecimento da mistura reacional durante a síntese de AuNPs (ver Figura 67). Ao aumentar a temperatura da suspensão coloidal acima de 70 °C, a colisão entre o nanosol de ouro aumenta significativamente por causa de uma diminuição da viscosidade e aumento dos movimentos de partículas, em consequência do qual se formam partículas maiores que absorvem em uma região de comprimento de onda um pouco maior do espectro visível. Os espectros de suspensão de AuNPs aquecidos a diferentes temperaturas durante 10 min também não mostram qualquer alteração (Figura 73).

Figura 72 - Espectro de absorção UV-visível da suspensão de AuNPs após aquecimento a diferentes temperaturas durante 30 minutos cada; Condições: 2 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 4 mL de glicerol; 0,08 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 6 mL



Fonte: Autoria própria

Figura 73 - Estabilidade coloidal de AuNPs em função da temperatura. As amostras foram aquecidas durante 10 minutos a cada temperatura.

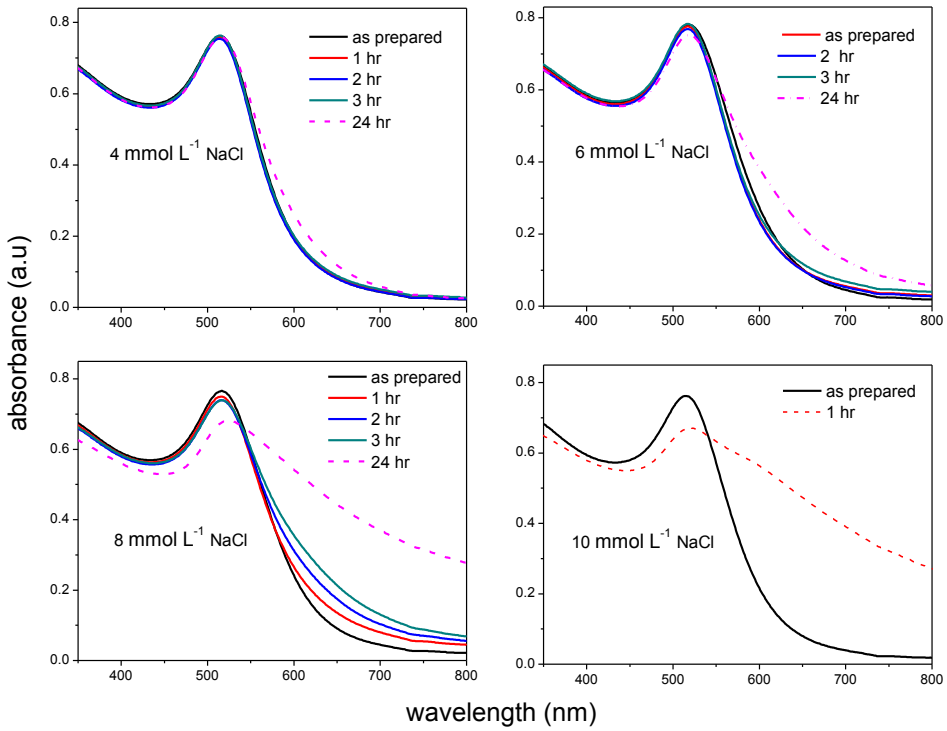


Fonte: Autoria própria

5.5.3. Estabilidade coloidal em função da concentração de sal

Uma vez que algumas das aplicações biológicas de AuNPs envolvem a utilização de meios de cultura de células com elevado teor de sais, o efeito da concentração de sal sobre a estabilidade de AuNPs coloidais foi estudado pela adição de diferentes quantidades de NaCl à suspensão de AuNPs e tendo os espectros UV-vis a vários intervalos após a adição de sal (Figura 74). A Figura 74a mostra que as partículas permanecem estáveis até 24h na presença de NaCl 4 mmol L^{-1}. De forma semelhante, a partícula apresenta boa tolerância a 6 mM de NaCl até 3h e observam-se alterações espectrais indicando aglomeração de partículas após 24h (Figura 74b). Para concentração de sal acima de 6 mmol L^{-1}, ocorre uma aglomeração significativa de AuNPs dentro de uma hora da síntese (Figura 74c e Figura 74d).

Figura 74 - Evolução temporal dos espectros de absorção UV-visível da suspensão de AuNPs na presença de diferentes quantidades de NaCl adicionadas as AuNPs coloidais; Condições: 2 mL de $HAuCl_4$ (7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}); 4 mL de glicerol; 0,08 mL de NaOH (0,2 mol L^{-1}); Volume total ~ 6 mL



Fonte: Autoria própria

5.6. Conclusões:

No presente estudo, utilizando o glicerol tanto como agente redutor quanto como agente estabilizador, não só substituímos o $NaBH_4$ e outros agentes redutores tóxicos pelo glicerol, um agente redutor mais ecológico e de baixo custo, mas também conseguimos a formação de AuNPs bem dispersas e estáveis e com uma distribuição de tamanhos razoavelmente boa sem usar nenhum ligantes ou surfactante, simplesmente explorando a viscosidade do glicerol. Um estudo detalhado dos parâmetros de síntese mostrou que a proporção de glicerol: água, pH e temperatura da síntese afeta fortemente o tamanho de partículas e a estabilidade coloidal de AuNPs. A capacidade de redução e o poder de estabilização do glicerol dependem do pH e a % do teor de glicerol do meio reacional, respectivamente. Uma vez que não se utilizou agente estabilizante externo, o procedimento é simples, económico e ambientalmente seguro, e pode ser utilizado para sintetizar AuNPs e outras nanopartículas metálicas, livres dos ligantes, por exemplo para utilização em catálise e aplicações biológicas. No entanto, estudos adicionais são necessários para colocar estas AuNPs estabilizadas com glicerol para uso prático, uma vez que a tarefa é um desafio.

Capítulo 6

Conclusões

6. Conclusões

Nesta tese, nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos e formas foram preparadas com sucesso empregando glicerol (bruto e puro) como agente de redução (e estabilizador).

Em primeiro lugar, forma preparadas nanobastões de ouro (AuNRs) utilizando CTAB como surfacatnte e glicerol com agente redutor. Devido às propriedades óticas dependentes do formato/forma das AuNRs, que são importantes para muitas aplicações, a formação de AuNRs é uma área de pesquisa ainda muito ativa. No presente estudo, relatamos pela primeira vez um método *one-pot* e sem semente (*seedless*) baseado na utilização de glicerol como agente redutor para a preparação de AuNRs. Demonstrou-se que a formação de partículas sementes e o crescimento das mesmas ocorrem na mesma solução, levando à formação de AuNRs na presença de CTAB e assim o número de passos necessários para a formação de AuNRs foi reduzido de dois para um. Não só substituímos $NaBH_4$ ou hidrazina pelo glicerol como um agente redutor mais ecológico e de baixo custo, mas também conseguimos a formação de AuNRs monocristalinos com rendimento muito elevado (~ 100%). O glicerol em meio alcalino atua como agente redutor ajustável e dependente do pH. A razão de aspectos (AR) e o rendimento de AuNRs mostraram uma clara dependência do pH e da temperatura da mistura reacional bem como da concentração de $AgNO_3$ adicionado como um reagente auxiliar. Mostramos como o ARs (2 a 6), o rendimento (22 a 99%) e a banda de absorção LSP (620 a 1200 nm) das AuNRs são controlados utilizando estes parâmetros de síntese. As AuNRs puras com quase nenhuma partícula esférica são obtidos à temperatura ambiente (25-30 °C) sob condições de crescimento de partículas lentas conseguidas usando ambiente de redução suave (pH 11–12). Com um pH mais elevado (pH 13–14) e a temperaturas superiores a 50°C, a formação de AuNRs começa dentro de 1 hora de reação, mais rapidamente do que a pH 11, mas tanto a AR quanto o rendimento das AuNRs diminuem (27 a 50%). Uma pequena quantidade de $AgNO_3$ é necessária para a formação de AuNRs. A análise de HRTEM mostrou a formação de estrutura monocristalina perfeita do tipo fcc e sem quaisquer falhas estruturais e com [001] como direção de crescimento axial. A novidade do método de síntese de AuNRs relatado aqui consiste na simplicidade do método (sem instrumentos especiais, sem controle rigoroso da temperatura), alto rendimento das AuNRs (~99%), custo-eficácia (glicerol é um reagente

químico de baixo custo e abundante e também ambientalmente seguro). Este novo método ecológico pode ainda ser melhorado para a síntese de AuNRs e outras nanopartículas metálicas utilizando glicerol como um reagente de baixo custo abundantemente disponível.

Numa outra parte de tese, foram preparadas nanopartículas de ouro (AuNPs) de tamanho menor que 10 nm empregando glicerol bruto como agente redutor). A formação de AuNPs esféricas e quase monodispersas de cerca de 8 nm foi alcançada, pela primeira vez, utilizando o glicerol bruto (CG) como recebido da planta de biodiesel. Como prova de conceito, foram utilizadas duas amostras diferentes de glicerol bruto com diferentes teores de glicerol (65% e 73%) e diferentes níveis (baixa e alta) e tipos (orgânicos e inorgânicos) de impurezas para preparar AuNPs. Nossos resultados mostram que o CG (contendo sais, umidade e uma variedade de ácidos graxos e ésteres), após simples filtração através de um filtro de 0,2 μm, é tão eficaz quanto o glicerol comercial na produção de AuNPs quase monodispersas e as impurezas presentes no GC não afetam a distribuição de tamanho das AuNPs resultantes. A distribuição de tamanhos é principalmente controlada pela concentração de agentes estabilizadores e o próprio glicerol ou as impurezas presentes nele parecem não ter nenhum papel na estabilização das partículas. Tanto o PVP quanto o PDAC, além de estabilizar as AuNPs, também atuam como agentes redutores em meios alcalinos, embora muito mais fracos que o glicerol. A uma concentração fixa de agente de estabilizador, o pH da solução não afeta a distribuição de tamanho de partícula, mas afeta significativamente o número de partículas formadas e a velocidade de sua formação. O método de síntese desenvolvido permite a formação de AuNP uniformemente distribuídas de cerca de 7,0±1,5 nm sob amplas faixas de concentração de glicerol (0,1–0,4 mol L^{-1}) e concentração de OH^- (0,1–0,4 mol L^{-1}) utilizando 1,0% de concentração de agentes estabilizadores. Este estudo abre novas possibilidades para a preparação ecologicamanete correta de nanopartículas metálicas utilizando como agente redutor o CG, um reagente barato, não tóxico e biodegradável.

Ainda numa outra parte de tese, foram preparadas nanopartículas de ouro (AuNPs) de tamanho menor que 10 nm empregando glicerol similtaneamente como agente redutor e establizador. No presente estudo, utilizando o glicerol tanto como agente redutor quanto

como agente estabilizador, não só substituímos o $NaBH_4$ e outros agentes redutores tóxicos pelo glicerol, um agente redutor mais ecológico e de baixo custo, mas também conseguimos a formação de AuNPs bem dispersas e estáveis e com uma distribuição de tamanhos razoavelmente boa sem usar nenhum ligantes ou surfactante, simplesmente explorando a viscosidade do glicerol. Um estudo detalhado dos parâmetros de síntese mostrou que a proporção de glicerol: água, pH e temperatura da síntese afeta fortemente o tamanho de partículas e a estabilidade coloidal de AuNPs. A capacidade de redução e o poder de estabilização do glicerol dependem do pH e a % do teor de glicerol do meio reacional, respectivamente. Uma vez que não se utilizou agente estabilizante externo, o procedimento é simples, económico e ambientalmente seguro, e pode ser utilizado para sintetizar AuNPs e outras nanopartículas metálicas, livres dos ligantes, por exemplo para utilização em catálise e aplicações biológicas. No entanto, estudos adicionais são necessários para colocar estas AuNPs estabilizadas com glicerol para uso prático, uma vez que a tarefa é um desafio.

7. Referência

1.BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1759–1782, 2009.

2.MURPHY, C.J.; GOLE, A.M.; STONE, J.W.; SISCO, P.N.; ALKILANY, A.M.;GOLDSMITH, E.C.; BAXTER, S.C. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, p. 1721–1730, 2008.

3.MEI, L.; PEI-HUI, Y.; JI-YE, C. Optical properties and biomedical application of gold nanorods. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, v. 36, p. 1402–1407, 2009.

4.HUANG, X.; EL-SAYED, I.H.; EL-SAYED, M.A. Applications of gold nanorods for cancer imaging and photothermal therapy In: Grobmyer S., Moudgil B. (Eds.) Cancer Nanotechnology. **Methods in Molecular Biology**, v. 624, p. 343–357, 2010.

5.DREADEN, E.C.; AUSTIN, L. A.; MACKEY, M. A.; EL-SAYED, M.A. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 3, n. 4, p. 457–478, 2012.

6.ARVIZO,R.R.; BHATTACHARYYA, S.; KUDGUS, R.A.; G. KARUNA; BHATTACHARYA. R.; MUKHERJEE, P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2943–2970, 2012.

7.KAH, J.C.Y.; YEO, E.L.L.; HE, S; ENGUDAR, G. Gold nanorods in photomedicine. In: HAMBLIN, M.; AVCI, P. (Ed.). **Applications of nanoscience in photomedicine.** Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 221–248.

8.JOSEPH, M.M.; SREELEKHA, T.T. Gold nanoparticles - synthesis and applications in cancer deliver. **Recent Patents on Materials Science**, v. 7, n. 1, p. 8–25, 2014.

9.HUANG, X.; EL-SAYED, M. A; Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 1, p. 13–28, 2010.

10.CAI, W.; GAO, T.; HONG, H.; SUN, J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnolgy. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 1, p. 17–32, 2008.

11.FREESTONE, I.; MEEKS, N.; SAX, M.; HIGGITT, C. The lycurgus cup - a roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 270–277, 2007.

12.XIONG, Y.; LU, X. **Metallic nanostructures**: from controlled synthesis to applications. Heidelberg Springer, 2015. p. 301

13.BARBER, D.J.; FREESTONE, I.C. An investigation of the origin of the colour of the lycurgus cup by analytical transmission electron microscopy. **Archaeometry**, v. 32, n. 1, p. 33–45, 1990.

14.KUMAR, C.S.S.R. **UV-VIS and photoluminescence spectroscopy for nanomaterials Characterization**. Heidelberg: Springer 2013. p. 3–4.

15.SAINT-LAGER, M.C.; LAOUFI, I.; BAILLY, A.; ROBACH, O.; GARAUDEE, S.; DOLLE, P. Catalytic properties of supported gold nanoparticles: new insights into the size-activity relationship gained from in operando measurements. **Faraday Discussions**, v. 152, p. 253–265, 2011.

16.MISTRY, H.; RESKE, R.; ZENG, Z.; ZHAO, Z.J.; GREELEY, J.; STRASSER, P.; CUENYA, B.R. Exceptional size-dependent activity enhancement in the electroreduction of CO_2 over Au nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 47, p. 16473–16476, 2014.

17.BURDA, C.; CHEN, X.; NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M. A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1025–102, 2005.

18.DAS, I.; ANSARI, S.A. Nanomaterials in science and technology. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 68, p. 657–667, 2009.

19.DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 293–346, 2004.

20.HVOLBÆK, B.; JANSSENS, T.V.W.; CLAUSEN, B.S. Catalytic activity of Au nanoparticles. **Nano Today**, v. 2, n. 4, p. 14–18, 2007.

21.KOTANI, H.; HANAZAKI, R.; OHKUBO, K.; YAMADA, Y.; FUKUZUMI, S. Size- and shape-dependent activity of metal nanoparticles as hydrogen-evolution catalysts: mechanistic insights into photocatalytic hydrogen evolution. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 17, p. 2777–2785, 2011.

22.CUENYA, B.R. Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. **Thin Solid Films**, v. 518, p. 3127–3150, 2010.
23.HEBIÉ, S.; KOKOH, K.B.; SERVAT, K.; NAPPORN, T.W. Shape-dependent electrocatalytic activity of free gold nanoparticles toward glucose oxidation. **Gold Bulletin**, v. 46, n. 4, p. 311–318, 2013.
24.EL-BROLOSSY, T. A.; ABDALLAH, T.; MOHAMED, M.B.; ABDALLAH, S.; EASAWI, K.; NEGM, S. Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique. **The European Physical Journal Special Topics**, v. 153, n. 1, p. 361–364, 2008.
25.KELLY, K.L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2003.
26.CHIU, C.-Y.; CHUNG, P.-J.; LAO, K.-U.; LIAO, C.-W.; HUANG, M.H. Facet-dependent catalytic activity of gold nanocubes, octahedra, and rhombic dodecahedra toward 4-nitroaniline reduction. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 44, p. 23757–23763, 2012.
27.NÜTZENADEL, C.; ZÜTTEL, A.; CHARTOUNI,D.; SCHMID,G.; SCHLAPBACH,L. Critical size and surface effect of the hydrogen interaction of palladium clusters. **The European Physical Journal D - Atomic, Molecular and Optical Physics**, v. 8, n. 2, p. 245–250, 2000.
28.MUDUNKOTUWA, I. A.; GRASSIAN, V.H. The devil is in the details (or the surface): impact of surface structure and surface energetics on understanding the behavior of nanomaterials in the environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 5, p. 1135, 2011.
29.CLAUS, P.; HOFMEISTER, H. Electron microscopy and catalytic study of silver catalysts: structure sensitivity of the hydrogenation of crotonaldehyde. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 14, p. 2766–2775, 1999.
30.BAR-ILAN, O.; ALBRECHT, R.M.; FAKO, V. E.; FURGESON, D.Y. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 5, n. 16, p. 1897–910, 2009.

31.CHEN, X.; ZHAO, D.; AN, Y.; SHI, L.; HOU, W.; CHEN, L. Catalytic properties of gold nanoparticles immobilized on the surfaces of nanocarriers. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1877–1887, 2009.
32.NALAWADE, P.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S. Green synthesis of gold nanoparticles using glycerol as a reducing agent. **Advances in Nanoparticles**, v. 2013, p. 78–86, 2013.
33.LÜ, X.; SONG, Y.; ZHU, A.; WU, F.; SONG, Y. Synthesis of gold nanoparticles using cefopernazone as a stabilizing reagent and its application. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 11, p. 11236–11245, 2012.
34.SAHA, K.; AGASTI, S.S.; KIM, C.; LI, X.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739–2779, 2012.
35.HUTTER, E.; MAYSINGER, D. Gold nanoparticles and quantum dots for bioimaging. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 7, p. 592–604, 2011.
36.CHEN, P.C.; MWAKWARI, S.C.; OYELERE, A.K. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 1, p. 45–65, 2008.
37.TIWARI, P.; VIG, K.; DENNIS, V.; SINGH, S. Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 1, n. 1, p. 31–63, 2011.
38.ZHANG, Y.; YU, J.; BIRCH, D. J. S.; CHEN, Y. Gold nanorods for fluorescence lifetime imaging in biology. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 2, p. 205041–3, 2013.
39.CHOI, J.; YANG, J.; JANG, E.; SUH, J.-S.; HUH, Y.-M.; LEE, K.; HAAM, S. Gold nanostructures as photothermal therapy agent for cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 953–64, 2011.
40.SAMIM, M.M.; PRASHANT, C.K.; DINDA, A.K.; MAITRA, A.N.; ARORA, I. Synthesis and characterization of gold nanorods and their application for photothermal cell damage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1825–1831, 2011.
41.EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. 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. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 2006.
42.WILLETS, K.A.; DUYNE, R.P. V. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. **The Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, p. 267–297, 2007.

43.BOHREN, C.F.; HUFFMAN, D.R. **Absorption and scattering of Light by small particles**. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998. 530 p.
44.LINK, S.; EL-SAYED, M.A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 21, p. 4212, 1999.
45.BLATCHFORD, C.G.; CAMPBELL, J.R.; CREIGHTON, J.A. Plasma resonance — enhanced raman scattering by absorbates on gold colloids: The effects of aggregation. **Surface Science**, v. 120, n. 2, p. 435–455, 1982.
46.CREIGHTON, J.A.; EADONT, D.G. Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 87, n. 24, p. 3881–3891, 1991.
47.LINK, S.; MOHAMED, M.B.; EL-SAYED, M.A. Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 16, p. 3073–3077, 1999.
48.NG, K.C.; CHENG, W. Fine-tuning longitudinal plasmon resonances of nanorods by thermal reshaping in aqueous media. **Nanotechnology**, v. 23, n. 10, p. 105602, 2012.
49.KIM, J.-Y.; AH, C.S.; JANG, D.-J. Controlled aspect ratios of gold nanorods in reduction-limited conditions. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1–7, 2011.
50.ORENDORFF, C.J.; GEARHEART, L.; JANA, N. R.; MURPHY, C. J. Aspect ratio dependence on surface enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates. **Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP**, v. 8, n. 1, p. 165–70, 2006.
51.HINMAN, J.G.; STORK, A.; VARNELL, J.A.; GEWIRTH, A.; MURPHY, C. Seed mediated growth of gold nanorods: towards nanorod matryoshkas. **Faraday Discussions**, v. 191, n. 9, p. 9–33, 2016.
52.CHANG, S.-S.; SHIH, C.-W.; CHEN, C.-D.; LAI, W.-C.; WANG, C.R.C. The shape transition of gold nanorods. **Langmuir**, v. 15, p. 701–709, 1999.
53.WANG, Z.; MOHAMED, M.; LINK, S.; EL-SAYED, M A. Crystallographic facets and shapes of gold nanorods of different aspect ratios. **Surface Science**, v. 440, n. 1–2, p. L809–L814, 1999.

54.WANG, Z.L.; GAO, R.P.; NIKOOBAKHT, B.; EL-SAYED, M.A. Surface reconstruction of the unstable {110} surface in gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 23, p. 5417–5420, 2000.
55.NIKOOBAKHT, B.; EL-SAYED, M.A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 16, p. 1957–1962, 2003.
56.ANDRIEVSKII, R. A.; KHACHOYAN, A. V. Role of size-dependent effects and interfaces in physicochemical properties of consolidated nanomaterials. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 555–566, 2010.
57.ALBANESE, A.; TANG, P.S.; CHAN, WARREN, C. W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual review of biomedical engineering**, v. 14, p. 1–16, 2012.
58.HAN, J.; LIU, Y.; GUO, R. Reactive template method to synthesize gold nanoparticles with controllable size and morphology supported on shells of polymer hollow microspheres and their application for aerobic alcohol oxidation in water. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 7, p. 1112–1117, 2009.
59.DONG, S.-A.; ZHOU, S.-P. Photochemical synthesis of colloidal gold nanoparticles. **Materials Science and Engineering: B**, v. 140, n. 3, p. 153–159, 2007.
60.BOUFI, S.; VILAR, M.R.; FEREIRA, A.M.; REGO A.M.B. *In situ* photochemical generation of silver and gold nanoparticles on chitosan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 151–158, 2013.
61.GUDLUR, S.; SANDÉN, C.; MATOUŠKOVÁ, P.;FASCIANI, C.; AILI, D. Liposomes as nanoreactors for the photochemical synthesis of gold nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 456, p. 206–209, 2015.
62.MA, H.; YIN, B.; WANG, S.; JIAO, Y.; PAN, W.; HUANG, S.; CHEN, S.; MENG, F. Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method. **ChemPhysChem**, v. 5, n. 1, p. 68–75, 2004.
63.ZHANG, D.; DIAO, P. Size-controlled electrochemical synthesis of hemispherical gold nanoparticles on ITO substrates. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 755, p. 174–181, 2015.

64.TSUJI, M.; HASHIMOTO, M.; NISHIZAWA, Y.; KUBOKAWA, M.; TSUJI, T. Microwave-assisted synthesis of metallic nanostructures in solution. **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 2, p. 440–452, 2005.
65.NALAWADE, P.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S. Green synthesis of gold nanoparticles using glycerol as a reducing agent. **Advances in Nanoparticles**, v. 2, n. 2, p. 78–86, 2013.
66.GRACE, A.N.; PANDIAN, K. One pot synthesis of polymer protected gold nanoparticles and nanoprisms in glycerol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 290, n. 1–3, p. 138–142, 2006.
67.GENC, R.; CLERGEAUD, G.; ORTIZ, M.; O'SULLIVAN, C. K . Green synthesis of gold nanoparticles using glycerol-incorporated nanosized liposomes. **Langmuir**, v. 27, p. 10894–10900, 2011.
68.POLTE, J.; AHNER, T.T.; DELISSEN, F.; SOKOLOV, S.; EMMERLING, F,; THÜNEMANN, A. F.; KRAEHNERT, R. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ xanes and saxs evaluation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 4, p. 1296–1301, 2010.
69.BUSBEE, B.D.; OBARE, S.O.; MURPHY, C.J. An improved synthesis of high-aspect-ratio gold nanorods. **Advanced Materials**, v. 15, n. 5, p. 414–416, 2003.
70.JANA, N.R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Wet-chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, p. 4065–4067, 2001.
71.HUANG, H.H.; YAN, F.Q.; KEK, Y. M.; CHEW, C. H.; XU, G. Q.; JI, W.; OH, P. S.; TANG, S. H. Synthesis, characterization, and nonlinear optical properties of copper nanoparticles. **Langmuir**, v. 13, n. 2, p. 172–175, 1997.
72.YU, J.; XU, D.; NAN, H.; WANG, C.; KUN, L.; CHI, D.F . Facile one-step green synthesis of gold nanoparticles using citrus maxima aqueous extracts and its catalytic activity. **Materials Letters**, v. 166, n. 26, p. 110–112, 2016.
73.MATA, R.; BHASKARAN, A.; SADRAS, S. R. Green-synthesized gold nanoparticles from plumeria alba flower extract to augment catalytic degradation of organic dyes and inhibit bacterial growth. **Particuology**, v. 24, p. 78–86, 2016.

74.SHEDBALKAR, U.; SINGH, R.; WADHWANI, S.; GAIDHANI, S.; CHOPADE, B .A. Microbial synthesis of gold nanoparticles: current status and future prospects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 40–8, 2014.
75.NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1–2, p. 1–13, 2010.
76.PARVEEN, R.; GOMES, J.F.; ULLAH, S.; ACUÑA, J.J.S.; TREMILIOSI FILHO, G. One-pot high-yield synthesis of single-crystalline gold nanorods using glycerol as a low-cost and eco-friendly reducing agent. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 10, p. 418, 2015.
77.GARCIA, A.G.; LOPES, P.P.; GOMES, J.F.; PIRES, C.; FERREIRA, E. B.; LUCENA, R. G. M.; GASPAROTTO, L. H. S.; TREMILIOSI FILHO, G. Eco-friendly synthesis of bimetallic AuAg nanoparticles. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 2865–2873, 2014.
78.KALYAN KAMAL, S.S.; VIMALA, J.; SAHOO, P. K.; GHOSAL, P.; RAM, S.; DURAI, L. A green chemical approach for synthesis of shape anisotropic gold nanoparticles. **International Nano Letters**, v. 4, n. 2, p. 109, 2014.
79.HEBBALALU, D.; LALLEY, J.; NADAGOUDA, M.N.; VARMA, R.S. Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers, and microwaves. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1. n. 7, p. 703–712, 2013.
80.MOULTON, M.C.; BRAYDICH-STOLLE, L.K.; NADAGOUDA, M.N.; KUNZELMAN, S.; HUSSAINA, S.M.; VERMA, R.S. Synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. **Green Chemistry**, v. 2, p. 763–770, 2010.
81.LEE, Y.; LOEW, A.; SUN, S. Surface and structure dependent catalytic activity of au nanoparticles for oxygen reduction reaction. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 3, p. 755–761, 2010.
82.DYKMAN, L.A.; KHLEBTSOV, N.G. Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 2, p. 1258–1288, 2014.
83.BOND, G. Source of the catalytic activity of gold nanoparticles. **Gold Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 88–93, 2010.

84.YUAN, H.; KHOURY, C.G.; HWANG, H.; WILSON, C.M.; GRANT, G.A.; VO-D. T. Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging. **Nanotechnology**, v. 23, n. 7, p. 75102, 2012.
85.FONG, K.E.; YUNG, L.-Y.L. Localized surface plasmon resonance: a unique property of plasmonic nanoparticles for nucleic acid detection. **Nanoscale**, v. 5, n. 24, p. 12043–71, 2013.
86.GUO, J.; ARMSTRONG, M.J.; O'DRISCOLL, C.M.; HOLMES, J.D.; RAHME, K. Positively charged, surfactant-free gold nanoparticles for nucleic acid delivery. **Royal Society of Chemistry Adv.**, v. 5, n. 23, p. 17862–17871, 2015.
87.GRUBBS, R.B. Roles of polymer ligands in nanoparticle stabilization. **Polymer Reviews**, v. 47, n. 2, p. 197–215, 2007.
88.SHAN, J.; TENHU, H. Recent advances in polymer protected gold nanoparticles: synthesis, properties and applications. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4580–98, 2007.
89.GOLE, A.; MURPHY, C.J. Polyelectrolyte-coated gold nanorods: synthesis, characterization and immobilization. **Chemistry of Materials.**, v. 17, n. 6, p. 1325–1330, 2005.
90.LAI, C.-H.; WU, I.-C.; KANG, C.C.; LEE, J.-F.; HO, M.-L.; CHOU, P.-T. Homogeneous, surfactant-free gold nanoparticles encapsulated by polythiophene analogues. **Chemical Communications**, v. 15, p. 1996–1998, 2009.
91.GAO, J.; BENDER, C.M.; MURPHY, C. J. Dependence of the gold nanorod aspect ratio on the nature of the directing surfactant in aqueous solution dependence of the gold nanorod aspect ratio on the nature of the directing surfactant in aqueous solution. **Langmuir**, v. 19, n. 21, p. 9065–9070, 2003.
92.OZA, G.; PANDEY, S. Tailoring aspect ratio of gold nano rods: impact of temperature, ph, silver ions, CTAB concentration and centrifugation. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, p. 1027–1038, 2012.
93.WENG, G.; LI, J.; ZHU, J.; ZHAO, J. Plasmonic sensing of CTAB in gold nanorods solution based on cu(ii) ions-medited H_2O_2 etching effect. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, p. 2728–2738, 2014.
94.SMITH, D.K.; KORGEL, B.A. The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-

mediated synthesis of gold nanorods. **Langmuir**, v. 24, n. 3, p. 644–649, 2008.
95.LI, N.; ZHAO, P.; ASTRUC, D. Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 7, p. 1756–1789, 2014.
96.GARG, N.; SCHOLL, C.; MOHANTY, A.; JIN, R. The role of bromide ions in seeding growth of Au nanorods. **Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 26, n. 12, p. 10271–6, 2010.
97.LIU, M.; GUYOT-SIONNEST, P. Mechanism of silver(I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 109, n. 47, p. 22192–200, 2005.
98.JANA, N.R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. **Advanced Materials**, v. 13, n. 18, p. 1389–1393, 2001.
99.ZHOU, M.; WANG, B.; ROZYNEK, Z.; XIE, Z.; FOSSUM, J.O.; YU, X.; RAAEN, S. Minute synthesis of extremely stable gold nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 20, n. 50, p. 505606, 2009.
100.SUN, Y.; MAYERS, B.; HERRICKS, T.; XIA, Y. Polyol synthesis of uniform silver nanowires: a plausible growth mechanism and the supporting evidence. **Nano Letters**, v. 3, n. 7, p. 955–960, 2003.
101.KAN, C.; CAI, W.; LI, C.; ZHANG, L. Optical studies of polyvinylpyrrolidone reduction effect on free and complex metal ions. **Journal of Material Research**, v. 20, n. 2, p. 320–324, 2005.
102.ULLAH, M.H.; HOSSAIN, T.; HA, C.-S. Kinetic studies on water-soluble gold nanoparticles coordinated to poly(vinylpyrrolidone): isotropic to anisotropic transformation and morphology. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 21, p. 6988–6997, 2011.
103.WU, C.; MOSHER, B.P.; LYONS,K.; ZENG, T. Reducing ability and mechanism for polyvinylpyrrolidone (pvp) in silver nanoparticles synthesis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 4, p. 2342–2347, 2010.
104.WANG, H.;QIAO, X.; CHEN, J.; WANG, X.; DING, S. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 94, n. 2–3, p. 449–453, 2005

105.LOPEZ-SANCHEZ, J. A; DIMITRATOS, N.; HAMMOND, C.; BRETT, G. L.; KESAVAN, L.; WHITE, S.; MIEDZIAK, P.; TIRUVALAM, R.; JENKINS, R.L.; CARLEY, A.F.; KNIGHT, D.; KIELY, C. J.; HUTCHINGS, G. J. Facile removal of stabilizer-ligands from supported gold nanoparticles. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 551–556, 2011.
106.LI, D.; WANG, C.; TRIPKOVIC,D.; SUN,S.; MARKOVIC,N.M.; STAMENKOVIC ,V.R. Surfactant removal for colloidal nanoparticles from solution synthesis: the effect on catalytic performance. **ACS Catalysis**, v. 2, n. 7, p. 1358–1362, 2012.
107.KAWASAKI, H. Surfactant-free solution-based synthesis of metallic nanoparticles toward efficient use of the nanoparticles surfaces and their application in catalysis and chemo-/biosensing. **Nanotechnology Reviews**, v. 2, n. 1, p. 5–25, 2013.
108.SAKAI, T.; ENOMOTO, H.; TORIGOE, K.; SAKAI, H.; ABE, M. Surfactant and reducer free synthesis of gold nanoparticles in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 347, n. 1–3, p. 18–26, 2009.
109.CUBILLANA-AGUILERA, L.M.; FRANCO-ROMANO, M.; GIL, M.L.A.; NARANJO.-R.I.DE CISNEROS.; J.L HIDALGO-HIDALGO.; PALACIOS-S, J .M. New, fast and green procedure for the synthesis of gold nanoparticles based on sonocatalysis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 3, p. 789–94, 2011.
110.PATEL, J.; NĚMCOVÁ, L.; MAGUIRE, P,; GRAHAM, W.G,;MARIOTTI, D. Synthesis of surfactant-free electrostatically stabilized gold nanoparticles by plasma-induced liquid chemistry. **Nanotechnology**, v. 24, n. 24, p. 245604, 2013.
111.GILL, R.; GÖEKEN, K.; SUBRAMANIAM, V. Fast, single-step, and surfactant-free oligonucleotide modification of gold nanoparticles using DNA with a positively charged tail. **Chemical communications** , v. 49, n. 97, p. 11400–2, 2013.
112.SCHULZ-DOBRICK, M.; SARATHY, K.V.; JANSEN, M. Surfactant-free synthesis and functionalization of gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 37, p. 12816–12817, 2005.
113.GASPAROTTO, L.H.S.; GARCIA, A.C.; GOMES, J.F.; TREMILIOSI FILHO, G. Electrocatalytic performance of environmentally friendly synthesized gold nanoparticles towards the borohydride electro-oxidation reaction. **Journal of Power Sources**, v. 218, p. 73–78, 2012.
114.GARCIA, A.C.; GASPAROTTO, L.H.S.; GOMES, J.F.; TREMILIOSI FILHO, G. Straightforward

synthesis of carbon-cupported Ag nanoparticles and their application for the oxygen reduction reaction. **Electrocatalysis**, v. 3, n. 2, p. 147–152, 2012.
115.GOMES, J.F.; GARCIA, A.C.; FERREIRA, E. B.; PIRES, C.; OLIVEIRA, V. L.; TREMILIOSI FILHO, G.; GASPAROTTO, L. H. S. New insights into the formation mechanism of ag, au and agau nanoparticles in aqueous alkaline media: alkoxides from alcohols, aldehydes and ketones as universal reducing agents. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 17, n. 33, p. 21683–21693, 2015.
116.GARCIA, A.C.; GASPAROTTO, L.H.S.; GOMES, J.F.; TREMILIOSI FILHO,G. Straightforward synthesis of carbon-supported ag nanoparticles and their application for the oxygen reduction reaction. **Electrocatalysis**, v. 3, n. 2, p. 147–152, 2012.
117.PARVEEN, R.; TREMILIOSI FILHO, G. A step ahead towards the green synthesis of monodisperse gold nanoparticles: the use of crude glycerol as a greener and low-cost reducing agent. **RSC Advances.**, v. 6, n. 97, p. 95210–95219, 2016.
118.ZHOU, C.-H.C.; BELTRAMINI, J.N.; FAN, Y.-X.; LU, G. Q.M. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society reviews**, v. 37, n. 3, p. 527–49, 2008.
119.AYOUB, M.; ABDULLAH, A.Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2671–2686, 2012.
120.TAN, H.W.; ABDUL AZIZ, A.R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118–127, 2013.
121.CUI, M.-S.; DENG, J.; LI, X.-L.; FU,Y. Production of 4-hydroxymethylfurfural from derivatives of biomass-derived glycerol for chemicals and polymers. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 3, p. 1707–1714, 2016.
122.FERREIRA, E.B.; GOMES, J.F.; TREMILIOSI FILHO,G.; GASPAROTTO, L. H.S. One-pot eco-friendly synthesis of gold nanoparticles by glycerol in alkaline medium: Role of synthesis parameters on the nanoparticles characteristics. **Materials Research Bulletin**, v. 55, p. 131–136, 2014.

123.SAU, T.K.; MURPHY, C.J. Seeded high yield synthesis of short au nanorods in aqueous solution. **Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 20, n. 15, p. 6414–20, 2004.
124.WEST, A.R. **Solid state chemistry and its applications**. New York: Wiley, 1984. p. 584.
125.AL-THABAITI, S.A.; HUSSAIN, J.I.; ATHAR, A.H.; KHAN, Z. Au (III)-surfactant complex-assisted anisotropic growth of advanced platonic au-nanoparticles. Canadian Chemical Transactions, v. 1, n. 4, p. 238–252, 2013.
126.GOLE, A.; MURPHY, C.J. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 19, p. 3633–3640, 2004.
127.KANG, S.K.; CHAH, S.; YUN, C.Y.; YI, J. Aspect ratio controlled synthesis of gold nanorods. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 6, p. 1145–1148, 2003.
128.SHEKHAR**, HIMANSHU Thermodynamics of gold nanoparticle growth : A first-principles investigation.** 2013. 58f. Bachelor Thesis-Department of Applied Physics, Materials and Surface Theory, Chalmer University of Technology, Goteborg, Sweden, 2013.
129.MARKS, L. Experimental studies of small particle structures. **Reports on Progress in Physics**, v. 57,n. 6, p. 603–649, 1994.
130.CARBÓ-ARGIBAY, E.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, B.; GÓMEZ-GRAÑA, S.; GUERRERO-MARTÍNEZ, A.; PASTORIZA-SANTOS, I.; PÉREZ-JUSTE, J. LIZ-MARZÁN, L.M. The crystalline structure of gold nanorods revisited: Evidence for higher-index lateral facets. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 49, p. 9397–9400, 2010.
131.ZHANG, L.; XIA, K.; LU, Z.; LI, G.; CHEN, J. DENG, Y. LI, SONG.; ZHOU, F.; HE, N. Efficient and facile synthesis of gold nanorods with finely tunable plasmonic peaks from visible to near-IR range. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 5, p. 1794–1798, 2014.
132.XIAO, J.; QI, L. Surfactant-assisted, shape-controlled synthesis of gold nanocrystals. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1383–1396, 2011.
133.MURPHY, C.J.; SAU, T.K.; GOLE, A.M.; ORENDORFF, C.J.; GAO, J.; GOU, L.; HUNYADI, S.E.; LI, T. Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 109, n. 29, p. 13857–70, 2005.

134.SALAMAKHA, L.P.; BAUER, E.; MUDRYI, S.I.; GONCALVES, A.P.; ALMEIDA, M.; NOEL, H. Isothermal section of the Ce-Au-Sb system at 870 K. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 479, p. 184–188, 2009.
135.JOHNSON, C.J.; DUJARDIN, E.; DAVIS, S.A.; MURPHY, C.J.; MANN, S. Growth and form of gold nanorods prepared by seed-mediated, surfactant-directed synthesis. **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 1765–1770, 2002.
136.HOPPE, C.E.; LAZZARI, M.; PARDIÑAS-BLANCO, I.; LÓPEZ-QUINTELA, M.A. One-step synthesis of gold and silver hydrosols using poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) as a reducing agent. **Langmuir**, v. 22, n. 16, p. 7027–34, 2006.
137.CHEN, H.; WANG, Y.; WANG, Y.; DONG, S.; WANG, E. One-step preparation and characterization of PDDA-protected gold nanoparticles. **Polymer**, v. 47, n. 2, p. 763–766, 2006.
138.MERK, V.; REHBOCK, C.; BECKER, F.; HAGEMANN, U.; NIENHAUS, H.; BARCIKOWSKI, S. In situ non-DLVO stabilization of surfactant-free, plasmonic gold nanoparticles: Effect of Hofmeister's anions. **Langmuir**, v. 30, n. 15, p. 4213–4222, 2014.
139.YE, Y.; LV, M.; ZHANG, X.; ZHANG, Y. Colorimetric determination of copper(II) ions using gold nanoparticles as a probe. **RSC Advances**, v. 5, n. 124, p. 102311–102317, 2015.
140.AGARWAL, S.; MISHRA, P.; SHIVANGE, G.; KODIPELLI, N.; MOROS, M.; FUENTE, J.M.; ANINDYA, R. Citrate-capped gold nanoparticles for the label-free detection of ubiquitin C-terminal hydrolase-1. **The Analyst**, v. 140, n. 4, p. 1166–1173, 2015.
141.BROWN, K.R.; WALTER, D.G.; NATAN, M.J. Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions. 2. improved control of particle size and shape. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 2, p. 306–313, 2000.
142.SEGUR, J.B.; OBERSTAR, H.E. Viscosity of glycerol and its aqueous solutions. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2117–2120, 1951.
143.MURRAY, B.W.A.; BARNES, W.L. Plasmonic materials. **Advanced Materials**, v. 19, p. 3771–3782, 2007.