

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

HENRIQUE FRULANI DE PAULA BARBOSA

**Uso do 2º harmônico do laser Nd:YAG na síntese fotoquímica de
nanopartículas de ouro**

**São Carlos
2018**

HENRIQUE FRULANI DE PAULA BARBOSA

Uso do 2º harmônico do laser Nd:YAG na síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro

Versão Corrigida, Original na Unidade

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador(a): Prof. Dr. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro

**São Carlos
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

B238u Barbosa, Henrique Frulani de Paula
 Usu do 2º harmônico do laser Nd:YAG na síntese
 fotoquímica de nanopartículas de ouro / Henrique
 Frulani de Paula Barbosa; orientadora Carla Cristina
 Schmitt Cavalheiro. São Carlos, 2018.

 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
 em Ciência e Engenharia de Materiais e Área de
 Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e
 Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
 Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

 1. Nanopartículas de ouro. 2. Laser. 3.
 Biopolímeros. I. Título.

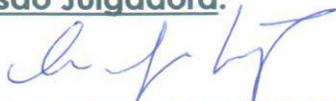
FOLHA DE JULGAMENTO

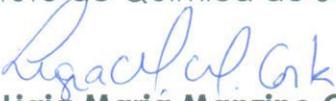
Candidato: Engenheiro **HENRIQUE FRULANI DE PAULA BARBOSA.**

Título da dissertação: "Uso do 2º harmônico do laser Nd:YAG na síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro".

Data da defesa: 24/01/2018.

Comissão Julgadora:


Prof. Associada **Carla Crisistina Schmitt Cavalheiro**
(Orientadora)
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)


Dra. **Ligia Maria Manzine Costa**
(Pós Doutoranda/CAPES)


Prof. Titular **Miguel Guillermo Neumann**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Resultado:

 Carla Crisistina Schmitt Cavalheiro Aprovado

 Ligia Maria Manzine Costa APROVAD

 Miguel Guillermo Neumann APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, João e Aparecida,
à minha irmã, Julia,
à minha namorada, Alessandra,
e a todos meus amigos.**

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro pela oportunidade, orientação, confiança e amizade.

Aos amigos do Grupo de Fotoquímica pela amizade, apoio e conselhos.

À Escola de Engenharia de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade de São Paulo.

Enfim, à todos que de alguma maneira colaboraram para a execução desse trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

EPÍGRAFE

O verdadeiro conhecimento existe ao saber que você não sabe nada.

Sócrates

RESUMO

BARBOSA, H. F. P. **Uso do 2º harmônico do laser Nd:YAG na síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro.** 94 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

No presente trabalho nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de irradiação por laser utilizando comprimento de onda de 532 nm, não reportado ainda na literatura. Uma solução aquosa de ácido tetracloroáurico foi irradiada pelo laser no comprimento de onda descrito por até 4 h e a formação das nanopartículas foi observada não só pela mudança da coloração da solução para vermelho/róseo como também pelos espectros de absorção, pela análise de espalhamento dinâmico de luz, pela microscopia eletrônica de transmissão e pela difração de elétrons de área selecionada. Também foi estudada a síntese à partir de soluções aquosas de ácido tetracloroáurico que continham os biopolímero DNA e BSA. Em todos os casos pôde-se detectar a formação de nanopartículas de morfologia esférica, estrutura cristalina cúbica de face centrada e tamanhos médios menores que 10 nanômetros. A estabilidade das nanopartículas produzidas foi estudada por meio da variação dos tamanhos das partículas e de seus potenciais zeta por até 28 dias. Também neste trabalho determinou-se o mecanismo de redução do sal de ouro pelo método proposto. Notou-se que os grandes responsáveis por essa redução são o próprio feixe de laser e os produtos da dissociação da molécula da água pelo feixe de laser.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro. Laser. Biopolímeros.

ABSTRACT

BARBOSA, H. F. P. **Usage of Nd:YAG laser's 2nd harmonic for photochemical synthesis of gold nanoparticles.** 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

In this work gold nanoparticles were synthesized by laser irradiation with wavelength of 532 nm, not reported yet in literature. An aqueous solution of tetrachloroauric acid was irradiated by the laser for 4 hours and the nanoparticle formation was attested not just by the change in coloration to pinkish/reddish, but also by absorption spectra, dynamic light scattering, transmission electron microscopy and selected area electron diffraction. Synthesis with biopolymers DNA and BSA were also performed in this work. In all cases, the synthesized nanoparticles presented spherical shape, face centered cubic crystal structure and mean sizes lower than 10 nanometers. The stability of these nanoparticles were studied by the variation of size and zeta potential trough 28 days. Also in this work, the mechanism of gold salt reduction by the cited method was determined. It was noticed that products of the water dissociation by laser and the laser beam itself are responsible to reduce the gold salt to metallic gold.

Keywords: Gold nanoparticles. Laser. Biopolymer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de nanopartículas: nanopartículas (0D), nanobastões (1D), filmes finos (2D) e estrutura com formato de esfera ramificada (3D - formado por outras nanopartículas).....	30
Figura 2 -	Representação das abordagens <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> para síntese de nanomateriais.	31
Figura 3 -	Cálice de Licurgo a) sem fonte de luz em seu interior e b) com luz transmitida à partir de seu interior	31
Figura 4 -	Representação da RPSL em uma nanopartícula esférica (esquerda) e nanobastão (centro e direita). O nanobastão apresenta duas formas possíveis de oscilação.....	33
Figura 5 -	Exemplos de espectro de absorvância em função do comprimento de onda (λ) de diferentes tamanhos e diferentes morfologias de AuNPs ...	34
Figura 6 -	Representação do mecanismo de formação do laser. a) Representação dos componentes de um laser Nd:YAG. b) Excitação e formação do fóton do laser. Representação da alteração de estado energético dos átomos de Nd c) antes, d) durante e e), f) e g) após estímulo pela lâmpada de Xe.....	38
Figura 7 -	Representação de parte de uma dupla hélice de DNA com seus constituintes fosfato, açúcar e bases A, T, C e G.....	41
Figura 8 -	Representação da estrutura de hélices do BSA com seus 3 domínios e respectivos subdomínios. Domínio 1 - Subdomínios: vermelho e laranja. Domínio 2 – Subdomínios: cor creme e cor creme mais escura. Domínio 3 – Subdomínios: azul claro e azul mais escuro.....	43
Figura 9 -	Diagrama esquemático do processo de síntese das AuNPs por irradiação à laser com λ de 532 nm por 4 h.....	46
Figura 10 -	Espectro de absorção das amostras TV1, TV2 e TV3 após irradiação por laser com λ de 532 nm por 20 min.....	52
Figura 11 -	Espectro de absorção das amostras TC1, TC2 e TC3 após irradiação por laser com λ de 532 nm por 20 min.	53
Figura 12 -	Distribuição de tamanhos das AuNPs formadas pelas amostras a) TC1, b) TC2 e c) TC3 após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h. ...	54

Figura 13 - Microscopias obtidas por MET de a) TC1, c) TC2 e e) TC3 e suas respectivas distribuições de tamanho de partículas b), d) e f). O destaque na parte a) se refere as partículas fundidas.	56
Figura 14 - Imagens de DEAS das amostras a) TC1, b) TC2 e c) TC3 e seus respectivos planos cristalinos correspondentes.	58
Figura 15 - Variação de tamanho e de PZ das AuNPs produzidas pela amostra TC2 ao longo do tempo com estocagem no escuro e sob refrigeração à 4 °C	60
Figura 16 - Espectro de massa da amostra TC2. a) Aproximação para massa atômica do H ₂ . b) Aproximação para a massa atômica do O ₂ . c) Aproximação para massa atômica correspondente ao Cl ₂	63
Figura 17 - Espectro de absorção da amostra DNAAu após preparo e sem passar por irradiação à laser.....	65
Figura 18 - Espectro de absorção da amostra DNAAu após preparo e após irradiação por laser Nd:YAG com λ de 532 nm por diferentes intervalos de tempo.	66
Figura 19 - Distribuição do tamanho das AuNPs formadas pela amostra DNAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.....	67
Figura 20 - Imagens obtidas via MET das AuNPs sintetizadas pela amostra DNAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h. A imagem contém duas magnificações diferentes em a) e b) e a distribuição do tamanho de partículas em c), referente a figura b). Os pontos brilhantes representam as AuNPs. Já a massa mais clara representa o DNA.....	68
Figura 21 - Imagem obtida por DEAS das AuNPs obtidas pela amostra DNAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.....	69
Figura 22 - Variação de tamanho e do PZ das AuNPs produzidas pela amostra DNAAu ao longo do tempo com estocagem no escuro e sob refrigeração à 4°C.....	70
Figura 23 - Espectro de absorção da amostra BSAAu após preparo e sem passar por irradiação à laser.	72
Figura 24 - Espectro de absorção da amostra BSAAu após preparo e após irradiação por laser Nd:YAG com λ de 532 nm por diferentes intervalos de tempo.....	73

Figura 25 - Distribuição do tamanho das AuNPs formadas pela amostra BSAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.	74
Figura 26 - Imagens obtidas via MET das AuNPs sintetizadas pela amostra BSAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h. A imagem contém duas magnificações diferentes em a) e b) e a distribuição do tamanho de partículas em c), referente a figura b). Os pontos brilhantes representam as AuNPs. Já a massa mais clara representa o BSA.....	75
Figura 27 - Imagem obtida por DEAS das AuNPs obtidas pela amostra DNAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.	76
Figura 28 - Variação de tamanho e do PZ das AuNPs produzidas pela amostra BSAAu ao longo do tempo com estocagem no escuro e sob refrigeração à 4 °C.	77
Figura 29 - Espectro de absorção comparativo entre as amostras TC2, DNAAu e BSAAu irradiadas por laser com $\lambda = 532$ nm. Fotos das amostras também estão presentes na imagem.	78
Figura 30 - Distribuição do tamanho das AuNPs sintetizadas utilizando as amostras TC2, DNAAu e BSAAu.	79
Figura 31 - Imagens obtidas por MET das AuNPs sintetizadas pelas amostras a) TC2, c) DNAAu e e) BSAAu e suas respectivas distribuições de tamanho de partículas b), d) e f). As manchas mais claras em c) e d) são DNA e BSA, respectivamente.....	81
Figura 32 - Imagens obtidas via DEAS correspondente às AuNPs formadas pelas amostras a) TC2, b) DNAAu e c) BSAAu e seus respectivos planos cristalinos.	83
Figura 33 - Comparativo entre as variações de tamanho e PZ das amostras a) TC2, b) DNAAu e c) BSAAu após estocagem por 0, 1, 7,14,21 e 28 dias sob refrigeração à 4°C.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras utilizadas neste trabalho, suas concentrações e volumes..46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

0D - Zero-dimensional

1D - Unidimensional

2D - Bidimensional

3D - Tridimensional

AuNPs - Nanopartículas de ouro

BSA - Albumina de soro bovino

BSAAu - Amostra de solução aquosa de ácido tetracloroáurico e BSA

CFC - Cúbica de face centrada

DEAS - Difração de elétrons de área selecionada

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAAu - Amostra de solução aquosa de ácido tetracloroáurico e DNA

EDL - Espalhamento dinâmico de luz

EM - Espectrometria de massa

HSA - Albumina de soro humano

JCPDS - Joint Committee on Powder Diffraction Standards

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

Nd:YAG - Granada de ítrio alumínio dopada com neodímio

pH - Potencial hidrogeniônico

PSL - Plasmon de superfície localizado

PZ - Potencial zeta

RNA - Ácido ribonucleico

RPSL - Ressonância plasmônica de superfície localizada

STEM - Scanning Transmission Electron Microscopy

Ti:Safira - Titânio-safira

TV1 - Amostra 1 de solução aquosa de ácido tetracloroáurico para teste de volume

TV2 - Amostra 2 de solução aquosa de ácido tetracloroáurico para teste de volume

TV3 - Amostra 3 de solução aquosa de ácido tetracloroáurico para teste de volume

TC1 - Amostra 1 de solução aquosa de ácido tetracloroáurico para teste de concentração

TC2 – Amostra 2 de solução aquosa de ácido tetracloroáurico para teste de concentração

TC3 - Amostra 3 de solução aquosa de ácido tetracloroáurico para teste de concentração

UV - Ultravioleta

UV-Vis - Ultravioleta-visível

YAG - Granada de ítrio alumínio

LISTA DE SÍMBOLOS

nm - Nanômetro

Λ - Comprimento de onda

He-Ne - Hélio-Neônio

CO₂ - Dióxido de carbono

GaAs - Gálio-Arsênio

Xe - Xenônio

Kr - Criptônio

Nd³⁺ - Íon de neodímio

Y³⁺ - Íon ítrio

A - Adenina

G - Guanina

T - Timina

C - Citosina

P - Fósforo

O - Oxigênio

N - Nitrogênio

H - Hidrogênio

OH - Hidroxila

HAuCl₄ - Ácido tetracloroáurico

H₂O - Água

HAuCl₄.3H₂O - Ácido tetracloroáurico tri-hidratado

% - Porcentagem

g - Grama

mol - Quantidade de $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

L - Litro

M Ω - Megaohm

cm - Centímetro

ns - Nanosegundo

Hz - Hertz

mJ - Milijoule

mg - Miligrama

mL - Mililitro
h - Hora
aq - Solução aquosa
t - Tempo
° - Grau
°C - Graus Celsius
V - Volts
kV - Quilovolts
min - Minutos
± - Mais ou menos
Ti - Titânio
 d_{hkl} - Distância interplanar
mV - Milivolts
nhv – Emissão de fótons
H· - Radical hidrogênio
O· - Radical oxigênio
OH· - Radical hidroxila
H₂ - Gás hidrogênio
O₂ - Gás oxigênio
H₂O₂ - Água oxigenada
fs - Femtosegundo
kHz - Quilohertz
 e_{aq}^- - Elétron hidratado
H⁺ - Hídron
[AuCl₄]⁻ e [AuCl_x(OH)_{4-x}]⁻ - Íon tetracloroaurato
Au (0) - Ouro metálico
Cl₂ - Gás cloro
Au_m - Ouro metálico
Au_{m+1} - Ouro metálico
HCl - Ácido clorídrico
Cl⁻ - Íon cloreto
u - Unidade de massa atômica
Au - Ouro
-SH - Sulfanilo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1. Nanomateriais.....	29
2.2. Nanopartículas de ouro	31
2.2.1. Síntese de AuNPs.....	35
2.3. Lasers	36
2.4. Biopolímeros	39
2.4.1. DNA	40
2.4.2. Albumina	42
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1. Materiais utilizados.....	45
4.2. Métodos.....	45
4.2.1. Preparo das soluções	45
4.2.2. Irradiação das soluções	46
4.3. Caracterização das amostras	47
4.3.1. Espectrofotometria UV-Visível.....	47
4.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL).....	47
4.3.3. Potencial Zeta (PZ).....	48
4.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Difração de elétrons de área selecionada (DEAS).....	49
4.3.5. Espectrometria de massa (EM)	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1. Síntese de AuNPs à partir de solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	51
5.1.1. Efeito do volume da solução irradiada na formação de AuNPs.....	51
5.1.2. Efeito da concentração da solução na formação de AuNPs.....	53
5.2. Mecanismo de síntese para formação de AuNPs via irradiação laser com λ de 532 nm	61
5.3. Efeito da presença de biopolímeros na solução durante a formação das AuNPs	64
5.3.1. Síntese de AuNPs na presença de DNA.....	64
5.3.2. Caracterização das AuNPs sintetizadas na presença de DNA	66
5.3.3. Síntese de AuNPs na presença de BSA.....	71

5.3.4. Caracterização das AuNPs sintetizadas na presença de BSA.....	73
5.4. Considerações finais: Comparativo entre amostras TC2, DNAAu e BSAAu	78
6. CONCLUSÕES.....	87
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	88
REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

Os nanomateriais estão se tornando cada vez mais populares nos últimos anos, devido suas propriedades únicas que se diferem das propriedades que apresentam quando em escala macroscópica. Isso abre um leque novo de possibilidades, pois um composto antes desinteressante para uma determinada aplicação pode adquirir a propriedade desejada quando em escala nano. Por exemplo, materiais semicondutores podem se tornar isolantes em escala nanométrica (CAO; WANG, 2011), um material opaco em escala macro pode se tornar transparente quando seu tamanho é diminuído, ou ainda um material estável quimicamente pode se tornar reativo quando em escala nano (CALLISTER; RETHWISCH, 2011).

Um exemplo destes nanomateriais são as nanopartículas. Consideradas nanomateriais zero-dimensionais (0D) por terem todas suas dimensões em escala nanométrica (NERSISYAN et al., 2017), elas têm sido utilizadas em aplicações variadas como em embalagens (HONARVAR; HADIAN; MASHAYEKH, 2016), captação de energia solar (TORRES-MENDIETA et al., 2017), catálise (DANIEL; ASTRUC, 2004), sensoriamento (PRIYADARSHINI; PRADHAN, 2017), carreamento de fármacos (KONG et al., 2017), armazenamento de dados (REISS; HÜTTEN, 2005), diagnóstico (KONG et al., 2017), condutividade elétrica (MA; TANG; KIM, 2008), dentre outros. Uma nanopartícula em específico que consegue ser aplicada em quase todos os exemplos citados é a nanopartícula de ouro (AuNPs).

Sendo uma nanopartícula e tendo suas propriedades fortemente dependentes de sua morfologia e tamanho, é muito importante que sua síntese permita um grande controle sobre essas características. Infelizmente nenhum método de síntese já criado apresenta esse tipo de controle. Nenhum deles é capaz de produzir todas as morfologias já catalogadas em todos os tamanhos possíveis (MAYER; HAFNER, 2011), por exemplo. Além disso, os métodos comumente utilizados se apoiam no uso de agentes redutores, catalisadores e estabilizantes para a obtenção das AuNPs (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951; BRUST et al., 1994). Dependendo da aplicação, a utilização destes compostos pode prejudicar a funcionalidade das AuNPs. Seria necessário a implementação de uma etapa somente para a remoção ou recobrimento destes compostos, caso possível, o que aumentaria o tempo de

preparação do material final.

Portanto, é necessário desenvolver um método de síntese de AuNPs que seja capaz de um maior controle das propriedades das nanopartículas bem como seja capaz de utilizar o menor número de compostos possível. Baseado nessa premissa, neste trabalho buscou-se sintetizar AuNPs por meio do método de irradiação à laser em comprimento de onda de 532 nm. Um mecanismo de síntese para esse método foi proposto e, em seguida, diferentes concentrações do reagente $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ foram testadas. Além disso, foi investigado o uso de biopolímeros na síntese, verificando-se se há ou não alteração nas propriedades das nanopartículas. As AuNPs sintetizadas foram analisadas com relação ao seu tamanho, morfologia, estrutura cristalina e estabilidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nanomateriais

Os nanomateriais são definidos como materiais que apresentam tamanhos entre 1 nm e 100 nm e propriedades diferentes das quais eles apresentariam se estivessem em escala macroscópica (EUSTIS; EL-SAYED, 2006). Por exemplo, a temperatura de fusão se torna menor quando o material está em escala nano. Materiais semicondutores podem se tornar isolantes quando apresentam alguns nanômetros de tamanho. Ouro em escala macro não apresenta características catalíticas, mas em escala nanométrica passa a apresentar tais características. (CAO; WANG, 2011).

A classificação destes materiais é feita com relação as suas dimensões: zero-dimensional (0D), unidimensional (1D), bidimensional (2D), e tridimensional (3D). Para nanomateriais 0D, todas as dimensões precisam estar na escala nanométrica. Para nanomateriais 1D, duas dimensões precisam estar na escala nanométrica. Para nanomateriais 2D, somente uma dimensão precisa estar na escala nanométrica. Já nanomateriais 3D compreendem materiais tridimensionais que são constituídos por uma variedade de nanoestruturas (NERSISYAN et al., 2017). A Figura 1 ilustra os tipos de nanomateriais. Como exemplos destes tipos podemos citar flores de grafeno no caso dos nanomateriais 3D (CHENG, Q. et al., 2017), filmes finos no caso de nanomateriais 2D, nanofibras e nanobastões no caso de nanomateriais 1D e nanopartículas no caso de nanomateriais 0D (NERSISYAN et al., 2017).

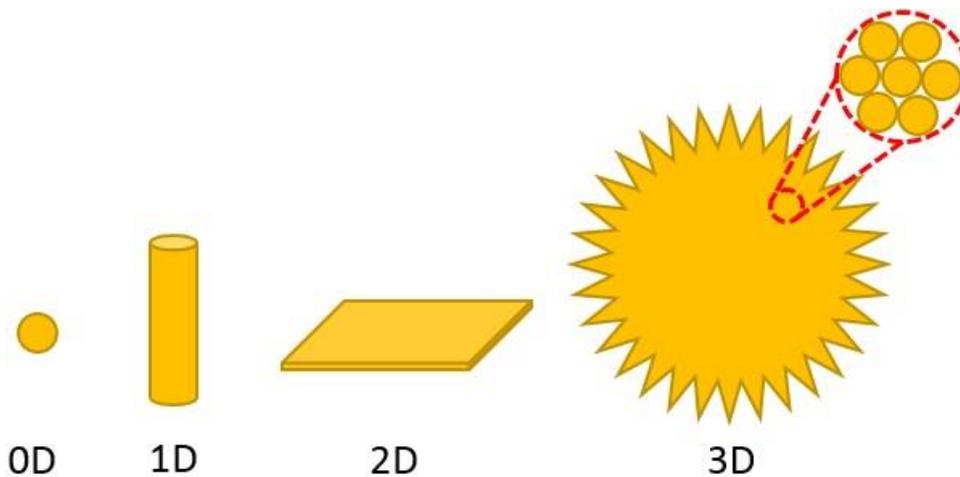


Figura 1 - Tipos de nanopartículas: nanopartículas (0D), nanobastões (1D), filmes finos (2D) e estrutura com formato de esfera ramificada (3D - formado por outras nanopartículas).

Existem duas abordagens para síntese de nanomateriais: *top-down* e *bottom-up*. A abordagem *top-down* compreende os métodos que partem de material em tamanho macroscópico para se conseguir nanomateriais. Um exemplo de método que faz parte dessa abordagem é o método de gravura (*etching*, em inglês). Uma desvantagem dessa abordagem são as imperfeições superficiais presentes no material final. Como nanomateriais tem suas propriedades fortemente dependentes da sua área superficial, isso poderia acarretar em propriedades finais diferentes das esperadas (CAO; WANG, 2011; ZHAO; LI; ASTRUC, 2013).

A abordagem *bottom-up* compreende os métodos que partem de uma construção átomo à átomo para se conseguir nanopartículas, praticamente o caminho inverso da abordagem *top-down*. Como exemplo de métodos *bottom-up* pode-se citar a deposição de filmes finos e o crescimento de monocristais. Essa abordagem tem como vantagens permitir a obtenção de nanomateriais com menor número de defeitos superficiais e com composição química mais homogênea, se comparada a outra abordagem (CAO; WANG, 2011). Uma representação destas duas abordagens pode ser observada na Figura 2.

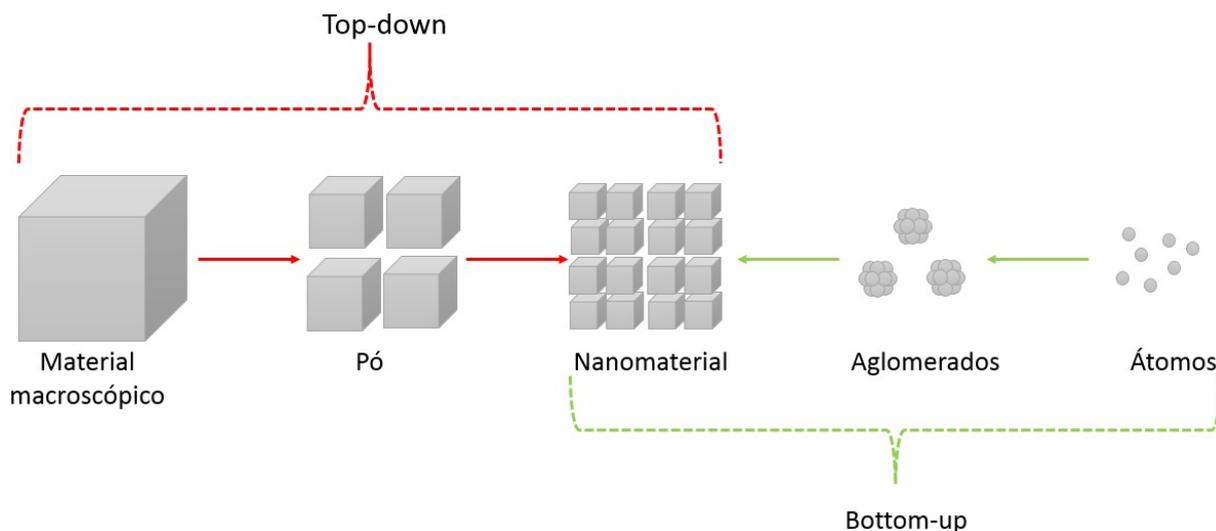


Figura 2 - Representação das abordagens *top-down* e *bottom-up* para síntese de nanomateriais.

2.2. Nanopartículas de ouro

Embora recentemente tenha se tornado muito estudada, as nanopartículas de ouro têm sido utilizadas desde a época do império romano. O artefato mais antigo que se tem conhecimento utilizando essas partículas é o cálice de Licurgo, o qual alterava sua coloração quando luz era transmitida à partir de seu interior. Inicialmente amarelo-esverdeado, o cálice se tornava avermelhado (Figura 3).

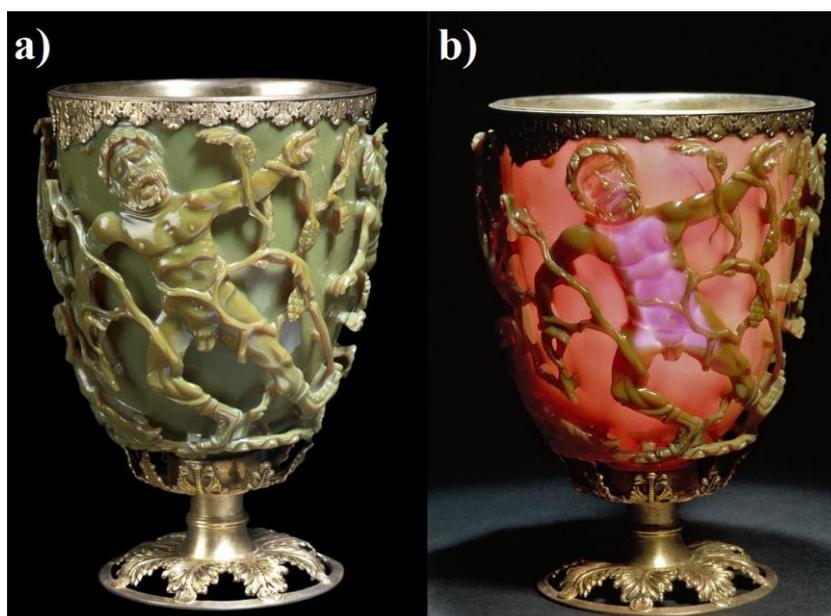


Figura 3 - Cálice de Licurgo a) sem fonte de luz em seu interior e b) com luz transmitida à partir de seu interior. Fonte: The British Museum (2017).

Essa propriedade ótica ocorre devido a presença de uma liga de AuNPs e nanopartículas de prata em meio a matriz vítrea (FREESTONE et al., 2007). Após o império romano, a produção de vidro com coloração avermelhada foi desaparecendo, só voltando a ativa por volta do século XVII baseada na utilização do púrpura-de-Cássio, um precipitado de ouro coloidal e óxido de estanho (WAGNER et al., 2000).

Apesar da utilização das AuNPs ser tão antiga, a noção de que se tratava de nanopartículas só começou a ser moldada por Faraday no século XIX. Em seu trabalho, Faraday chegou à conclusão de que a coloração rubi de uma solução coloidal de ouro era resultado do tamanho diminuto das partículas ali presentes, tão pequenas que eram incapazes de serem vistas pelos microscópios da época (THOMPSON, 2007). Somente na década de 1950, um dos mais famosos métodos de síntese de AuNPs foi desenvolvido por Turkevich, Stevenson e Hillier (1951).

Como pode-se notar, as AuNPs causam fascínio há um longo tempo. Mas só recentemente grandes avanços tem sido feitos com relação a sua produção, ao entendimento de suas propriedades e a sua utilização em diferentes aplicações. Essas nanopartículas apresentam propriedades únicas, como boa estabilidade, capacidade de se conjugar com biomoléculas, baixa toxicidade e ressonância plasmônica de superfície localizada (RPSL) (COUTO; VITORINO; DANIEL-DA-SILVA, 2017). Essas propriedades permitem que as AuNPs possam ser aplicadas não só em vidros para coloração, como também em carreadores de fármacos, biosensores, imagem molecular (KONG et al., 2017), nanofluidos solares (TORRES-MENDIETA et al., 2017), filtros óticos (LEE, J.; LEE, M., 2016), sensores de íons metálicos (PRIYADARSHINI; PRADHAN, 2017), dentre outras aplicações.

A RPSL é uma das características mais marcantes das AuNPs (ZHANG; NOGUEZ, 2008). Um plasmon corresponde a uma vibração dos elétrons livres de uma nanopartícula metálica. Quando o plasmon ocorre na superfície de um material, seu nome se altera para plasmon de superfície. Caso esse plasmon de superfície esteja localizado em partículas que apresentam tamanhos próximos ao tamanho dos comprimentos de onda da luz visível, caso das AuNPs, o nome muda para plasmon de superfície localizado (PSL). Uma vez que luz é incidida em nanopartículas que apresentam PSL, as cargas da partícula oscilam, com elétrons migrando para um lado e deixando cargas positivas do outro, produzindo assim o efeito conhecido como RPSL (MAYER; HAFNER, 2011). A Figura 4 apresenta um exemplo de oscilação em

nanopartículas e nanobastões. Ocorrendo essa oscilação, os comprimentos de onda da luz visível que estão em fase com essa movimentação das cargas são absorvidos pela partícula e reemitidos em forma de luz espalhada (MESSERSMITH; NUSZ; REED, 2013).

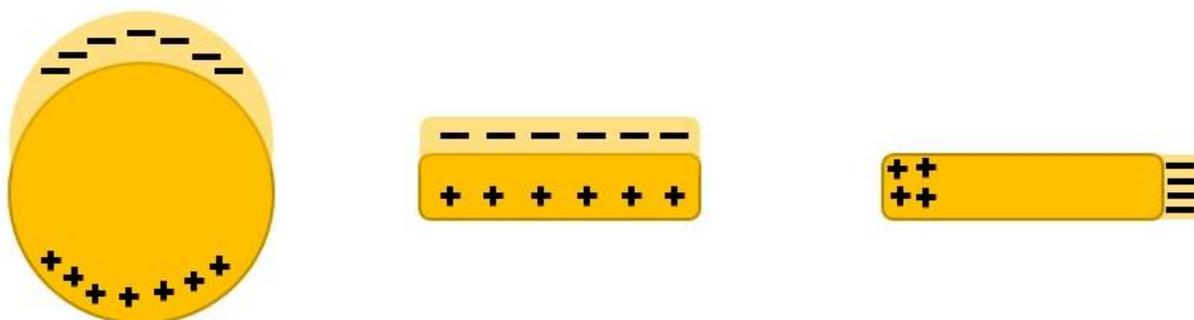


Figura 4 - Representação da RPSL em uma nanopartícula esférica (esquerda) e nanobastão (centro e direita). O nanobastão apresenta duas formas possíveis de oscilação.

Como pode-se observar na figura anterior, cada morfologia apresenta um ou mais tipos de oscilações diferentes, logo é razoável concluir que a RPSL varia em função da morfologia e do tamanho das partículas. Nanopartículas de diferentes formatos já foram sintetizadas, como esféricas (ANYFANTIS et al., 2015), cúbicas (KALISHWARALAL et al., 2009), triangulares (TANGEYSH et al., 2017), estruturas ramificadas (GRZELCZAK et al., 2008), bastões (NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003), dentre outros. Cada um desses formatos apresenta uma RPSL única, que pode ser detectada por meio da absorbância de comprimentos de onda específicos da luz visível. A Figura 5 apresenta diferentes formatos e tamanhos de AuNPs e seus respectivos espectros de absorção.

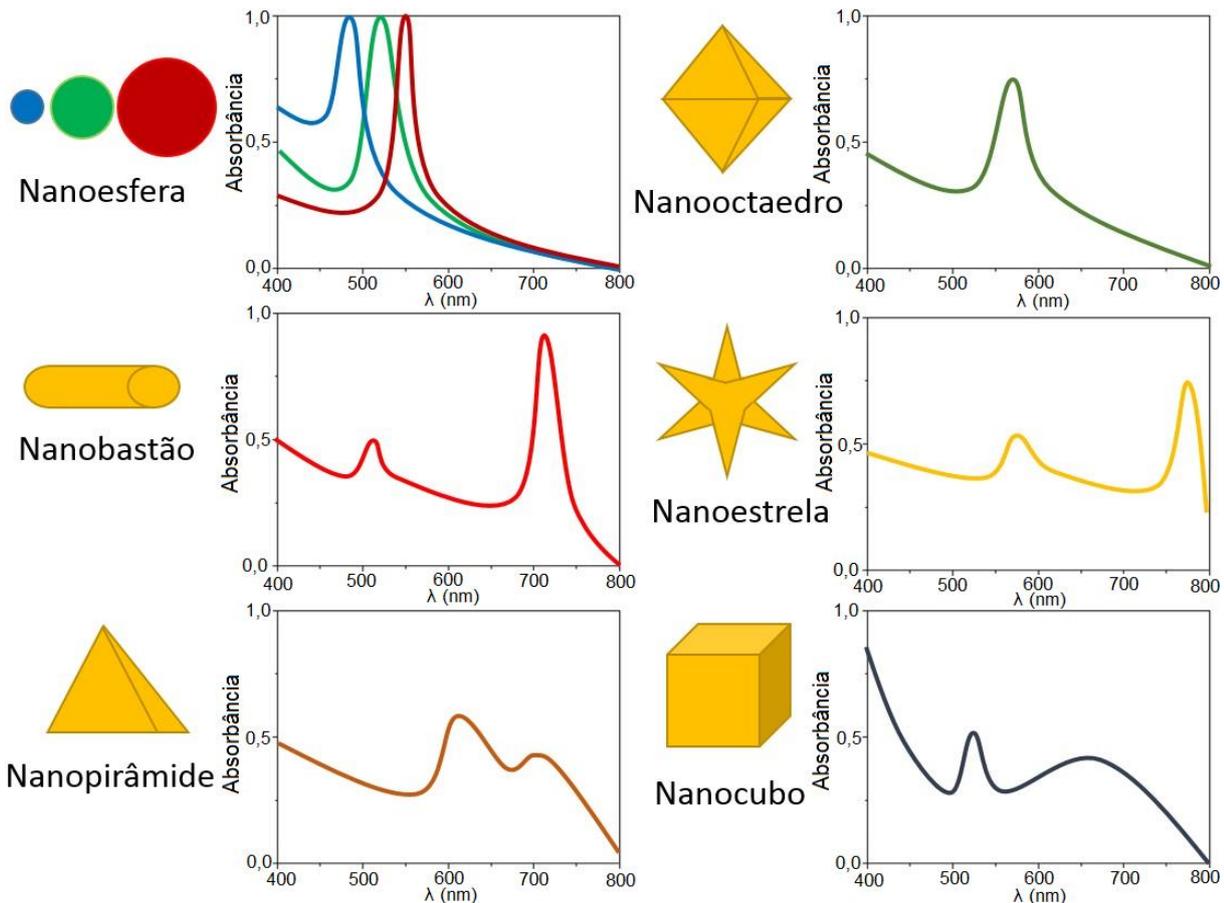


Figura 5 - Exemplos de espectro de absorvância em função do comprimento de onda (λ) de diferentes tamanhos e diferentes morfologias de AuNPs. Fonte: Cada morfologia foi adaptada de um trabalho diferente da literatura: nanoesfera (ANYFANTIS et al., 2015), nanobastão (NIKOBAKHT; EL-SAYED, 2003), nanooctaedro (EGUCHI et al., 2012), nanoestrela (NEHL; LIAO; HAFNER, 2006) e nanocubo (KALISHWARALAL et al., 2009).

Observando a figura anterior pode-se notar que cada morfologia apresenta um espectro de absorção único, porém é possível que espectros coincidam dependendo do tamanho das nanopartículas. Considerando uma só morfologia, como no caso das nanoesferas, quanto menor o tamanho das AuNPs, o pico de absorvância sofre deslocamento para menores comprimentos de onda (também conhecido como *blueshift*). E quanto maior o tamanho das AuNPs, o pico de absorvância sofre um deslocamento para maiores comprimentos de onda (conhecido como *red-shift*) (LINK; EL-SAYED, 1999). Portanto, dependendo do tamanho de uma nanoestrela, os picos podem se deslocar para menores comprimentos de onda e coincidirem com os picos de um nanobastão, por exemplo. Tanto os formatos como os tamanhos das nanopartículas costumam variar com o método de síntese e/ou com a presença ou ausência de determinados reagentes.

2.2.1. Síntese de AuNPs

Para obter-se AuNPs pode-se seguir tanto a abordagem *top-down* como a *bottom-up*, sendo esta última a mais utilizada devido as suas vantagens descritas anteriormente. Um exemplo de método *top-down* utilizado na síntese de AuNPs é o método de ablação à laser. Este método consiste na incidência de um feixe de laser sobre uma placa de ouro puro ou sobre partículas de ouro. Ao impactar nas partículas ou placa o laser promove a ejeção de AuNPs (BINAYMOTLAGH et al., 2016; LEE, J.; LEE, M., 2016). Esse método apresenta como desvantagens o fato de utilizar partículas já prontas de ouro ou placas de ouro puro, que são custosas. Além disso, por ser um método *top-down* a superfície das AuNPs pode apresentar defeitos.

Com relação à abordagem *bottom-up*, o método mais famoso é o método de Turkevich, Stevenson e Hillier (1951), citado anteriormente. Tal método consiste no aquecimento de uma solução de H₂AuCl₄ (um de sal de ouro) em presença de citrato de sódio, que age como redutor e estabilizante. Uma desvantagem deste método é o fato de utilizar um agente redutor ou estabilizante. Muitas vezes a presença desses compostos pode causar a perda de propriedades do material ou ele simplesmente pode não ser útil para a aplicação final.

O método de Brust-Schiffrin também têm sido muito utilizado (BRUST et al., 1994). Neste método, uma solução bifásica de água e tolueno, um catalisador (brometo de tetraoctilamônio) e um agente redutor (borohidreto de sódio), são utilizados na obtenção de AuNPs. As desvantagens deste método residem no fato de utilizar um meio bifásico, agente redutor e catalisador. A presença de tantos componentes, além de dificultar a síntese, pode atrapalhar a utilização das AuNPs por aumentar sua toxicidade, por exemplo.

Outros métodos que valem ser mencionados são os métodos das sementes, no qual AuNPs já prontas (sementes) favorecem o crescimento de outras AuNPs a partir de sais em solução (DONG et al., 2004), e o método da micela invertida, no qual surfactantes criam micelas invertidas, ou seja, de ponta orgânica para fora e ponta inorgânica voltada para o centro da micela. No interior dessas micelas ocorre a redução do sal de ouro e a AuNP é formada já presa, limitando seu tamanho (PILENI, 2003). A desvantagem do método das sementes se deve ao fato de precisar de AuNPs prontas para iniciar a síntese. Já no caso do método da micela, uma potencial

desvantagem pode ser o fato da presença da micela, pois pode aumentar o tamanho das AuNPs fazendo elas perderem a capacidade de entrar em células, por exemplo.

Além dos métodos de síntese citados existem muitos outros, porém nenhum deles afirma conseguir um controle preciso de tamanho, repetindo a distribuição de tamanho de partículas com exatidão entre duas sínteses, e controle preciso da morfologia, permitindo produzir todas ou ao menos grande parte das morfologias conhecidas de AuNPs. Tais fatos somados as desvantagens dos métodos citados nos motiva a determinar um método de síntese de AuNPs que cumpra esses objetivos e supere as desvantagens mencionadas.

Um método que aparenta ser um bom candidato a síntese de AuNPs é o método de irradiação à laser, que consiste na irradiação de uma solução de sal de ouro por laser em determinados comprimentos de onda. Este método não utiliza nenhum surfactante, estabilizante, catalisador ou solvente muito elaborado. Além disso, o laser é um equipamento que apresenta uma boa precisão quanto a sua área de incidência, uma boa variedade de comprimentos de onda e um bom controle de seus muitos parâmetros, o que pode conferir uma grande variedade de resultados.

2.3. Lasers

A palavra laser é uma sigla em inglês para “amplificação de luz por emissão estimulada de radiação”. Ou seja, o laser nada mais é do que um aparato que emite luz com intensidade amplificada devido a um estímulo. Esse estímulo pode vir da luz de uma lâmpada ou da corrente elétrica, por exemplo (CALLISTER; RETHWISCH, 2011).

Atualmente existem 4 tipos de laser disponíveis comercialmente: líquido, de estado sólido, gasoso e de semicondutor (KANNATEY-ASIBU, 2008). Como este trabalho utiliza um laser de estado sólido, os demais tipos serão explicados brevemente.

O laser gasoso é muito utilizado na indústria. Ele apresenta feixes contínuos e pulsados e frequências de feixe que variam do ultravioleta ao infravermelho. Estes lasers usam um meio gasoso como meio ativo, ou seja, os feixes de laser são produzidos a partir de um gás quando pulso elétrico é aplicado. Exemplos deste tipo de laser são laser He-Ne e laser CO₂ (KANNATEY-ASIBU, 2008).

Lasers líquidos possuem um meio ativo de solução de corante orgânico, com o solvente podendo ser água ou álcool. Devido à grande quantidade de corantes, esses lasers podem liberar feixes com frequências desde o ultravioleta próximo até o infravermelho próximo. A fonte de estímulo é a radiação luminosa. Exemplos de lasers líquidos são o de corante Cumarina e o de corante Rodamina 6G (KANNATEY-ASIBU, 2008).

Lasers de semicondutores, também conhecidos como diodos laser, utilizam um material semicondutor como meio ativo e corrente elétrica como estímulo para a formação de seu feixe. Este tipo de laser apresenta um tamanho pequeno e baixo custo de produção. Laser de GaAs é um exemplo (KANNATEY-ASIBU, 2008).

Lasers de estado sólido, cujo tipo é utilizado neste trabalho, apresentam um cristal isolante ou vidro como matriz hospedeira na qual o meio ativo está inserido. O meio ativo se trata de um dopante ou impureza presente nessa matriz. Normalmente esse dopante se trata de um metal de transição ou elemento de terra-rara (KANNATEY-ASIBU, 2008; CALLISTER; RETHWISCH, 2011). Entre os exemplos deste tipo de laser podemos citar o laser de rubi e o laser Nd:YAG.

O laser Nd:YAG apresenta uma matriz hospedeira de granada de ítrio e alumínio (YAG, sigla em inglês) enquanto íons de Nd^{3+} substituem íons Y^{3+} e agem como meio ativo. Este tipo de laser pode produzir tanto feixes de onda contínuos como feixes pulsados. Uma lâmpada de Xe ou Kr é responsável pelo estímulo do meio ativo. Seus usos variam desde cirurgias (com λ de 532 nm) e soldagem até processamento de materiais (com λ s variados) (KANNATEY-ASIBU, 2008; CALLISTER; RETHWISCH, 2011).

Com relação a aplicação em processamento de materiais, vários métodos de abordagem *top-down* tem sido estudados, como a ablação à laser em líquido, a fusão à laser em líquido e a fragmentação à laser em líquido. Esses métodos tem se mostrado muito promissores por se mostrarem mais econômicos em alguns aspectos do que os outros métodos de síntese em coloides. Além disso têm mostrado produtividades cada vez melhores (GÖKCE; AMENDOLA; BARCIKOWSKI, 2017). Porém, ainda são métodos *top-down*, ou seja, produzem nanopartículas com mais defeitos do que um método *bottom-up*. Um outro método, dessa vez de abordagem *bottom-up*, que tem que recentemente chamado atenção por sua capacidade ainda pouco explorada é o método de irradiação à laser. Esse método tem se mostrado

promissor pela sua síntese sem agentes redutores, estabilizantes ou catalisadores e ainda apresenta bom potencial para controle de tamanho e morfologia de nanopartículas (MOORE TIBBETTS et al., 2016).

Uma vez que a irradiação à laser foi utilizada neste trabalho, é importante que o princípio de funcionamento de um laser do estado sólido seja explanado. Um esquema representando os componentes do laser e seu mecanismo de formação de feixe é apresentado na Figura 6.

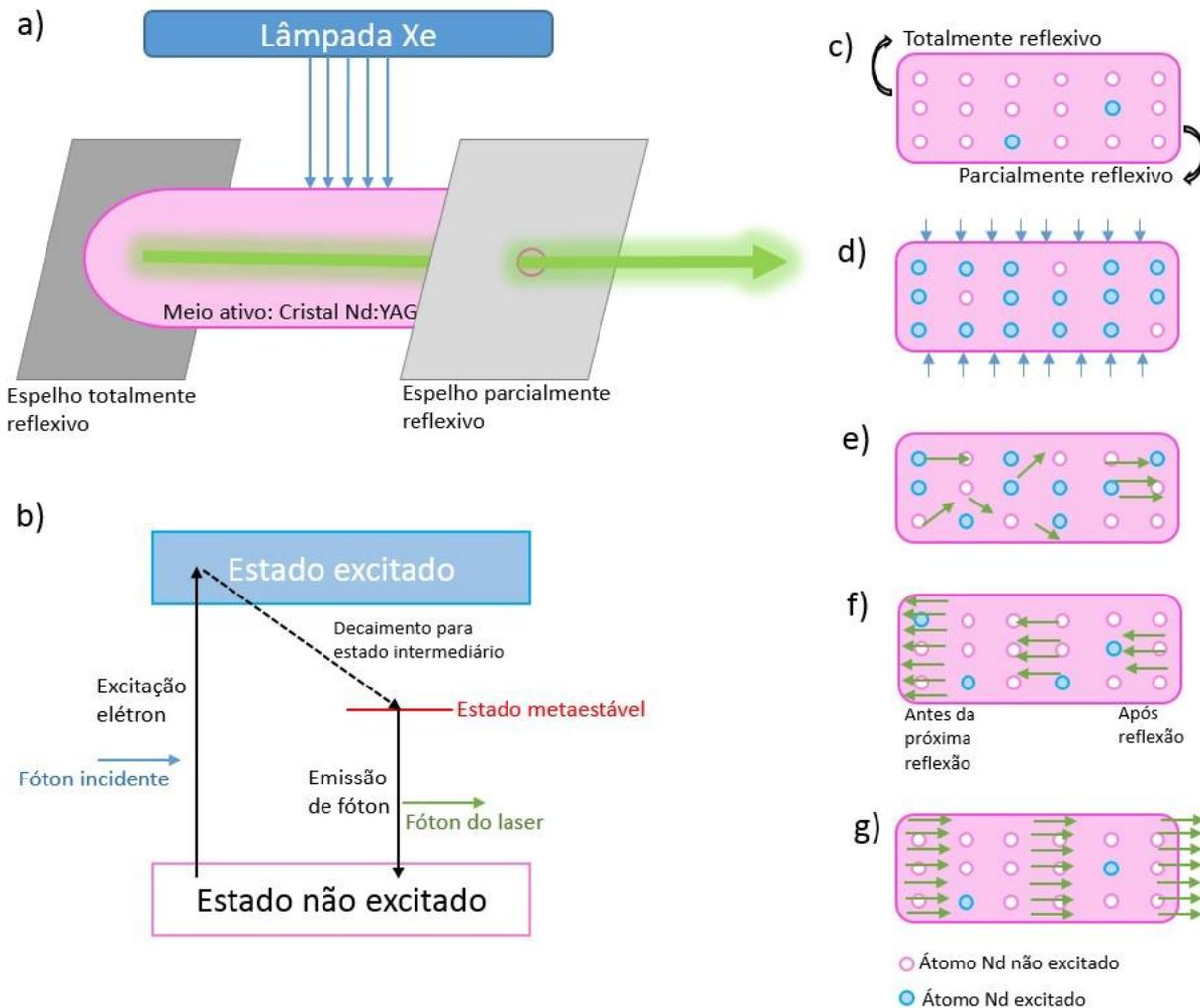


Figura 6 - Representação do mecanismo de formação do laser. a) Representação dos componentes de um laser Nd:YAG. b) Excitação e formação do fóton do laser. Representação da alteração de estado energético dos átomos de Nd c) antes, d) durante e e), f) e g) após estímulo pela lâmpada de Xe. Fonte: Adaptado de Callister e Rethwisch (2011).

Antes do cristal de Nd:YAG ser iluminado, todos os íons de Nd^{3+} estão com seus elétrons em estado não excitado, ou seja, todos estão no seu nível mais baixo de energia (Figura 6 b) e c)). Após iluminação do cristal por uma lâmpada de Xe, os

fótons emitidos excitam os elétrons de Nd^{3+} fazendo com eles passem à um estado mais energético (Figura 6 b) e d)).

Ao decair deste estado mais energético estes elétrons podem seguir dois caminhos. O primeiro seria um decaimento diretamente para o seu nível de mais baixa energia, o que não contribui para o feixe de laser. O segundo seria decair para um estado intermediário metaestável e, em seguida, decair deste estado intermediário para o estado menos energético, originando uma emissão espontânea de fóton (Figura 6 b) e e)). Essa emissão espontânea inicial desencadeia mais emissões de outros elétrons decaindo de seu estado metaestável. Os fótons que são emitidos em paralelo com o eixo central do cristal são refletidos pelos espelhos totalmente reflexivo e parcialmente reflexivo (Figura 6 f)), acumulando intensidade pela estimulação de novos decaimentos do estado metaestável, até que, com alta intensidade e colimado, ele é transmitido pela parede parcialmente reflexiva (Figura 6 g)). Os fótons que não se encontram nessa direção paralela ao eixo central não contribuem para o feixe de laser (CALLISTER; RETHWISCH, 2011).

Como mencionado, o método de irradiação à laser têm mostrado potencial para ser um bom método de síntese de AuNPs. Dentre os lasers que se pode utilizar para tal método, o laser de Nd:YAG é um bom candidato pois com ele pode-se produzir feixes de onda pulsados e contínuos e pode-se alterar diversos parâmetros, como o comprimento de onda do feixe (infravermelho, luz visível e UV), o tempo de pulso, a frequência de repetição, o diâmetro do feixe, a energia do feixe, dentre outros. Essa grande variedade de parâmetros permite que a irradiação por laser Nd:YAG apresente potencial para uma síntese de AuNPs com grande variedade de resultados.

2.4. Biopolímeros

Os biopolímeros, embora pareçam algo novo, fizeram parte do cotidiano do ser humano desde muito tempo atrás, quiçá desde o início da espécie. Eles são definidos como polímeros produzidos de maneira natural por seres vivos (CHASSENIEUX et al., 2013) e são classificados em três tipos: proteínas, polinucleotídeos e polissacarídeos.

Segundo Fried (2014), polissacarídeos correspondem a poliéteres derivados de açúcares. Eles tem por função o armazenamento de energia e reforço estrutural.

Exemplos de polissacarídeos são celulose, amido e quitina.

Polinucleotídeos são biopolímeros constituídos de monômeros chamados nucleotídeos, que por sua vez são compostos por fosfato, açúcar e uma base orgânica heterocíclica. Eles são responsáveis pelo armazenamento e transferência de informações e síntese de proteínas. Exemplos desse tipo de biopolímeros são DNA e RNA (FRIED, 2014).

Proteínas são biopolímeros constituídos de 20 tipos diferentes de aminoácidos, unidades básicas que compõe todas as proteínas. Podem ser divididas em duas classes: globular e fibrosa. As proteínas globulares tem por função regular as reações químicas em um organismo, transportar oxigênio, hormônios ou medicamentos. Enquanto isso, as fibrosas apresentam funções estruturais, como proteção e sustentação. Exemplos de proteínas são albumina, enzimas, anticorpos e hormônios (FRIED, 2014).

2.4.1. DNA

O DNA ou ácido desoxirribonucleico é um biopolímero que apresenta um formato de dupla hélice e foi descoberto em 1953 por J. Watson e F. Crick. Por ser um exemplo de polinucleotídeo, cada fita desta dupla hélice é constituída de fosfato, açúcar e base orgânica, com essas bases podendo ser adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C). As bases de uma fita costumam estar ligadas com as bases de outra por meio de pontes de hidrogênio e sempre nas combinações A com T e C com G. A Figura 7 apresenta a dupla hélice e seus constituintes.

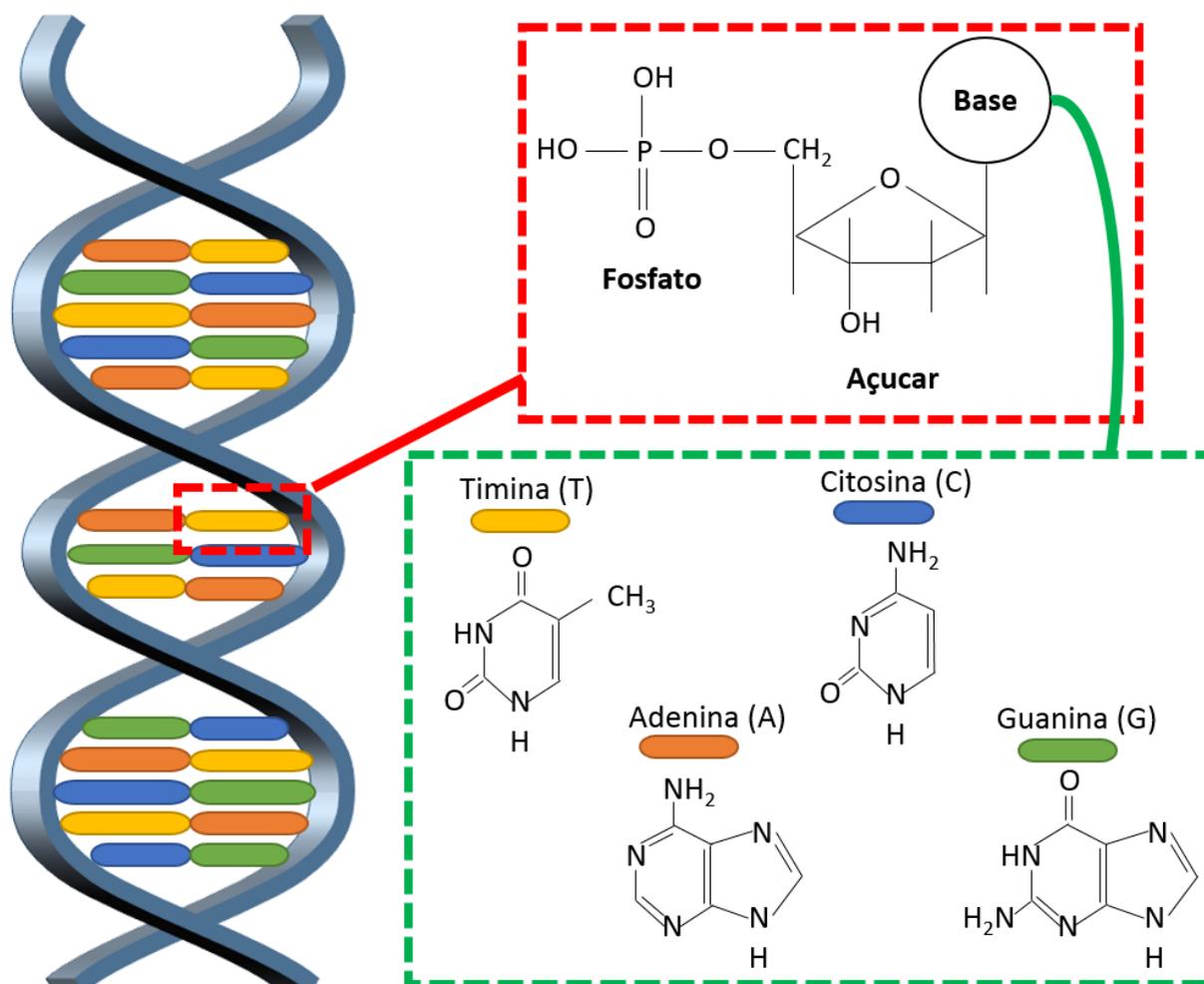


Figura 7 - Representação de parte de uma dupla hélice de DNA com seus constituintes fosfato, açúcar e bases A, T, C e G.

A função principal do DNA, quando em um organismo vivo, é armazenar informação genética, porém ele pode apresentar outras funções se combinado com outros materiais (PARK; LAKES, 2007). O DNA pode ser utilizado como molde de tamanho e morfologia para AuNPs, por exemplo (SONG et al., 2016). As cadeias de DNA podem ser moldadas em vários formatos, como das letras X e Y. Os íons de ouro são complexados nessas cadeias e posteriormente reduzidos, resultando em AuNPs com os formatos das letras citadas. O DNA em conjunto com as AuNPs também mostrou uma boa capacidade de entrar em células, podendo assim ser posteriormente aplicado como carreador de fármaco ou biossensor (YANG et al., 2014). Yang et al. (2014) acoplou DNA às AuNPs e as inseriu em meios de cultura celular juntamente com sal de ouro e um agente redutor. Quanto maior a concentração de AuNPs inicial no interior das células, maior a quantidade de AuNPs formada pelo sal de ouro e agente redutor, pois essas AuNPs agem como sementes e favorecem a sua nucleação e crescimento. Com isso pôde-se detectar que as células foram capazes

de absorver as AuNPs conjugadas com DNA e que sua concentração de absorção pode ser quantificada, característica importante para a aplicação como biossensor.

2.4.2. Albumina

A albumina de soro humano (HSA), um tipo de albumina, é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo. Ela apresenta como funções regular o pH e a pressão osmótica da corrente sanguínea. Além disso, ela também é responsável pelo transporte de medicamentos, íons e hormônios pelo plasma sanguíneo (HAWKINS; DUGAICZYK, 1982).

Já a albumina de soro bovino (BSA) se apresenta como uma alternativa à HSA para estudos, devido à seu baixo custo, alta disponibilidade e similaridade de função e estrutura (BINAYMOTLAGH et al., 2016). Ela é constituída de 583 aminoácidos e tem estrutura helicoidal dividida em três domínios de α -hélices, hélices nas quais as cadeias laterais ficam viradas para fora, e cada domínio é subdividido em dois subdomínios (MAJOREK et al., 2012). Domínios são regiões de proteínas capazes de se enrolar, e conseqüentemente se tornarem funcionais, mesmo quando não estão fazendo parte desta proteína (PETSKO; RINGE, 2004). Esses subdomínios são regiões dos domínios que apresentam aminoácidos ou sequência de aminoácidos em comum (HUANG; KIM; DASS, 2004). A Figura 8 à seguir apresenta um modelo da proteína BSA com seus domínios, separados por cores, e subdomínios, separados por tons das cores.

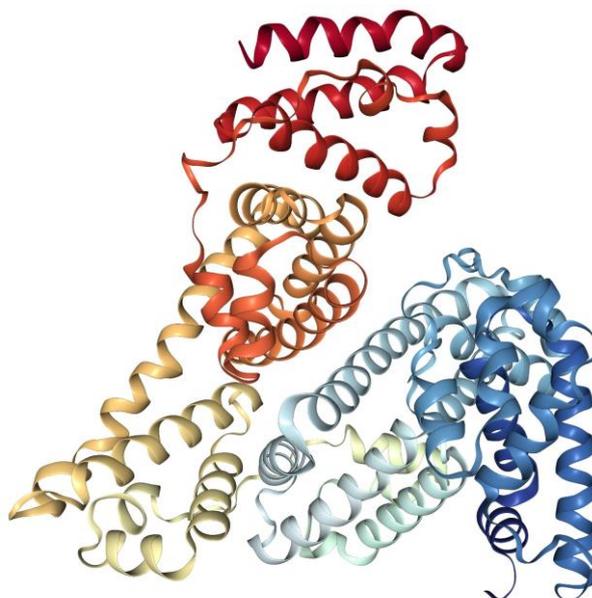


Figura 8 - Representação da estrutura de hélices do BSA com seus 3 domínios e respectivos subdomínios. Domínio 1 - Subdomínios: vermelho e laranja. Domínio 2 – Subdomínios: cor creme e cor creme mais escura. Domínio 3 – Subdomínios: azul claro e azul mais escuro. Fonte: Protein Data Bank (2017).

O BSA quando utilizado em conjunto com as AuNPs assume a função de carreador (BINAYMOTLAGH et al., 2016). Devido à isso, o BSA é uma ótima proteína para testes com carreadores de fármacos e biossensores que precisam passar pela corrente sanguínea.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo principal verificar a viabilidade da síntese de AuNPs utilizando laser Nd:YAG com comprimento de onda de 532 nm e propor um mecanismo de síntese.

Os objetivos específicos são:

- Influência da variação de concentração do sal de ouro na síntese e na morfologia das AuNPs;
- Investigar o efeito de biopolímeros na síntese, com o intuito de verificar se há ou não variação no tamanho e morfologia das AuNPs.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais utilizados

Os reagentes adquiridos foram utilizados da maneira que foram obtidos comercialmente, sem quaisquer modificações. Foram utilizados neste trabalho ácido tetracloroáurico tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), fornecido pela Sigma Aldrich com pureza 49%, DNA de salmão, fornecido pela Sigma Aldrich com massa molar de $8 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, Albumina de soro bovino (BSA), fornecido pela Sigma Aldrich com pureza de 96%, água ultrapura com resistividade $18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ obtida pelo sistema de purificação Barnstead EasyPure RoDi da Thermo Fisher Scientific, cubeta de quartzo da marca Hellma de 1 cm de caminho ótico, agitador magnético da marca IKA e modelo Topolino, barra magnética de diâmetro 0,3 cm e comprimento 0,5 cm da Fisatom, filme plástico Parafilm M fornecido pela Bemis, célula capilar descartável modelo DTS1070 da marca Malvern e laser pulsado Nd:YAG Brilliant B da Quantel Laser com duração de pulso de 5,2 ns, frequência de repetição de 10 Hz, energia máxima de pulso de 150 mJ, diâmetro do feixe de 0,9 cm e comprimento de onda de 532 nm.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo das soluções

Foram preparadas soluções estoque de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $4,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, DNA 1 g L^{-1} e BSA $37,8 \text{ g L}^{-1}$ utilizando H_2O ultrapura. As amostras foram preparadas à partir de diluições dessas soluções estoque conforme a Tabela 1 à seguir. (Obs.: Amostra TV1 altera seu nome para TC2 após testes com amostras TV1, TV2 e TV3).

Tabela 1 – Amostras utilizadas neste trabalho, suas concentrações e volumes.

Amostra	Concentração $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ [mol L^{-1}]	Concentração DNA de salmão [mg L^{-1}]	Concentração BSA [g L^{-1}]	Volume da amostra [mL]
TV1	$2,54 \times 10^{-4}$	-	-	1
TV2	$2,54 \times 10^{-4}$	-	-	2
TV3	$2,54 \times 10^{-4}$	-	-	3
TC1	$2,54 \times 10^{-5}$	-	-	1
TC2	$2,54 \times 10^{-4}$	-	-	1
TC3	$2,54 \times 10^{-3}$	-	-	1
DNAAu	$2,54 \times 10^{-4}$	60	-	1
BSAAu	$2,54 \times 10^{-4}$	-	1,89	1

4.2.2. Irradiação das soluções

Cada uma dessas amostras foi colocada sob agitação utilizando barra magnética no interior da cubeta e agitador magnético. Simultâneo a agitação, foi incidido feixe de laser com λ de 532 nm por 4h (tempo considerando pulsos e seus intervalos), conforme esquema representado na Figura 9 à seguir.

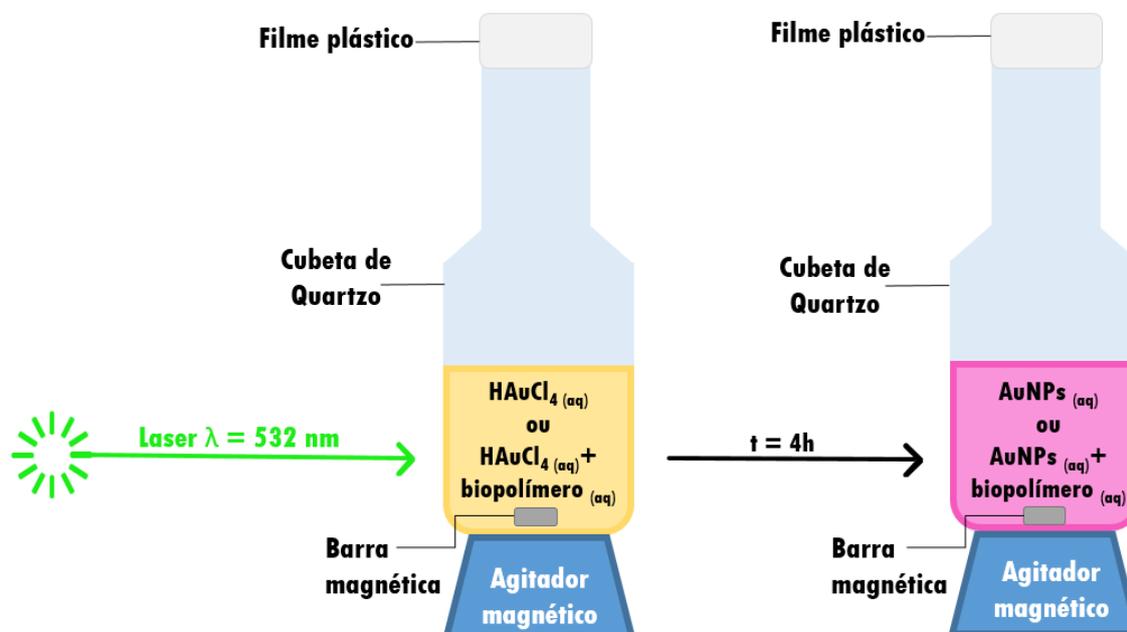


Figura 9 - Diagrama esquemático do processo de síntese das AuNPs por irradiação à laser com λ de 532 nm por 4 h.

4.3. Caracterização das amostras

4.3.1. Espectrofotometria UV-Visível

A espectrofotometria UV-visível ou espectrofotometria UV-Vis é um método de caracterização que se baseia na irradiação de um feixe luminoso monocromático de comprimento de onda variável sobre amostra e referência. Ao passar pela amostra, os fótons do feixe luminoso em determinados comprimentos de onda são absorvidos e excitam os elétrons fazendo com que saiam de um estado de baixa energia para um estado de alta energia. O detector do equipamento é capaz de determinar quais comprimentos de onda foram absorvidos pela amostra e quais não foram absorvidos por meio de comparação com os comprimentos de onda que foram absorvidos pela referência (OWEN, 2000).

As medidas de espectrofotometria das amostras foram realizadas antes, durante e após o período de 4 h mencionado na seção de métodos. Elas foram realizadas com as amostras dentro das cubetas de quartzo pelo espectrofotômetro UV-Vis de feixe duplo da marca Shimadzu, modelo UV-2550. As referências eram compostas de cubetas de quartzo de mesma marca e modelo preenchidas apenas pelo solvente, água ultrapura.

Essa caracterização teve por objetivo determinar se houve formação de AuNPs após irradiação por meio da comparação dos espectros de absorção das amostras antes de serem irradiadas e após serem irradiadas por vários intervalos de tempo.

4.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)

A técnica de caracterização conhecida por espalhamento dinâmico de luz consiste na análise da variação de energia de um feixe de laser que é incidido sobre uma amostra. Dependendo do tamanho das partículas, diferentes tipos de espalhamento podem ocorrer com o feixe incidido variando assim sua energia. O espalhamento Rayleigh ocorre em partículas que apresentam tamanhos de até 1/10 do comprimento de onda incidido. Neste caso as partículas promovem um espalhamento de luz elástico, para todas as direções com a mesma energia do feixe incidente. Já no caso de partículas maiores do que 1/10 do comprimento de onda

incidido, ocorre o espalhamento Mie, um espalhamento inelástico, no qual a energia dos feixes espalhados é diferente da energia do feixe incidente (FAN; ZHENG; SINGH, 2014; BHATTACHARJEE, 2016).

O EDL foi utilizado neste trabalho para determinação do tamanho das AuNPs após confirmada a formação das mesmas por espectrofotometria UV-Vis. Também foram analisadas as variações de tamanho das AuNPs das amostras com o passar do tempo, de forma a averiguar sua estabilidade. Essas análises foram realizadas por equipamento Zetasizer Nano-ZS da marca Malvern, operando com laser de He-Ne com comprimento de onda 633 nm, ângulo fixo de 173°, temperatura de 25 °C e adquirindo 10 medidas.

4.3.3. Potencial Zeta (PZ)

Quando uma nanopartícula é dispersa em solução, uma dupla camada elétrica (DCE) é formada. Essa dupla camada elétrica é formada por íons que apresentam carga oposta a carga da nanopartícula (camada de Stern) e por uma camada mais exterior formada por íons de ambas as cargas (camada Difusa). Quando campo elétrico é aplicado sobre a amostra, as nanopartículas se movem na direção do eletrodo de carga oposta a ela. A interface entre nanopartícula e o meio, ao se mover, se dá em um plano chamado plano de escorregamento, localizado entre a camada de Stern e a camada difusa. O potencial neste plano de cisalhamento é conhecido por potencial zeta.

O valor do potencial zeta varia de acordo com a estabilidade da nanopartícula. Portanto, a determinação desse parâmetro é importante para se verificar o quão estável é a solução coloidal. Independente do sinal, quanto maior o módulo do valor de potencial zeta, maior a estabilidade da nanopartícula naquela solução (BHATTACHARJEE, 2016).

A análise de potencial zeta foi realizada com célula capilar descartável DTS1070 da marca Malvern no equipamento Zetasizer Nano-ZS também da marca Malvern, voltagem máxima de ± 160 V, temperatura de 25 °C e adquirindo 10 medidas.

4.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Difração de elétrons de área selecionada (DEAS)

A microscopia eletrônica, desde seu surgimento, se mostrou uma alternativa para ultrapassar os limites da microscopia ótica. Enquanto a microscopia ótica se baseava no uso da luz visível, que apresenta um limite de comprimento de onda, a microscopia eletrônica utiliza elétrons acelerados para observar uma amostra. Quando acelerados, os elétrons podem se comportar como onda, apresentando comprimentos de onda menores do que a luz visível, o que produz uma maior resolução (CALLISTER; RETHWISCH, 2011).

Dentre os tipos de microscopia eletrônica, temos a microscopia eletrônica de transmissão (MET), que se baseia na irradiação de um feixe de elétrons sobre uma amostra, geralmente fina e de pequena dimensão, pois materiais sólidos apresentam alta absorvidade de feixe de elétrons (CALLISTER; RETHWISCH, 2011). A interação entre o feixe e a amostra produz partículas carregadas e fótons. Através da detecção destes produtos é possível a obtenção das imagens de MET e DEAS (GOODHEW; HUMPHREYS; BEANLAND, 2000).

As duas análises, MET e DEAS, foram realizadas com as AuNPs formadas por cada amostra com objetivo de observar o tamanho das partículas, sua morfologia e sua estrutura cristalina. Os porta amostras de grade de cobre revestida com carbono, da marca Electron Microscopy Sciences e modelo CF-200 Cu, foram molhados com as soluções de AuNPs sintetizadas por meio de micropipetas. Em seguida os porta amostras foram colocados em dessecadores por 24 h à temperatura ambiente para evaporação do solvente. Após esse tempo o material foi analisado. As imagens de MET obtidas foram realizadas no modo STEM (sigla em inglês para Microscopia eletrônica de varredura por transmissão). O microscópio eletrônico de transmissão utilizado era da marca FEI e de modelo TECNAI G2-F20, e operava com tensão de 200 kV.

4.3.5. Espectrometria de massa (EM)

A Espectrometria de massa é um método analítico que se baseia na ionização

de compostos e posterior detecção destes compostos e seus produtos. Essa ionização ocorre, por exemplo, por ionização eletrônica (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Um elétron entra em contato com o composto a ser analisado e este forma um íon molecular. Este íon molecular pode se fragmentar na forma de íon com número par de elétrons e um radical ou em íon com número ímpar de elétrons e uma molécula. Cada um desses íons oriundos da fragmentação também podem sofrer sua própria fragmentação. Os íons produzidos são separados pelo espectrômetro de massa pela sua razão massa-carga e são detectados de acordo com sua quantidade, formando assim um espectro de massas, gráfico de barras no qual o eixo y corresponde a abundância relativa de um composto e o eixo x corresponde a razão massa carga (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Essa análise pode ser aplicada em várias áreas, como bioquímica, controle de poluição, ciências forenses e monitoramento de processos. Neste trabalho esse método analítico foi utilizado para detectar os possíveis gases formados durante a síntese das AuNPs, assim auxiliando esclarecer o mecanismo de formação das nanopartículas. O equipamento utilizado era do modelo Omnistar GSD 320 da marca Pfeiffer Vacuum.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As AuNPs foram obtidas via fotoquímica irradiando-se soluções aquosas de diferentes concentrações $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Para irradiação utilizou-se um laser de Nd:YAG com λ de 532 nm. Os resultados são apresentados discutindo-se os efeitos das condições experimentais, como influência do volume irradiado, concentração do sal de ouro e tempo de irradiação, na morfologia e no tamanho das nanopartículas sintetizadas.

5.1. Síntese de AuNPs à partir de solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

5.1.1. Efeito do volume da solução irradiada na formação de AuNPs

Inicialmente foram realizadas as sínteses utilizando amostras constituídas de solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. O primeiro teste teve por objetivo determinar o volume de solução mais adequado para a geração das AuNPs. Foram preparadas três amostras, TV1, TV2 e TV3 e estas foram irradiadas por laser com λ de 532 nm por 20 min. Após a irradiação as três amostras foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis e seus espectros de absorção são apresentados na Figura 10. Observou-se para todas as amostras a formação de uma banda de absorção plasmônica centrada em 520 nm referente às AuNPs.

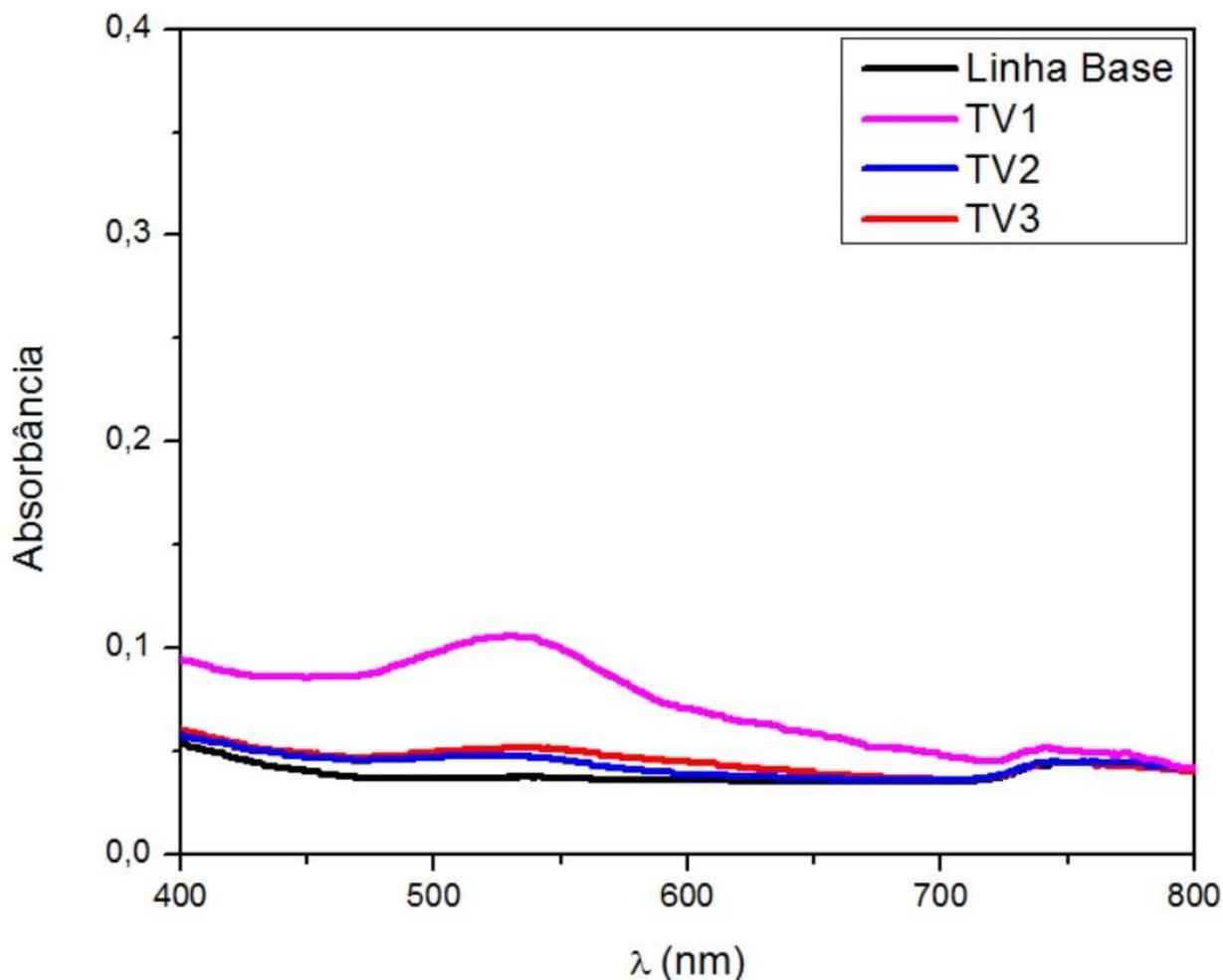


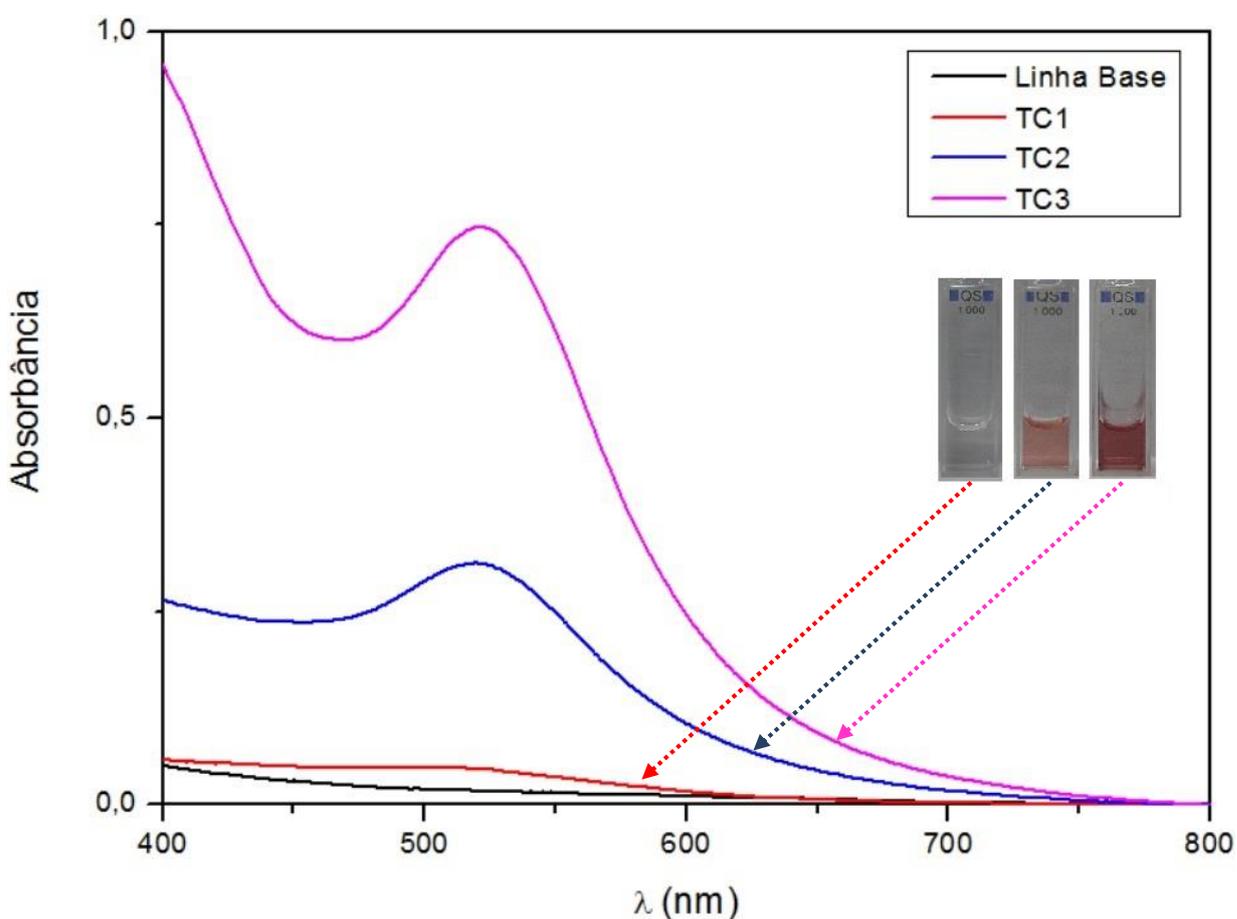
Figura 10 - Espectro de absorção das amostras TV1, TV2 e TV3 após irradiação por laser com λ de 532 nm por 20 min.

Ao observar o espectro de absorção pode-se notar que a curva referente a amostra de volume de 1 mL apresentou uma maior absorbância em comparação as outras duas amostras. Uma maior absorbância indica a formação de um maior número de AuNPs (ANYFANTIS et al., 2015). A explicação para o volume de 1 mL apresentar o melhor resultado advém do tamanho da cubeta na qual a solução fica contida durante a irradiação e do diâmetro do feixe de laser. Devido ao tamanho diminuto do recipiente e agitação limitada pelo pequeno tamanho da barra magnética, soluções de volumes maiores que 1mL provavelmente não são bem homogêneas. O tamanho do feixe de laser por ser menor do que 1 cm também contribui para esse resultado.

Porém é válido ressaltar que com recipientes de formatos diferentes, maior diâmetro de feixe de laser ou simplesmente com maior tempo de irradiação as amostras TV2 e TV3 poderiam apresentar picos de absorbância tão destacados quanto o da amostra TV1.

5.1.2. Efeito da concentração da solução na formação de AuNPs

Três concentrações diferentes de ácido tetracloroáurico também foram testadas. A amostra TC1 apresentou concentração de $2,54 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, a amostra TC2 apresentou concentração de $2,54 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e a amostra TC3 apresentou concentração de $2,54 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Estas amostras foram irradiadas por 4 h com laser com λ de 532 nm e o espectro de absorção resultante pode ser visto na Figura 11.



Após 4h de irradiação nota-se a formação de picos ou início de picos por volta de 520 nm, o que comprova a formação de AuNPs (BINAYMOTLAGH et al., 2016; LEE, J.; LEE, M., 2016; SONG et al., 2016). Os picos apresentam maior absorbância e se tornam mais destacados à medida que a concentração aumenta, indicando a formação de um maior número de AuNPs (ANYFANTIS et al., 2015).

Com relação a coloração das amostras, uma mudança de cores para um tom róseo/avermelhado é característico da formação de AuNPs (BINAYMOTLAGH et al., 2016; LEE, J.; LEE, M., 2016). Nota-se que as amostras TC2 e TC3 apresentaram essa alteração na coloração, enquanto no caso de TC1 essa alteração é quase imperceptível a olho nu. Isso ocorre devido a concentração mais baixa desta amostra, o que resulta em menor número de AuNPs formadas. É possível notar também que a coloração de TC3 é mais forte do que TC2, o que também corresponde a um maior número de AuNPs formadas.

As soluções coloidais TC1, TC2 e TC3 foram analisadas por EDL com o objetivo de determinar se há influência da concentração na distribuição de tamanho das AuNPs. A Figura 12 apresenta a distribuição de tamanho de partículas de cada uma dessas amostras.

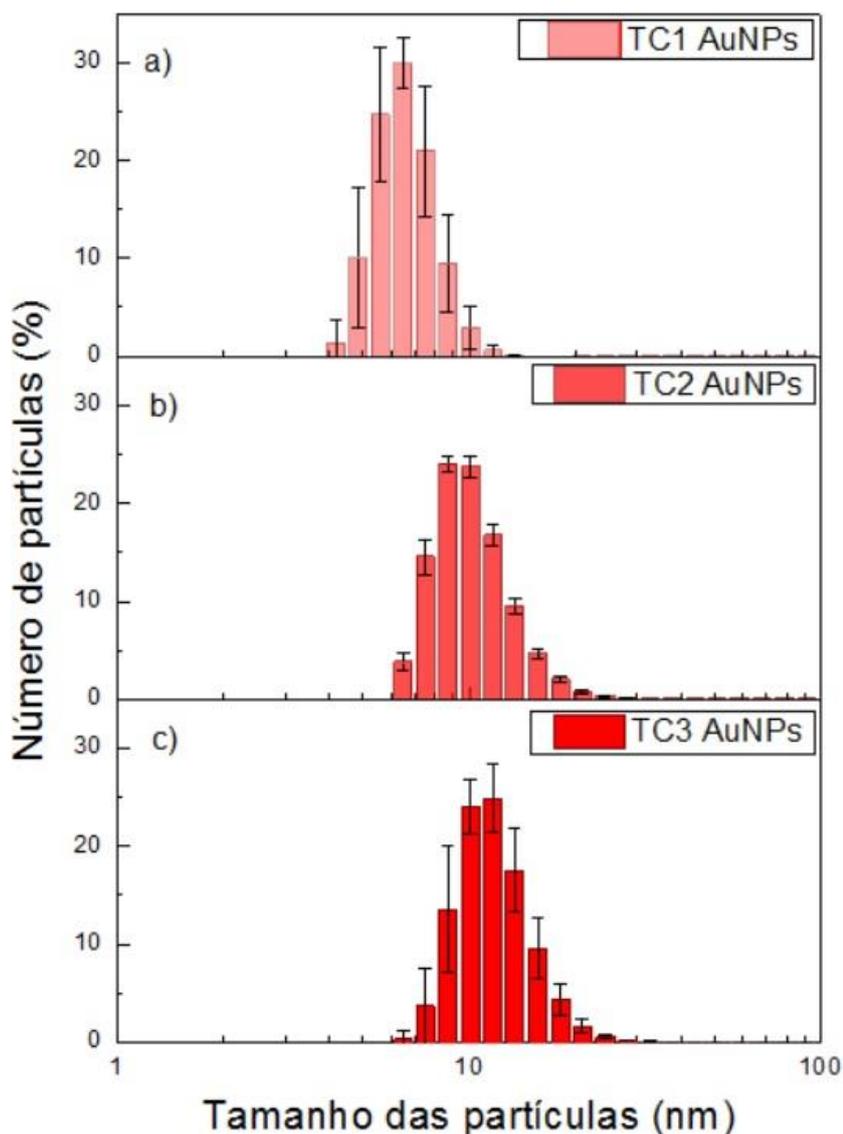


Figura 12 - Distribuição de tamanhos das AuNPs formadas pelas amostras a) TC1, b) TC2 e c) TC3 após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.

Observa-se que as distribuições são monomodais e que a amostra TC1, de menor concentração de sal de ouro, apresentou formação de AuNPs de menor tamanho. O tamanho médio das AuNPs de TC1 foi de $6,50 \pm 2,58$ nm. Enquanto isso, para a amostra TC2 esse valor é de $8,72 \pm 0,80$ nm e para a amostra TC3 esse valor é de $11,70 \pm 3,46$ nm. Com isso pode-se sugerir que quanto mais baixa a concentração de sal de ouro na solução menor o tamanho das nanopartículas obtidas, fato também observado por Anyfantis et al. (2015).

Os tamanhos de AuNPs obtidos com a metodologia apresentada neste trabalho são comparáveis aos tamanhos presentes na literatura. Turkevich, Stevenson e Hillier (1951) conseguiram sintetizar AuNPs de tamanhos próximos à 10 nm enquanto Tetsu, Mizuki e Toyoki (1997) conseguiram sintetizar AuNPs de tamanhos entre 2 e 10 nm e em ambos os trabalhos estabilizantes foram utilizados. Já neste trabalho conseguiu-se tamanhos similares sem a utilização de estabilizantes. Os tamanhos de partícula obtidos neste trabalho também são similares aos tamanhos reportados via ablação à laser por Binaymotlagh et al. (2016) e via irradiação em 790 nm com laser Ti:Safira por Moore Tlibbetts et al. (2016), o que prova que irradiação por laser em 532 nm é um método funcional para a produção de AuNPs.

A Figura 13 apresenta as imagens de MET das AuNPs preparadas em diferentes concentrações e suas respectivas distribuições de tamanho.

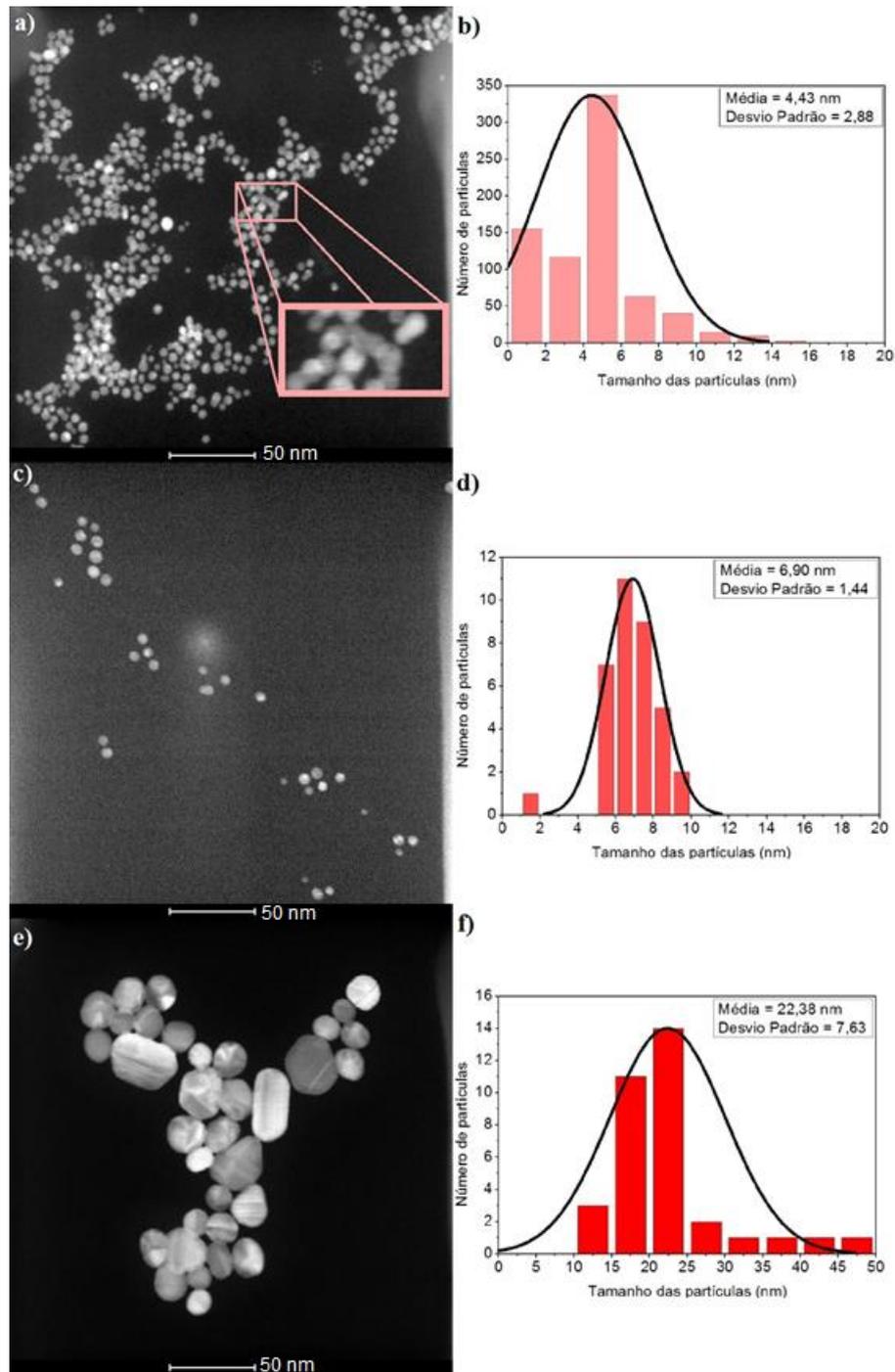


Figura 13 - Microscopias obtidas por MET de a) TC1, c) TC2 e e) TC3 e suas respectivas distribuições de tamanho de partículas b), d) e f). O destaque na parte a) se refere as partículas fundidas.

Observa-se por meio das imagens obtidas de TC1 (Figura 13 a)), TC2 (Figura 13 c)), e TC3 (Figura 13 e)) que em todas as amostras as nanopartículas apresentam uma tendência de se agrupar, porém em TC1 aparenta existir partículas que sofreram fusão (Figura 13 a) em destaque), fato também relatado por Moore Tibbetts et al. (2016). Segundo Chin e Lagacé (1996), como ocorre a formação de plasma devido a irradiação à laser com λ de 532 nm (CHIN;LAGACÉ, 1996), o calor desse plasma pode

ser o responsável por essa fusão. Uma menor concentração de reagente leva a uma menor quantidade de compostos, seja reagentes ou AuNPs já formadas, para absorver esse calor, portanto as AuNPs podem ter sofrido um aquecimento mais intenso nessa amostra. Porém, é válido notar que em sua vasta maioria as nanopartículas se apresentam não fundidas e não aglomeradas.

Os tamanhos das nanopartículas foram aferidos com auxílio do programa ImageJ e seguiram o padrão observado via EDL. Quanto maior a concentração, maior o tamanho médio. Esses tamanhos médios foram de 4,43 nm, 6,90 nm e 22,38 nm para as amostras TC1, TC2 e TC3, respectivamente. Esses tamanhos de nanopartículas podem ser utilizados em aplicações como carreamento de fármacos, por exemplo (BALOGH et al., 2007; CHENG Y. et al., 2008). Quanto a morfologia, nota-se que na amostra TC3 não existem apenas esferas, o que já era esperado, pois concentrações mais altas de sais de ouro costumam apresentar esse comportamento quando AuNPs são formadas (ANYFANTIS et al., 2015).

A análise de DEAS foi realizada nas amostras TC1, TC2 e TC3 e as imagens resultantes podem ser observadas na Figura 14.

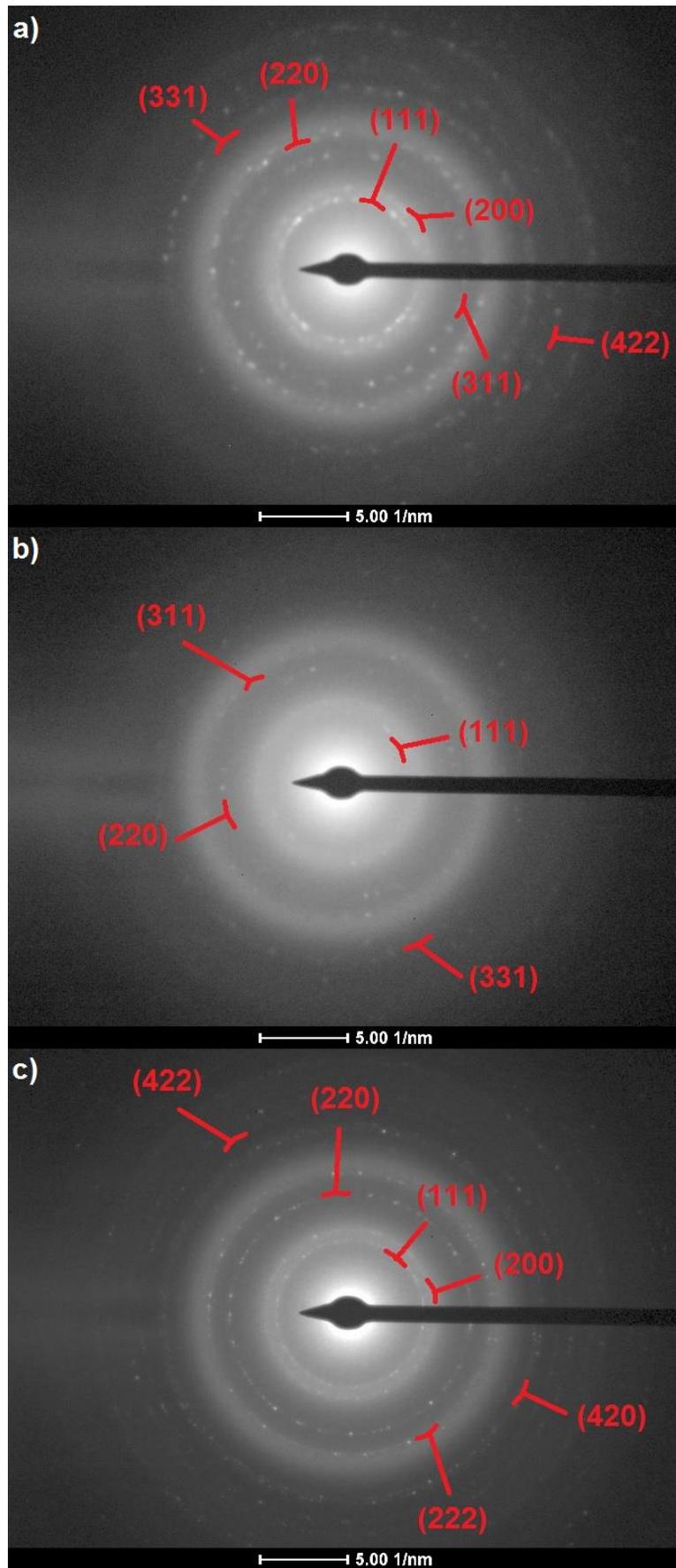


Figura 14 - Imagens de DEAS das amostras a) TC1, b) TC2 e c) TC3 e seus respectivos planos cristalinos correspondentes.

Nesta análise, cada anel formado por pontos brilhantes corresponde à um plano cristalino. Quanto mais pontos em um anel, mais cristais apresentam aquela mesma orientação (TOWE, 1985). Porém, é importante notar que dependendo da distribuição das partículas no porta amostra e dependendo da área onde a análise foi feita podem haver poucas partículas, o que resulta em poucos pontos brilhantes. Não significando, portanto, que a amostra é amorfa. É exatamente isso que ocorreu com a amostra TC2, como foi visto nas imagens de MET. TC1 apresentou muitas partículas próximas umas das outras. Já TC3 apresentou poucas partículas, porém essas partículas eram maiores, resultando em um sinal mais forte.

Os anéis que puderam ser identificados com ajuda do programa ImageJ foram medidos e seus valores convertidos em valores de distância interplanar (d_{hkl}) que por sua vez foram comparados com os valores d_{hkl} do cartão JCPDS nº 04-0784 do ouro de estrutura cristalina cúbica de face centrada (CFC). Como os valores de d_{hkl} foram próximos ao do ouro catalogado, pôde-se identificar a quais planos cada anel correspondia (ZHANG et al., 2017). Uma vez que existem no mínimo 4 planos em comum entre cada amostra e o ouro CFC, pode-se confirmar que as AuNPs sintetizadas em TC1, TC2 e TC3 apresentaram estrutura cristalina CFC, que é o tipo de estrutura cristalina mais energeticamente estável no caso de nanopartículas de ouro (SHIM et al., 2003; CALLISTER; RETHWISCH, 2011).

A estabilidade das AuNPs sintetizadas pela amostra TC2 foi avaliada através da variação de seu tamanho e de seu potencial zeta com o passar do tempo. Essa amostra foi escolhida dentre as 3 concentrações estudadas por apresentar a concentração intermediária se comparada as outras duas. A amostra foi estocada no escuro e sob refrigeração em temperatura de aproximadamente 4°C. A variação do tamanho e do potencial zeta das AuNPs com o passar do tempo pode ser observada na Figura 15.

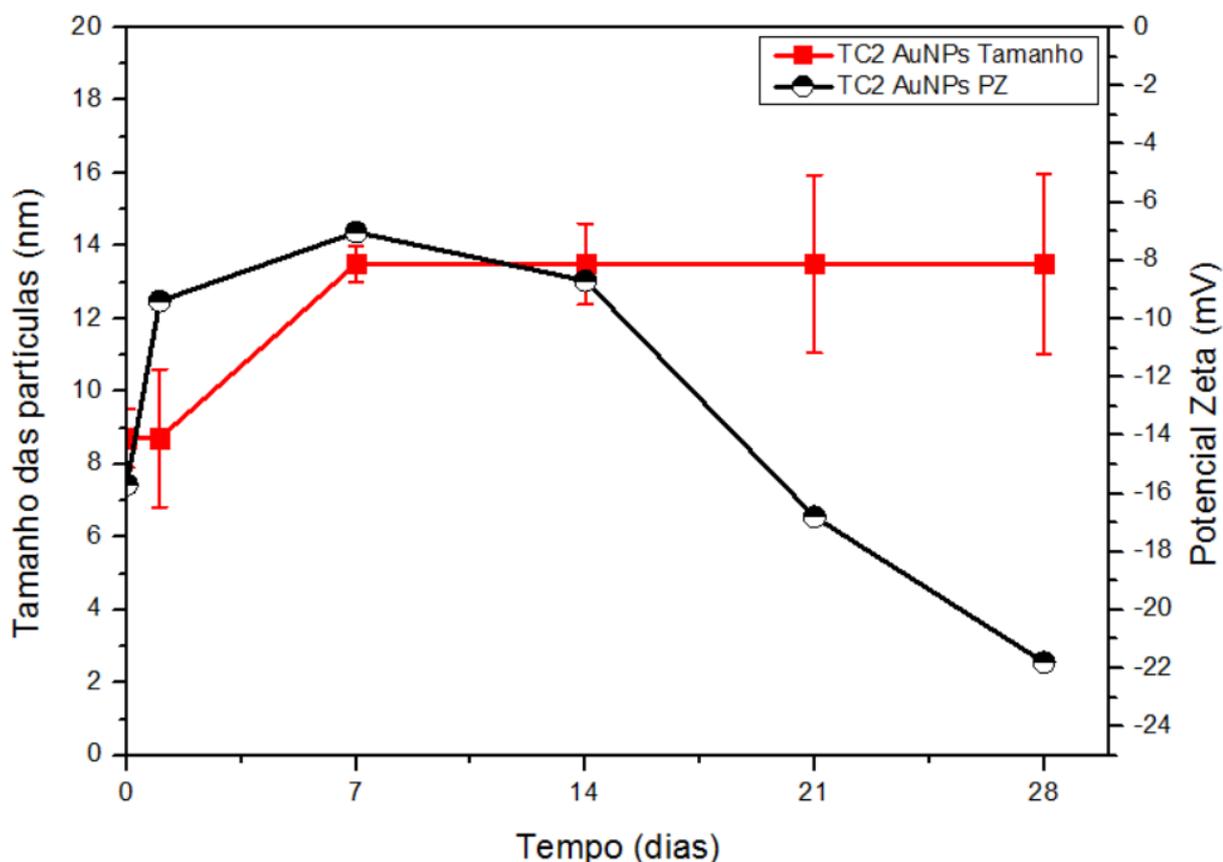


Figura 15 - Variação de tamanho e de PZ das AuNPs produzidas pela amostra TC2 ao longo do tempo com estocagem no escuro e sob refrigeração à 4°C.

Ao observar a figura anterior, nota-se que o tamanho médio das AuNPs se manteve constante até 24 h após sua síntese. Após 1 semana o tamanho da maior parte das partículas passou de aproximadamente $8,72 \pm 0,80$ nm para aproximadamente $13,50 \pm 0,51$ nm e assim se manteve até 28 dias de estocagem (aproximadamente 1 mês).

A variação do tamanho das AuNPs pode ser explicada pela variação do seu próprio PZ. Quanto mais o valor de PZ se afasta de 0 mV, seja em direção positiva ou negativa, mais estável são as nanopartículas (BHATTACHARJEE, 2016). O aumento de tamanho das AuNPs após 1 semana é acompanhado de uma aproximação de 0 mV do valor de PZ, partindo de aproximadamente -10 mV para aproximadamente -7 mV, ou seja, quando as AuNPs se apresentaram menos estáveis, seu tamanho aumentou. Em seguida os valores de PZ se afastaram de 0 mV e com isso não houve outro aumento de tamanho das AuNPs.

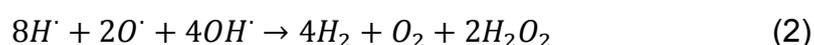
Balasubramanian et al. (2010) pesquisou sobre a estabilidade das AuNPs com relação ao seu tamanho. Em seu trabalho, no qual analisa AuNPs estabilizadas por

citrato de sódio, as AuNPs apresentaram um mesmo tamanho de 20 nm por até 20 dias. É esperado que as AuNPs com algum estabilizante mantenham o seu tamanho inicial por maior tempo se comparado ao tamanho das AuNPs obtidas pela amostra TC2, que não contém estabilizante. Atingir uma estabilidade entre 1 semana e 4 semanas com tamanho aproximado por volta de 13 nm e sem estabilizantes é algo destacável.

5.2. Mecanismo de síntese para formação de AuNPs via irradiação laser com λ de 532 nm

A síntese das nanopartículas de ouro foi realizada por meio de irradiação das amostras com laser Nd:YAG com λ de 532 nm. O mecanismo de formação das AuNPs pode ser explicado pela interação entre o feixe de laser com o ácido tetracloroáurico e com a água.

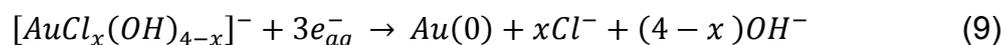
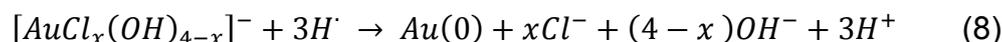
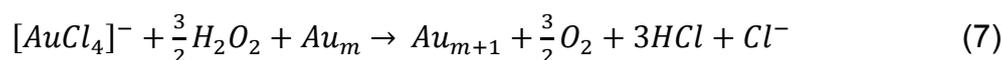
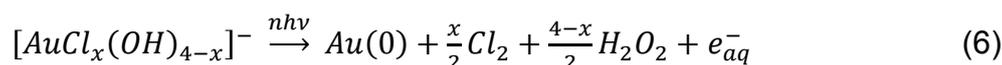
Chin e Lagacé (1996) afirmam que a irradiação proveniente de laser Nd:YAG com λ de 532 nm em água pode gerar plasma, nas condições de duração de pulso de 5 ns, frequência de repetição de 10 Hz e energia de pulso de 10 mJ. Tais condições são semelhantes as utilizadas nos experimentos descritos neste trabalho. A formação do plasma, que por sua vez leva a quebra das moléculas de H₂O em radicais livres, presentes na Equação 1 (CHIN;LAGACÉ, 1996). Esses produtos posteriormente se recombinam (Equação 2). Devido a presença do plasma, o H₂O₂ resultante dessa recombinação pode se dissociar em H₂O e O₂.



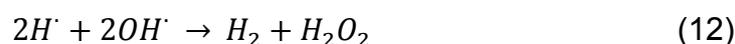
Moore Tibbetts et al. (2016) também fizeram experimentos com irradiação à laser, porém seu laser era de Ti:Safira com λ de 790 nm, duração de pulso de 35 fs, frequência de repetição de 1 kHz e energia de pulso de 5 mJ. Em seu trabalho são descritos mecanismos de quebra da molécula de água e também de redução do H_{AuCl}₄. O mecanismo de quebra das moléculas de água está presente nas Equações 3, 4 e 5. O mecanismo proposto segue basicamente o que havia sido descrito por Chin e Lagacé (1996), no que diz respeito a formação de radicais livres e H₂O₂.



Com relação aos mecanismos de redução do ouro, Moore Tibbetts et al. (2016) apresentam 4 reações diferentes: a) fotólise direta do $[AuCl_x(OH)_{4-x}]^-$ pelos fótons do laser (Equação 6); b) redução auto catalítica de $[AuCl_4]^-$ por H_2O_2 oriundo da fotólise da água na presença de superfície de Au (Equação 7); c) redução de $[AuCl_x(OH)_{4-x}]^-$ por radicais livres (Equação 8); d) redução de $[AuCl_x(OH)_{4-x}]^-$ por elétrons hidratados (Equação 9) oriundos da fotólise da água.



Considerando os dois trabalhos de Chin e Lagacé (1996) e de Moore Tibbetts et al. (2016), propõe-se que as reações presentes nas Equações 10, 11, 12 e 13 representem o mecanismo de quebra da molécula de H_2O quando se irradia essa molécula na presença de $HAuCl_4$ com laser Nd:YAG com λ de 532 nm. Essas reações são propostas considerando que o plasma é o responsável pela quebra das moléculas de H_2O_2 , podendo gerar radicais livres que se recombinaem tanto em H_2O_2 quanto em H_2 , e pela quebra da molécula de H_2O_2 gerando O_2 e H_2O .



De forma a confirmar se ocorre realmente a formação de H_2 e O_2 nas reações

propostas, uma amostra TC2 foi preparada e foi analisada por espectrometria de massa. Escolheu-se a amostra TC2 por essa produzir uma quantidade mediana de AuNPs dentre as concentrações analisadas, de acordo com a espectrofotometria UV-Vis. Essa amostra teve N_2 injetado no interior da cubeta por 20 min antes do processo de irradiação por laser para retirada do ar atmosférico. A retirada do ar auxilia na visualização de pequenas quantidades de O_2 produzidas, pois o ar atmosférico já é rico em O_2 e isso poderia mascarar o sinal de formação de mais moléculas desse gás. O espectro de massas obtido após análise está representado na Figura 16.

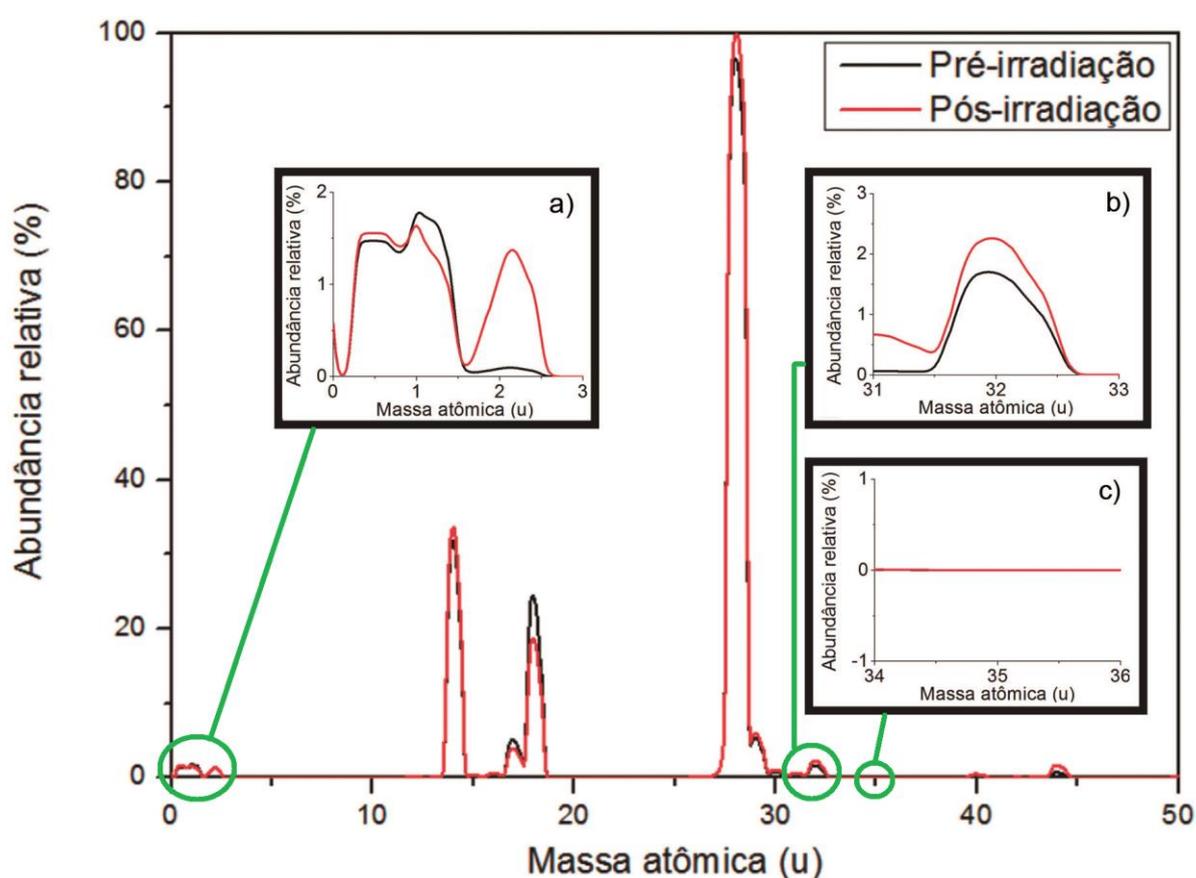


Figura 16 - Espectro de massa da amostra TC2. a) Aproximação para massa atômica do H_2 . b) Aproximação para a massa atômica do O_2 . c) Aproximação para massa atômica correspondente ao Cl_2 .

Na Figura 16 a) e b), observa-se pelos espectros que as quantidades de H_2 (massa atômica 2 u) (NIST, 2017a) e O_2 (massa atômica 32 u) (NIST, 2017b) tiveram um aumento. Este resultado indica a possibilidade do mecanismo proposto de quebra das moléculas de água.

Com relação aos mecanismos de redução do Au, propõe-se que ocorram as reações presentes nas Equações 6, 7, 8, 9. Ao observar a Figura 16 c) nota-se que

não há traços de Cl_2 presentes no espectro por volta de 35 u (NIST, 2017c) (Obs.: Os picos referentes à Cl_2 podem ser observados em 35 u e 70 u), porém não se pode afirmar que não haja a formação deste composto. Como a quantidade de soluto (sal de ouro) é muito pequena comparada a quantidade de solvente (água), o Cl_2 produzido pode não ter sido detectado por estar em pequenas quantidades.

5.3. Efeito da presença de biopolímeros na solução durante a formação das AuNPs

As irradiações na presença de biopolímeros foram realizadas utilizando concentração de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ de $2,54 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ correspondente a amostra TC2. Essa concentração foi escolhida por apresentar formação de quantidade mediana de AuNPs dentre as diferentes concentrações investigadas. Além disso esta foi a amostra cujas partículas não apresentaram fusão ou diferentes morfologias.

Os biopolímeros selecionados para os experimentos foram DNA e BSA. O DNA foi escolhido devido à sua ampla variedade de aplicações, podendo atuar como molde para o crescimento de nanoestruturas (SONG et al., 2016) e como carreador de fármacos quando acoplado à AuNPs (HURST; LYTTON-JEAN; MIRKIN, 2006). Já a BSA foi escolhida por ser comumente utilizada em testes devido a sua similaridade com a albumina de soro humano (HSA), responsável pelo transporte de medicamentos pelo plasma sanguíneo (BINAYMOTLAGH et al., 2016).

5.3.1. Síntese de AuNPs na presença de DNA

Duas amostras DNAAu contendo sal de ouro foram preparadas, uma para controle e outra destinada aos experimentos de síntese das nanopartículas. A solução de controle foi estocada na ausência de luz e seus espectros de absorção foram medidos em intervalos de tempo determinados, de modo a se assegurar que não estivesse ocorrendo reação espontânea entre o DNA e os íons de ouro. A Figura 17 apresenta os espectros da solução controle em diferentes tempos.

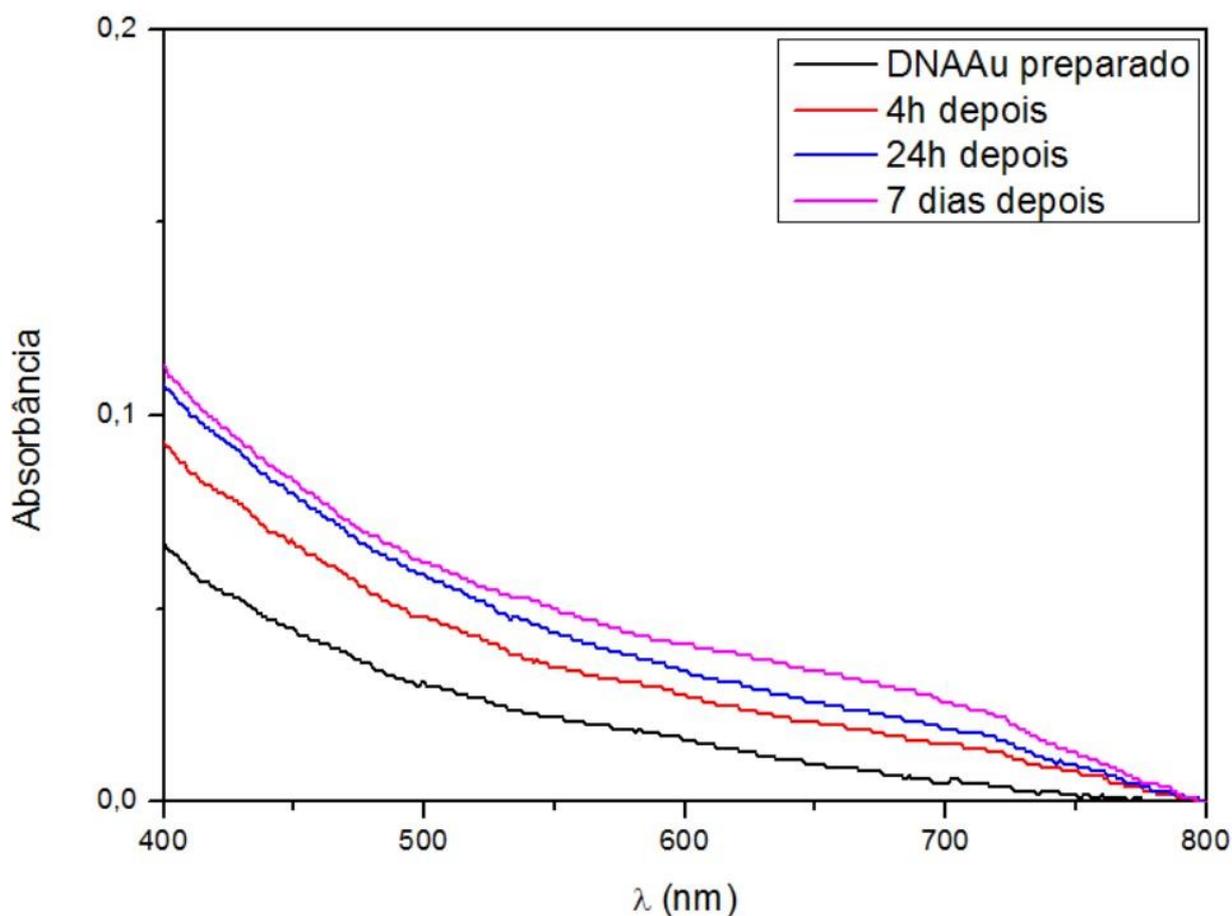


Figura 17 - Espectro de absorção da amostra DNAAu após preparo e sem passar por irradiação à laser.

Pode ser observado por esses espectros de absorção que mesmo após uma semana não houve aparecimento da banda plasmônica referente às AuNPs, ou seja, não houve formação de nanopartículas.

Por outro lado, a solução DNAAu com sais de ouro que foi irradiada com laser Nd:YAG em 532 nm apresentou em função do tempo um aumento da absorção da banda plasmônica atribuída a formação das AuNPs (BINAYMOTLAGH et al., 2016; LEE, J.; LEE, M., 2016; SONG et al., 2016) conforme apresentado na Figura 18. Ocorreram também mudanças de coloração para rósea/avermelhada, característica da formação de AuNPs (BINAYMOTLAGH et al., 2016; LEE, J. ; LEE, M., 2016).

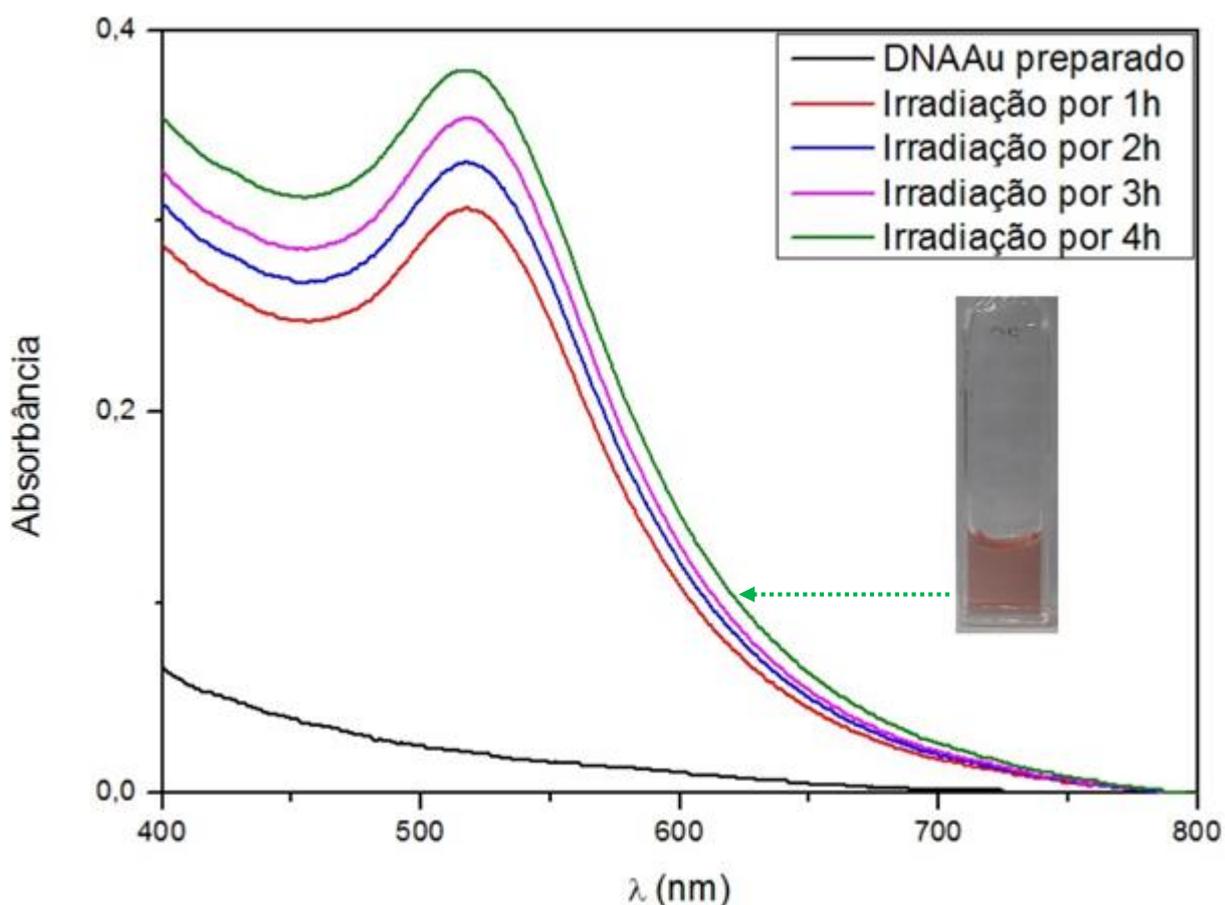


Figura 18 - Espectro de absorção da amostra DNAAu após preparo e após irradiação por laser Nd:YAG com λ de 532 nm por diferentes intervalos de tempo.

5.3.2. Caracterização das AuNPs sintetizadas na presença de DNA

A distribuição de tamanhos das AuNPs formadas foram determinadas inicialmente pela análise de EDL na amostra DNAAu após irradiação com laser 532 nm por 4 h. Esse tempo foi escolhido por ter apresentado maior absorbância no espectro de absorção, o que significa que um maior número de AuNPs foi formada neste tempo. As distribuições de tamanho são apresentadas na Figura 19.

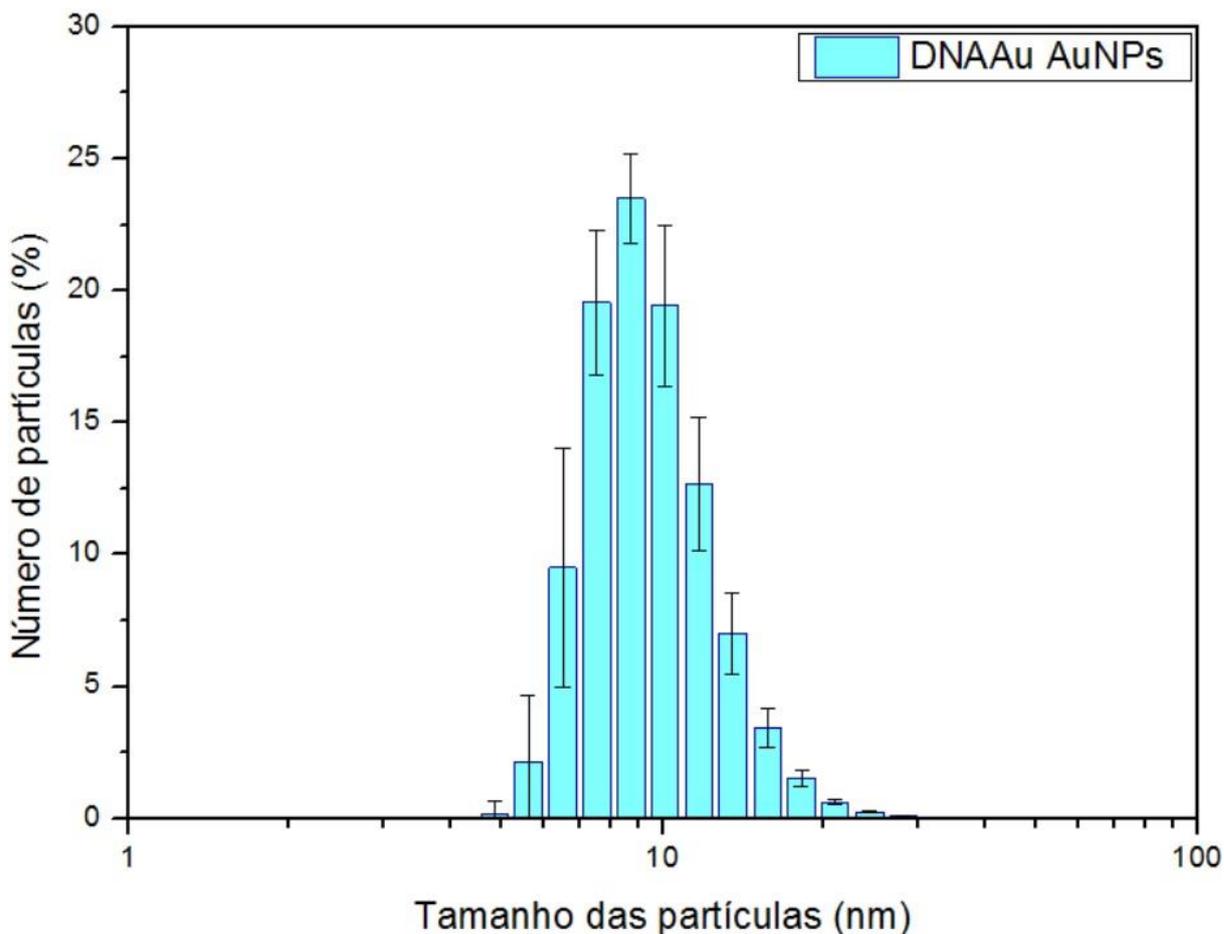


Figura 19 - Distribuição do tamanho das AuNPs formadas pela amostra DNAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.

As AuNPs sintetizadas à partir da solução contendo DNA e sais de ouro apresentaram tamanhos entre 5 nm e 30 nm. O tamanho médio das partículas foi de $8,72 \pm 1,72$ nm, tamanho comparável ao das AuNPs obtidas por Tetsu, Mizuki e Toyoki (1997), que utilizam o 3-mercaptopropionato como estabilizante e citrato de sódio como agente redutor.

Vale ressaltar que as cadeias de DNA utilizadas não apresentavam qualquer modificação favorável a estabilização das nanopartículas, como formatos específicos que auxiliam no aprisionamento das AuNPs (SONG et al., 2016) ou presença de grupos funcionais que apresentam afinidade com o ouro, como o grupo -SH (LI et al., 2002). Portanto acredita-se que ao fazer testes com DNA com formatos específicos ou com grupos funcionais com afinidade ao Au seja possível obter tamanhos menores de AuNPs.

A solução de sal de ouro contendo DNA, após irradiada por 4 h em laser com λ de 532 nm, foi submetida a análise por microscopia eletrônica de transmissão. As

imagens resultantes dessa caracterização estão presentes na Figura 20 a) e b) juntamente com uma distribuição de tamanho das AuNPs da Figura b) na Figura 20 c).

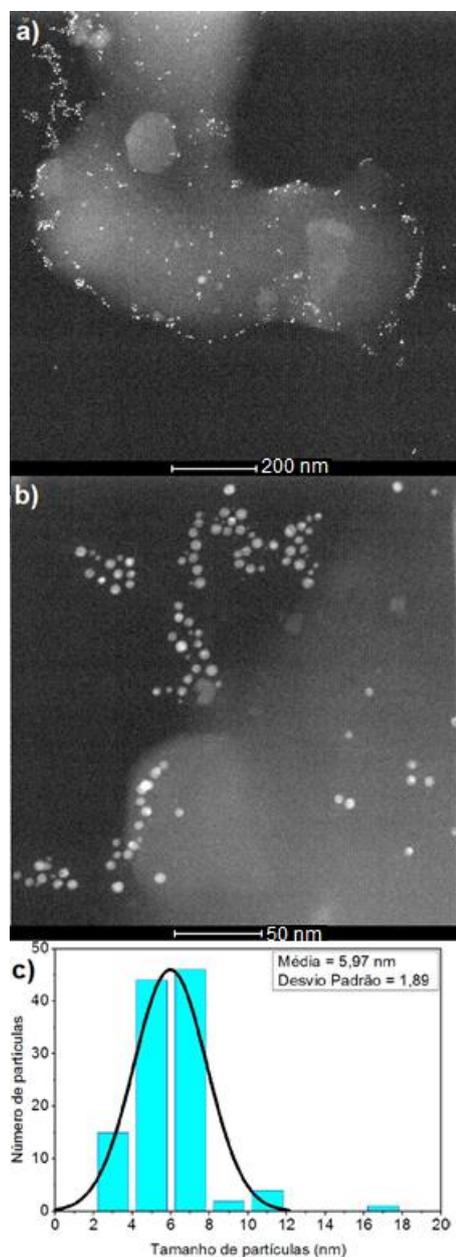


Figura 20 - Imagens obtidas via MET das AuNPs sintetizadas pela amostra DNAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h. A imagem contém duas magnificações diferentes em a) e b) e a distribuição do tamanho de partículas em c), referente a figura b). Os pontos brilhantes representam as AuNPs. Já a massa mais clara representa o DNA.

Ao observarmos as imagens obtidas por MET nota-se que as nanopartículas apresentaram uma morfologia esférica e uma tendência a se agruparem, porém mantendo suas individualidades.

Além disso pode-se notar também que existem AuNPs presentes tanto dentro quanto fora do DNA. Como mencionado na discussão do EDL desta amostra, caso o

DNA tivesse alguma forma específica ou alguma terminação com afinidade pelo Au, provavelmente as AuNPs estariam todas no interior e nas bordas do DNA (LI et al., 2002; SONG et al., 2016).

Com relação ao tamanho das AuNPs, nota-se que o valor determinado à partir da análise das partículas presentes na Figura 20 c) pelo programa ImageJ apresenta um valor de aproximadamente 6 nm, menor do que o valor apresentado na medida por EDL. Isso pode ocorrer pois quando em solução as nanopartículas apresentam moléculas de água, íons e outras moléculas ao seu redor. O EDL é capaz de medir aproximadamente o raio hidrodinâmico, ou seja, o raio da nanopartícula somado ao dessa camada de água/íons/moléculas que se forma ao seu redor (BHATTACHARJEE, 2016). Portanto a medição do tamanho de partículas por MET apresenta um valor mais próximo do real.

As AuNPs obtidas pela amostra DNAAu também foram analisadas por meio de difração de elétrons de área selecionada, no intuito de determinar a estrutura cristalina da amostra. A imagem correspondente à essa análise pode ser visualizada na Figura 21.

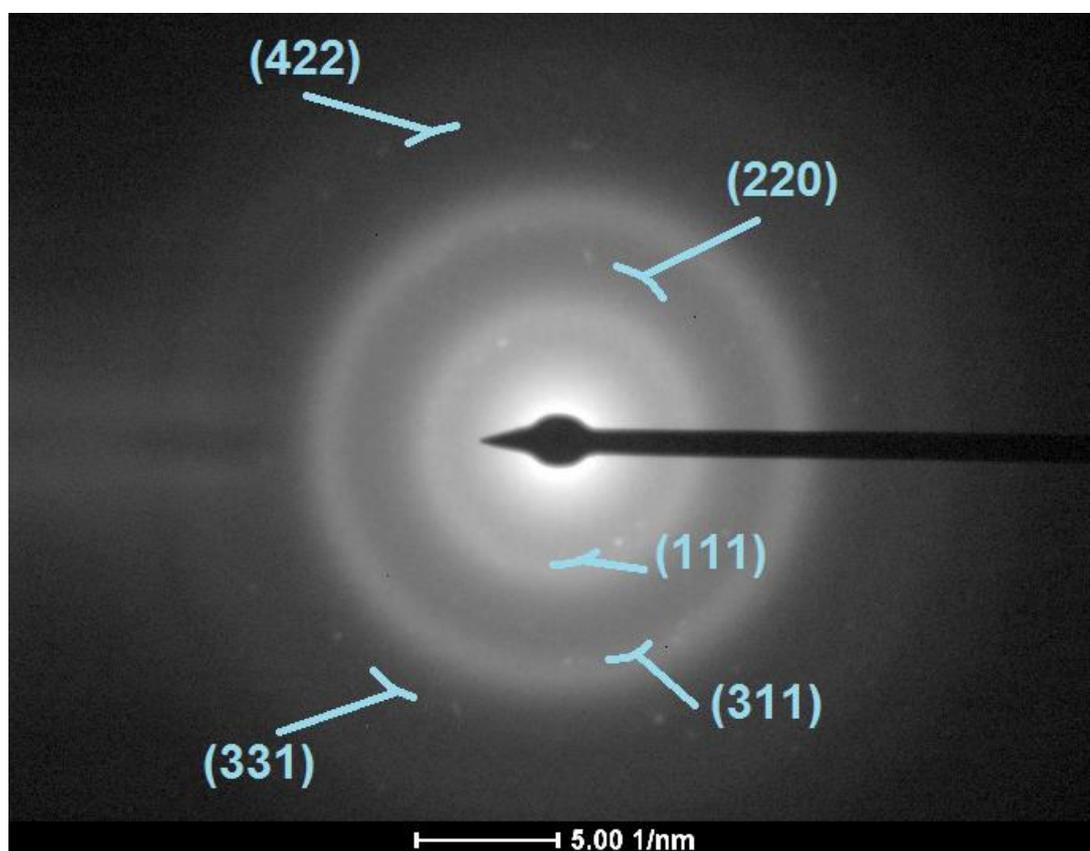


Figura 21 - Imagem obtida por DEAS das AuNPs obtidas pela amostra DNAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.

Os anéis presentes na figura tiveram seus diâmetros aferidos e seus valores convertidos para valores de d_{hkl} . Esses valores d_{hkl} foram comparados com os valores presentes no cartão JCPDS nº 04-0784 e em seguida foram associados aos planos cristalinos correspondentes. Nota-se que nas AuNPs da amostra DNAAu pôde-se identificar 5 planos diferentes, todos correspondendo ao ouro CFC. Portanto a estrutura cristalina das AuNPs dessa amostra é cúbica de face centrada.

A estabilidade foi avaliada à partir da variação do tamanho e do potencial zeta das nanopartículas produzidas pela amostra DNAAu com o passar do tempo. A amostra foi estocada sem iluminação e sob refrigeração em temperatura aproximada de 4 °C. Por meio de EDL e PZ os tamanhos das partículas e os seus respectivos potenciais zeta foram aferidos após determinados intervalos de tempo e os dados são apresentados na Figura 22.

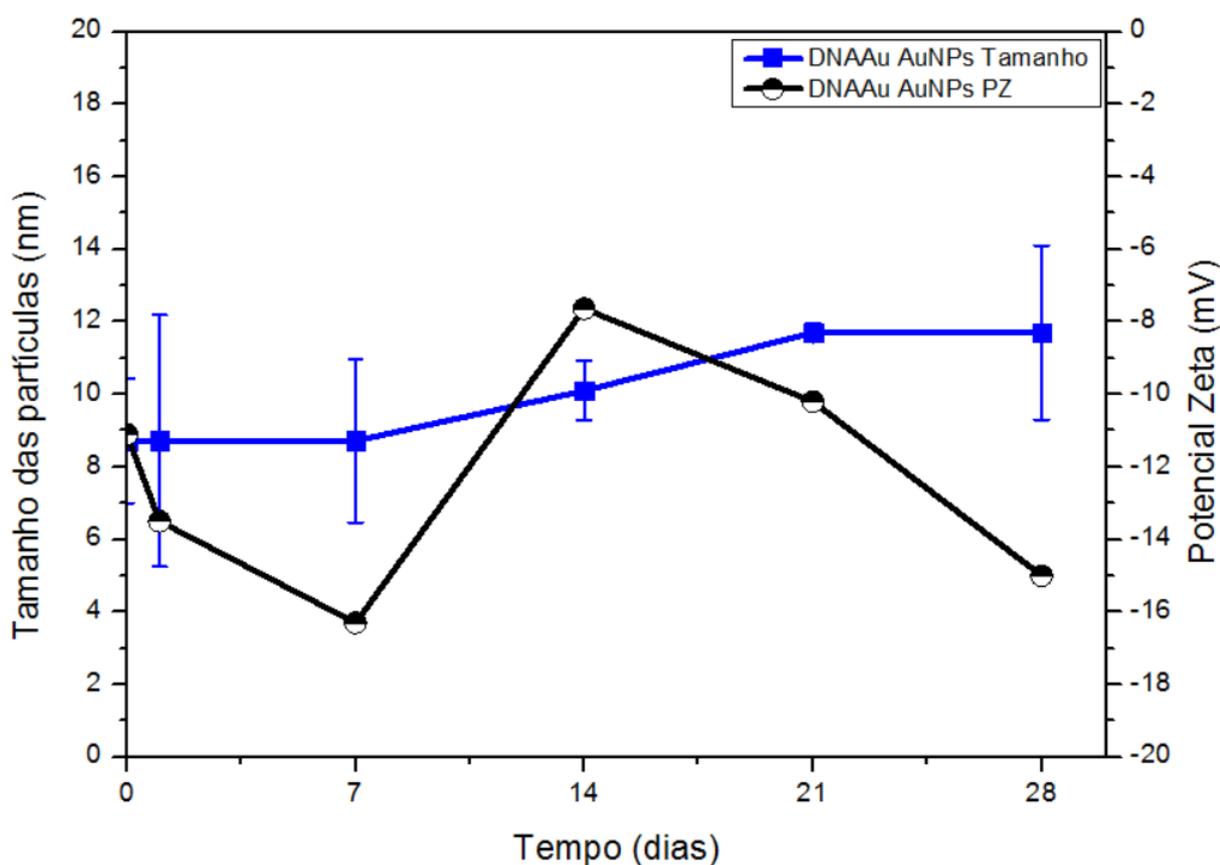


Figura 22 - Variação de tamanho e do PZ das AuNPs produzidas pela amostra DNAAu ao longo do tempo com estocagem no escuro e sob refrigeração à 4°C.

Ao observar a variação do tamanho das nanopartículas vê-se que a mesma se mantém com tamanho próximo de 9 nm por até 1 semana. Após 1 semana o tamanho

sofre um aumento e só se estabiliza novamente na terceira semana, com valor de tamanho aproximado de 12 nm. Ou seja, pode-se afirmar que as nanopartículas ficam estáveis por 1 semana após síntese quando em presença de DNA.

A variação de tamanho ocorrida se dá pelas variações do PZ. O valor de PZ se afasta de 0 mV até aproximadamente 1 semana após a síntese, indicando aumento de estabilidade das AuNPs (BHATTACHARJEE, 2016). Entre 1 semana e 2 semanas houve uma aproximação de 0 mV por parte do PZ e com isso o tamanho das AuNPs aumentou. Após esse aumento, as AuNPs mantiveram seu tamanho em aproximadamente 12 nm, o que vai de acordo com o novo afastamento do valor 0 mV por parte dos valores de PZ medidos para 21 e 28 dias.

Como o DNA utilizado não apresentava nenhum formato específico e nem modificação com grupo funcional -SH, acredita-se que essas nanopartículas possam apresentar uma maior estabilidade caso fossem sintetizadas em meios que apresentem esses dois tipos de DNA modificado.

5.3.3. Síntese de AuNPs na presença de BSA

Do mesmo modo do que foi realizado para as amostras de DNA, foram preparadas duas soluções contendo sal de ouro e BSA (BSAAu). A primeira foi a solução de controle para se garantir que não estaria havendo uma reação espontânea entre o BSA e o sal de ouro na ausência de luz. A Figura 23 apresenta os espectros de absorção em função do tempo de armazenamento da solução. Como pode-se observar, após 7 dias os espectros não apresentaram nenhuma mudança significativa. Portanto, isto sugere que o BSA não é capaz de reduzir o ácido tetracloroáurico por si só.

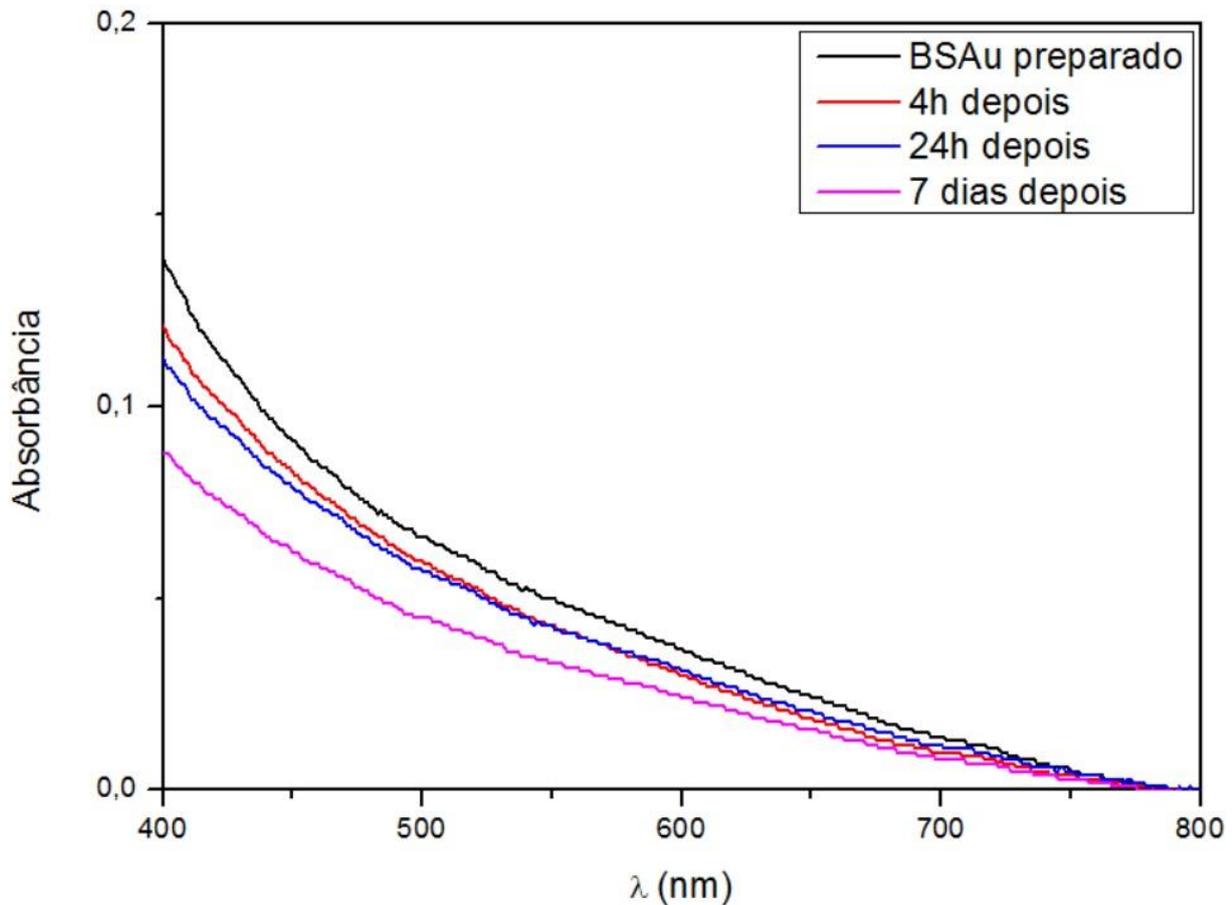


Figura 23 - Espectro de absorção da amostra BSAAu após preparo e sem passar por irradiação à laser.

A segunda amostra BSAAu preparada foi irradiada por laser conforme o método proposto. Seu espectro de absorção está presente na Figura 24.

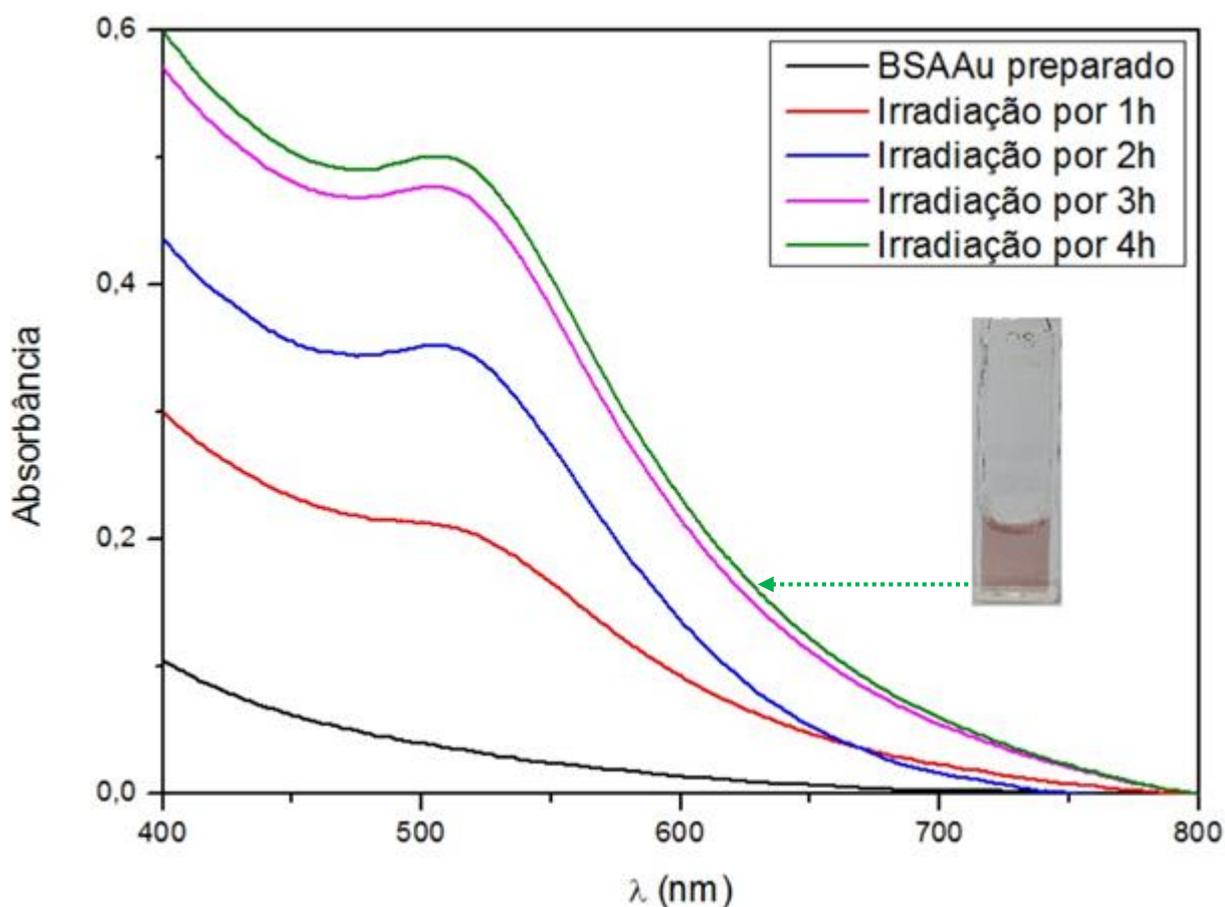


Figura 24 - Espectro de absorção da amostra BSAAu após preparo e após irradiação por laser Nd:YAG com λ de 532 nm por diferentes intervalos de tempo.

Após irradiação nota-se a formação de uma curvatura ou pico pouco destacado por volta de 520 nm, o que caracteriza formação de AuNPs (BINAYMOTLAGH et al., 2016; LEE, J.; LEE, M., 2016; SONG et al., 2016). Também nota-se a presença de coloração rósea após 4 h de irradiação, o que confirma a formação de AuNPs (BINAYMOTLAGH et al., 2016).

5.3.4. Caracterização das AuNPs sintetizadas na presença de BSA

Buscando investigar a distribuição de tamanhos das AuNPs formadas após irradiação da amostra BSAAu, a análise de EDL foi realizada. A distribuição dos tamanhos de partículas obtida pode ser observada na Figura 25.

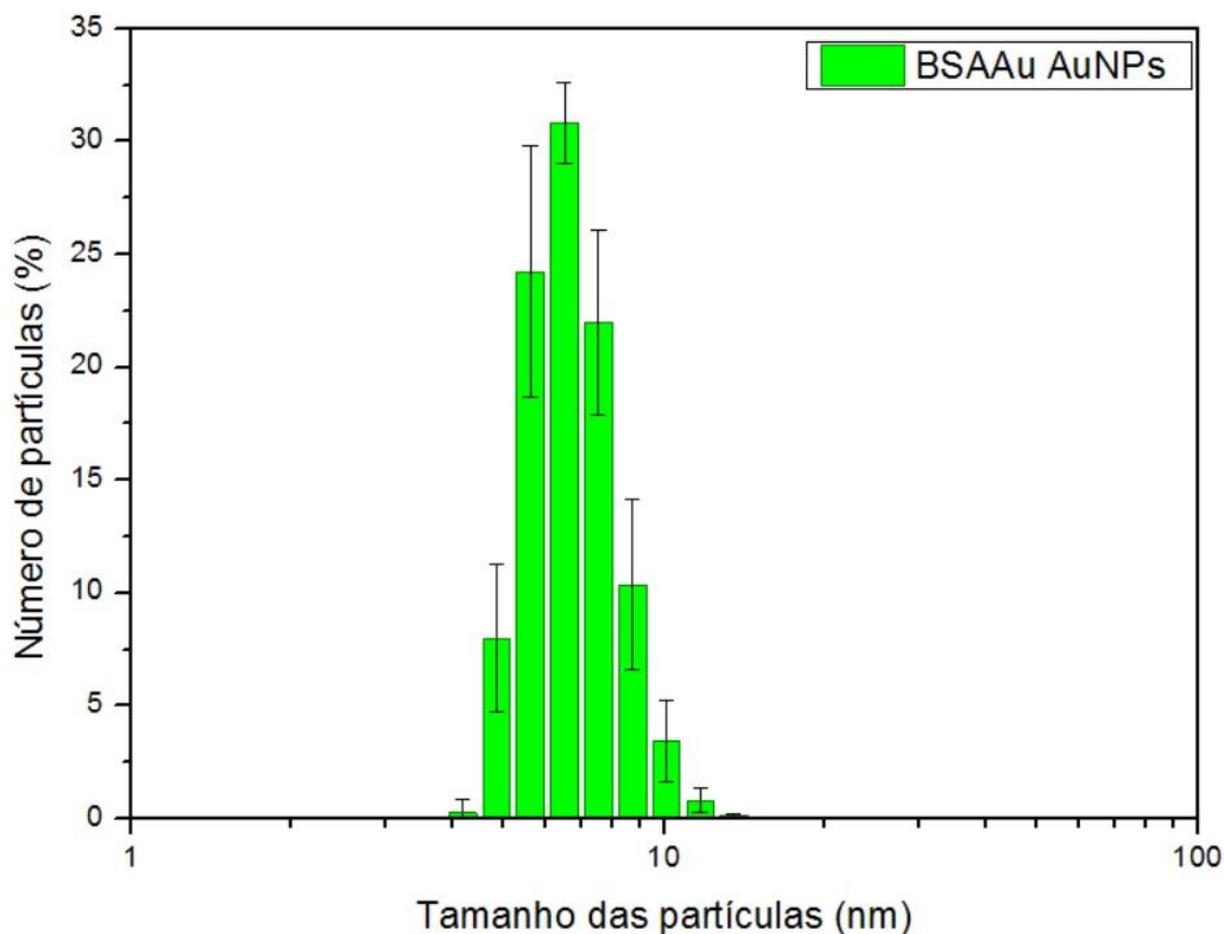


Figura 25 - Distribuição do tamanho das AuNPs formadas pela amostra BSAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.

As AuNPs produzidas à partir da amostra BSAAu apresentaram tamanhos que variavam desde 4 nm até 15 nm. O tamanho médio das partículas foi de $6,50 \pm 1,78$ nm, similar ao tamanho médio de 6 nm obtido via ablação a laser na presença de BSA por Binaymotlagh et al. (2016). Isso prova que o método de produção de AuNPs por irradiação à laser em 532 nm pode ser tão eficiente quanto a ablação à laser, no quesito tamanho de partículas produzidas.

A amostra BSAAu, após irradiada por 4 h em laser com λ de 532 nm, foi submetida a microscopia eletrônica de transmissão. As imagens resultantes dessa caracterização estão presentes nas Figura 26 a) e b) juntamente com um gráfico de distribuição do tamanho de partículas da Figura 26 b) na Figura 26 c).

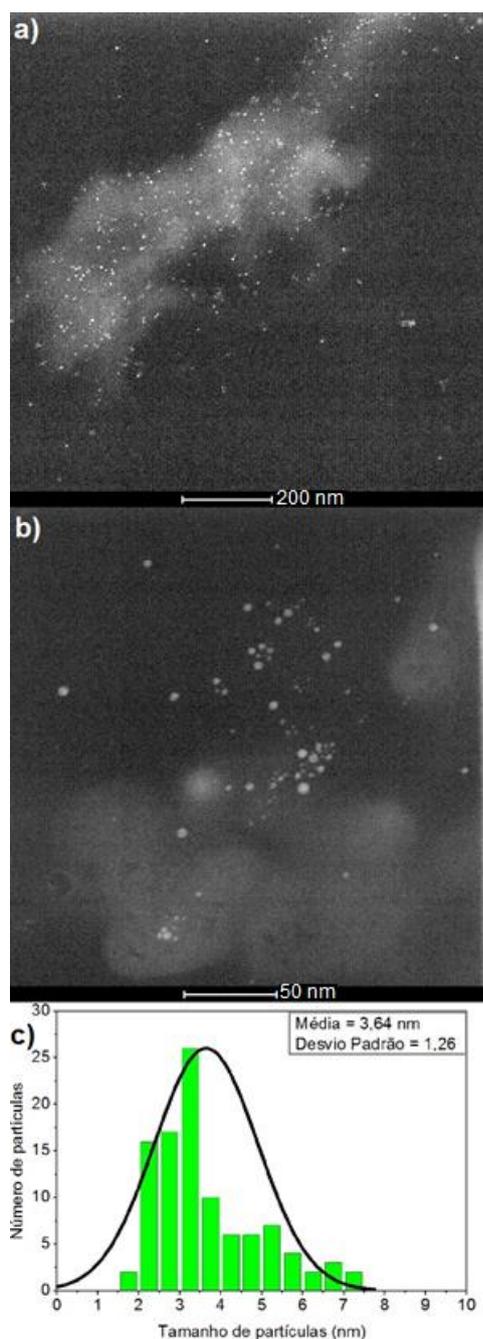


Figura 26 - Imagens obtidas via MET das AuNPs sintetizadas pela amostra BSAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h. A imagem contém duas magnificações diferentes em a) e b) e a distribuição do tamanho de partículas em c), referente a figura b). Os pontos brilhantes representam as AuNPs. Já a massa mais clara representa o BSA.

A primeira coisa que se nota ao observar a Figura 26 a) é que as nanopartículas são muito pequenas e que estão distribuídas dentro da BSA em sua maioria, provável indicativo de sua capacidade carreadora (BINAYMOTLAGH et al., 2016).

A morfologia das AuNPs é esférica e apresenta um certo grau de agrupamento. O tamanho médio das AuNPs foi de 3,64 nm e esse valor se apresentou menor do

que o medido via EDL. Tal fato já era esperado, pois o EDL mede o raio hidrodinâmico da partícula em solução (BHATTACHARJEE, 2016).

As AuNPs obtidas pela amostra BSAAu também foram analisadas por meio de difração de elétrons de área selecionada, no intuito de determinar a estrutura cristalina da amostra. A imagem correspondente à essa análise pode ser visualizada na Figura 27.

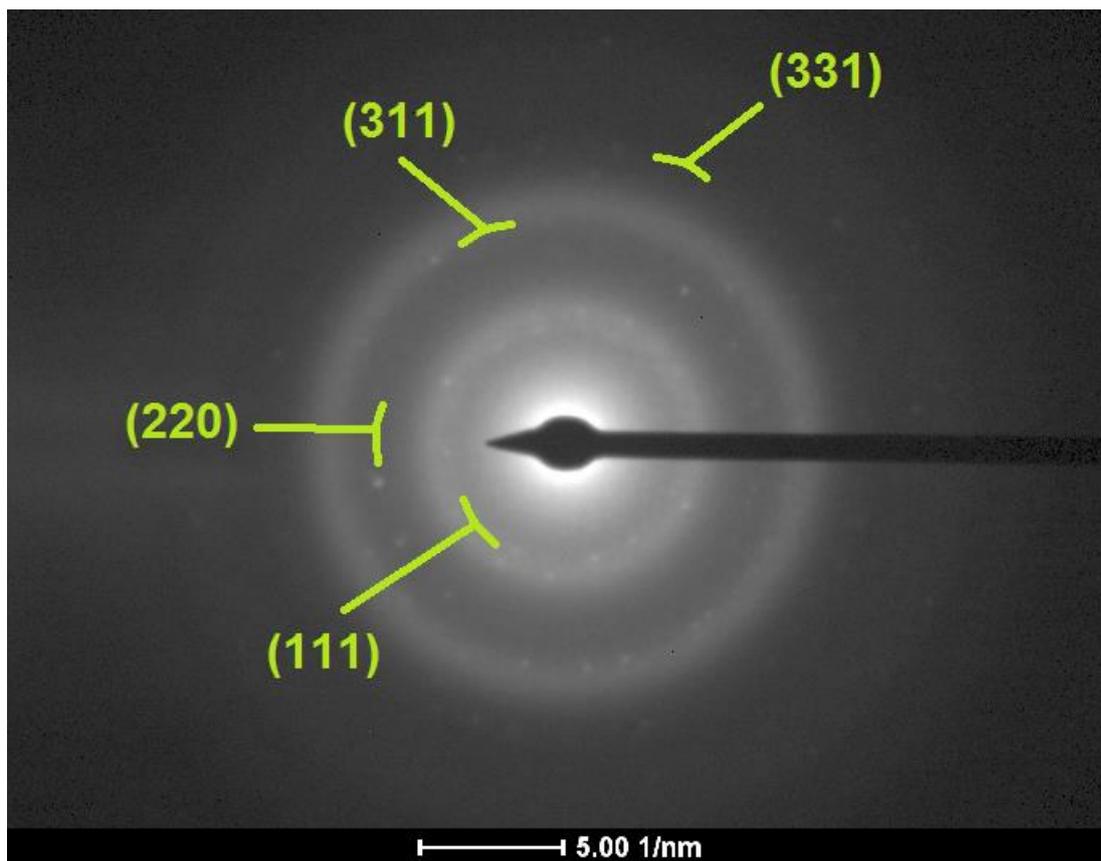


Figura 27 - Imagem obtida por DEAS das AuNPs obtidas pela amostra DNAAu após irradiação por laser com λ de 532 nm por 4 h.

Como nas demais amostras, os anéis formados pelos pontos brilhantes correspondentes aos diferentes cristais da amostra tiveram seus diâmetros aferidos e seus valores convertidos para valores de d_{hkl} . Esses valores d_{hkl} foram comparados mais uma vez com os valores presentes no cartão JCPDS nº 04-0784 e em seguida foram associados aos planos cristalinos correspondentes. Na amostra BSAAu foram identificados 4 planos cristalinos diferentes, que correspondem ao ouro CFC.

A estabilidade foi avaliada à partir da variação do tamanho e do PZ das nanopartículas da amostra BSAAu com o passar do tempo. A amostra foi estocada sob refrigeração em temperatura aproximada de 4°C. Por meio de EDL e PZ os

tamanhos e o potencial zeta foram aferidos em intervalos de tempo diferentes e estão apresentados na Figura 28.

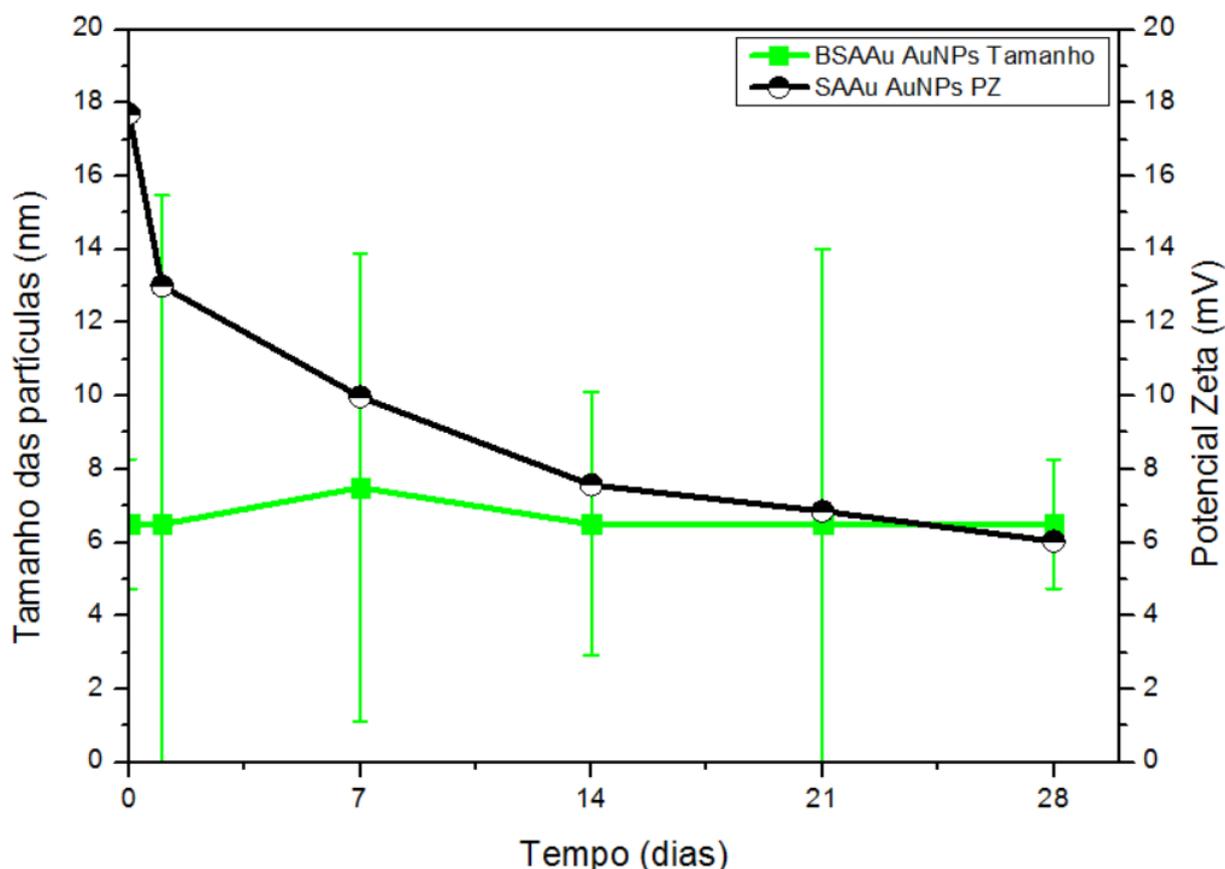


Figura 28 - Variação de tamanho e do PZ das AuNPs produzidas pela amostra BSAAu ao longo do tempo com estocagem no escuro e sob refrigeração à 4°C.

Ao observar a figura anterior, nota-se que a maioria das AuNPs obtidas pela amostra BSAAu apresentaram um tamanho de 6,5 nm e assim se mantiveram até 28 dias depois apesar da aproximação de 0 mV do potencial zeta. Essa estabilidade provavelmente está ligada ao fato da BSA ser um carreador na corrente sanguínea. Talvez essa sua função contribua para o aprisionamento das AuNPs e limite assim seu crescimento (BINAYMOTLAGH et al., 2016). Porém é possível que o pH da amostra também tenha influência neste fato.

5.4. Considerações finais: Comparativo entre amostras TC2, DNAAu e BSAAu

Comparando-se os espectros de absorção das amostras TC2, DNAAu e BSAAu após 4 h de irradiação obtém-se as curvas presentes na Figura 29.

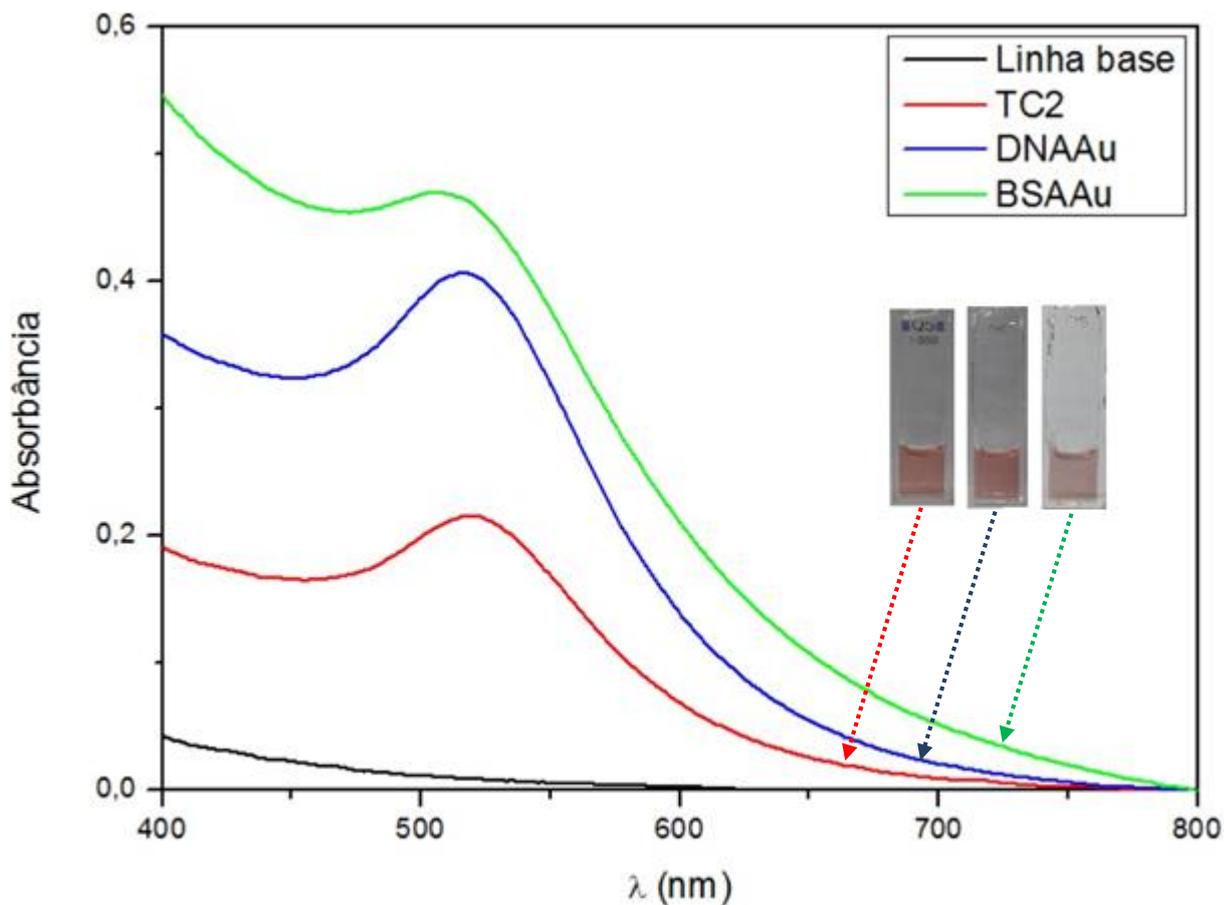


Figura 29 - Espectro de absorção comparativo entre as amostras TC2, DNAAu e BSAAu irradiadas por laser com $\lambda = 532$ nm. Fotos das amostras também estão presentes na imagem.

Aparentemente a presença de DNA em DNAAu e BSA em BSAAu favoreceram o aumento do número de partículas formadas, o que pode ser confirmado pelo aumento da absorbância dessas curvas em comparação com a curva de TC2. Além disso pode-se notar que o pico da curva DNAAu apresenta um leve deslocamento para a esquerda se comparado ao pico da curva TC2. Esse deslocamento também é notado na curva BSAAu se comparado às curvas DNAAu e TC2. Considerando nanopartículas esféricas, um menor tamanho das AuNPs sintetizadas resulta em picos de absorbância em comprimentos de onda menores, segundo Haiss et al. (2007).

Apesar da presença de BSA favorecer a formação de um maior número de partículas, dado seu pico mais alto, esse pico é menos destacado. Binaymotlagh et al. (2016) demonstra em seu trabalho que um aumento na concentração de BSA em solução contendo AuNPs leva a uma diminuição na absorbância máxima da curva no espectro de absorção.

No intuito de comparar os tamanhos das AuNPs sintetizadas pelas amostras TC2, DNAAu e BSAAu, os gráficos de distribuição de tamanho de partículas foram agrupados na Figura 30.

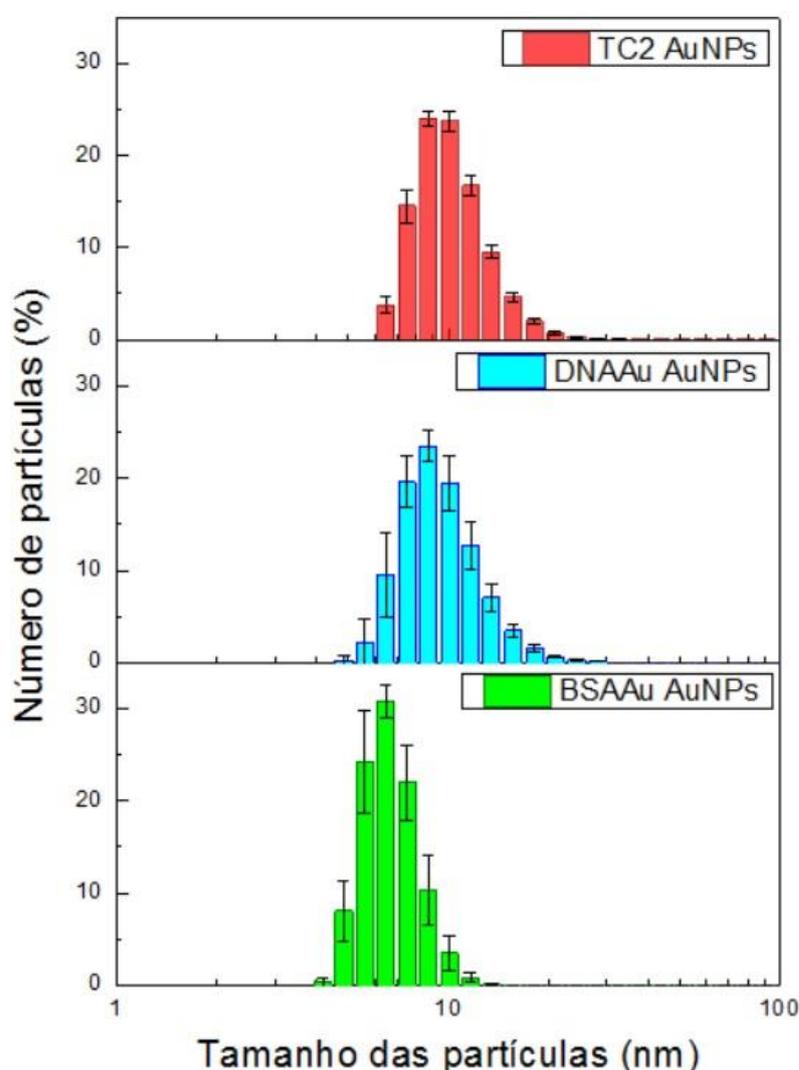


Figura 30 - Distribuição do tamanho das AuNPs sintetizadas utilizando as amostras TC2, DNAAu e BSAAu.

Pode-se notar que BSAAu apresentou um tamanho médio de aproximadamente 6 nm, enquanto DNAAu apresentou tamanho médio por volta de 9 nm e TC2 por volta de 10 nm. Tal fato pode ser explicado pela variação de pH causada

pela inserção dos biopolímeros. TC2 apresentou um pH de 3,5, já DNAAu apresentou um pH de 3,7, valor muito próximo ao de TC2, por isso os tamanhos médios apresentaram valores próximos. Já BSAAu apresentou um pH de 4,3, um valor mais alto, o que resultou em um tamanho médio de partícula mais distante. Segundo Moore Tibbetts et al. (2016) isto já era esperado. O tamanho das AuNPs obtidas diminui enquanto o pH aumenta, até atingir o seu menor tamanho no pH 5,4. Em pHs acima de 5,4 o tamanho das AuNPs volta a aumentar.

As imagens obtidas via MET das amostras TC2, DNAAu e BSAAu foram agrupadas na Figura 31 para comparação.

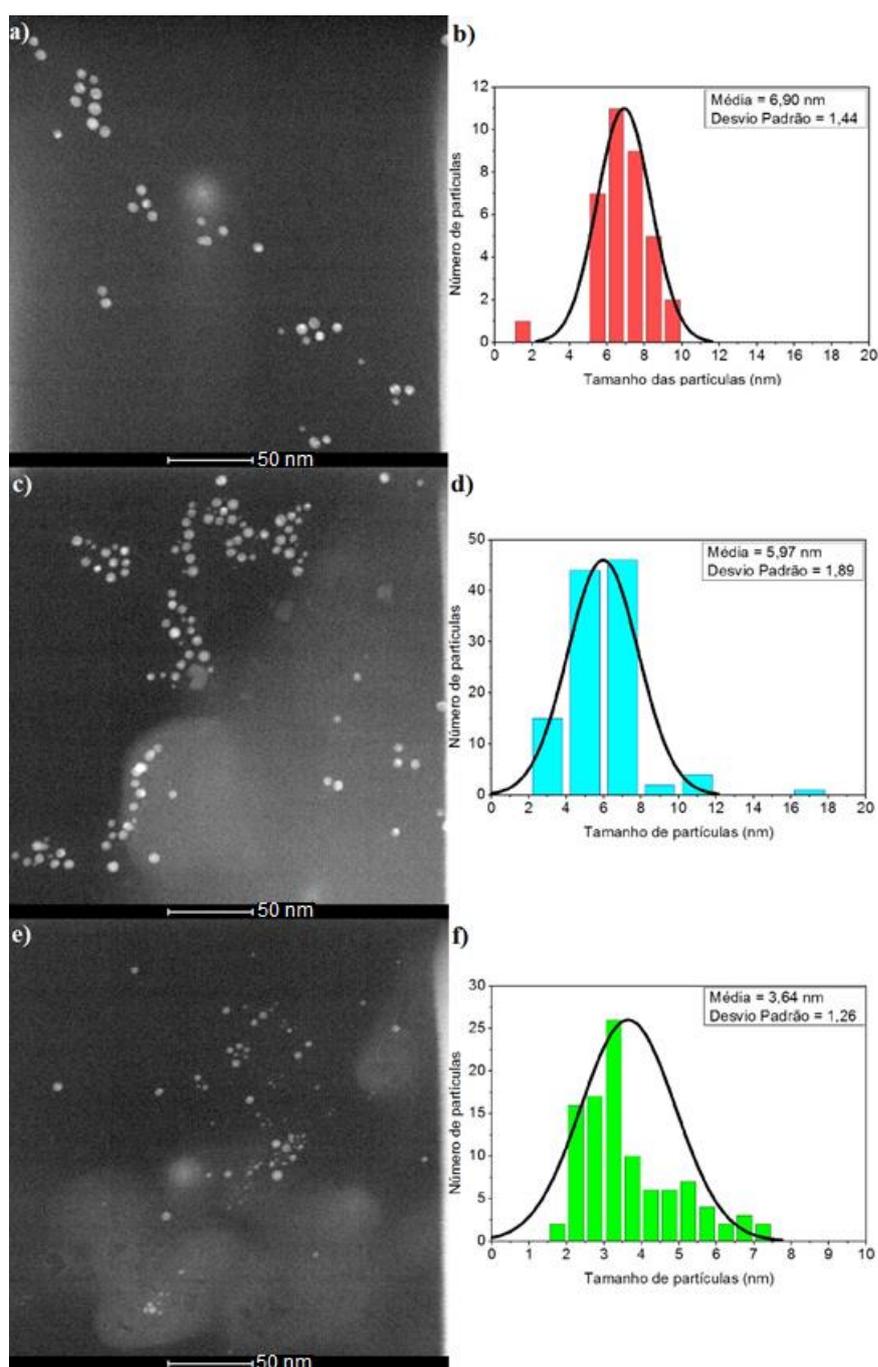


Figura 31 - Imagens obtidas por MET das AuNPs sintetizadas pelas amostras a) TC2, c) DNAAu e e) BSAAu e suas respectivas distribuições de tamanho de partículas b), d) e f). As manchas mais claras em c) e d) são DNA e BSA, respectivamente.

Observa-se em todas as amostras de AuNPs apresentaram morfologia esférica. Portanto, pode-se dizer que a alteração de pH causada pela adição de DNA e BSA não foi significativa para promover alteração na morfologia. Nos experimentos de Moore Tibbetts et al. (2016) utilizando laser Ti:Safira em 790 nm, mesmo com a variação de pH entre 2,5 e 8,4, a morfologia das AuNPs permaneceu esférica.

A distribuição de tamanhos segue o que já foi apresentado via EDL. TC2

apresentou o maior tamanho médio enquanto BSAAu apresentou o menor, o que é evidente pelo alto número de partículas muito pequenas na Figura 31 e). Como já descrito anteriormente, o motivo desse menor tamanho médio das AuNPS na amostra com BSA se dá pelo pH de 4,30, mais próximo de 5,4, valor no qual se obtém o menor tamanho de AuNPs, segundo Moore Tibbetts et al. (2016).

As imagens obtidas por DEAS das amostras DNAAu e BSAAu são apresentadas na Figura 32 juntamente com a imagem de TC2 para comparação.

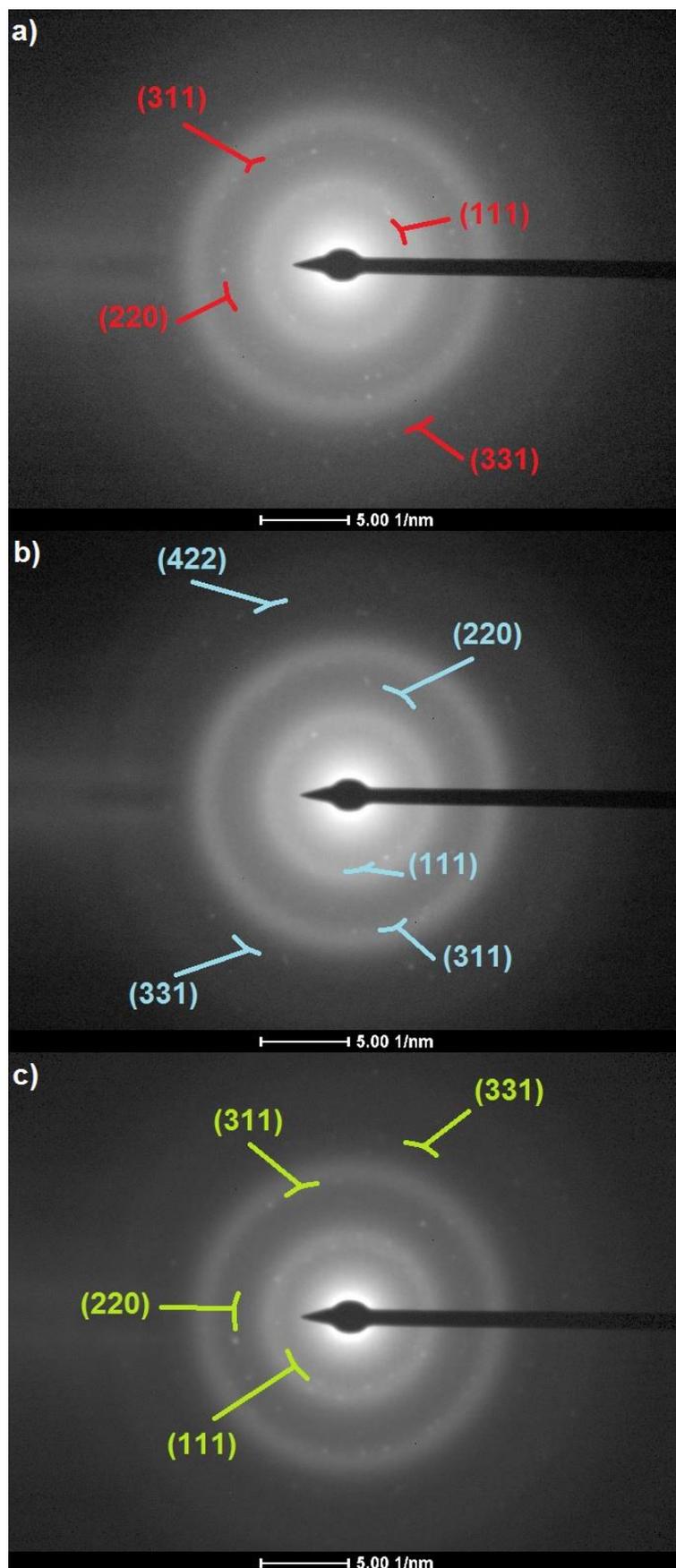


Figura 32 - Imagens obtidas via DEAS correspondente às AuNPs formadas pelas amostras a) TC2, b) DNAAu e c) BSAAu e seus respectivos planos cristalinos.

As imagens de DEAS das amostras DNAAu e BSAAu apresentam um número de pontos brilhantes correspondentes à cristais semelhante ao observado na amostra TC2. Isso pode ocorrer devido a concentração de sal de ouro, que é um parâmetro comum entre as 3 amostras.

Todas as amostras estudadas apresentaram praticamente os mesmos planos cristalinos, com exceção da amostra DNAAu que apresentou um plano a mais, o plano (420). Dada a semelhança entre as imagens de DEAS das amostras provavelmente este plano também está presente em TC2 e BSAAu, porém a região da amostra analisada não favoreceu sua observação. Destaca-se que os planos identificados nas três amostras correspondem aos planos da estrutura cristalina CFC do ouro, a mais estável presente em nanopartículas deste material (SHIM et al., 2003). Portanto pode-se afirmar que a presença destes biopolímeros, bem como a alteração no pH não levou a alterações na estrutura cristalina das AuNPs produzidas.

No intuito de comparar a variação de tamanho das AuNPs e seus PZ com o passar do tempo, construiu-se a Figura 33 para comparar os diferentes sistemas.

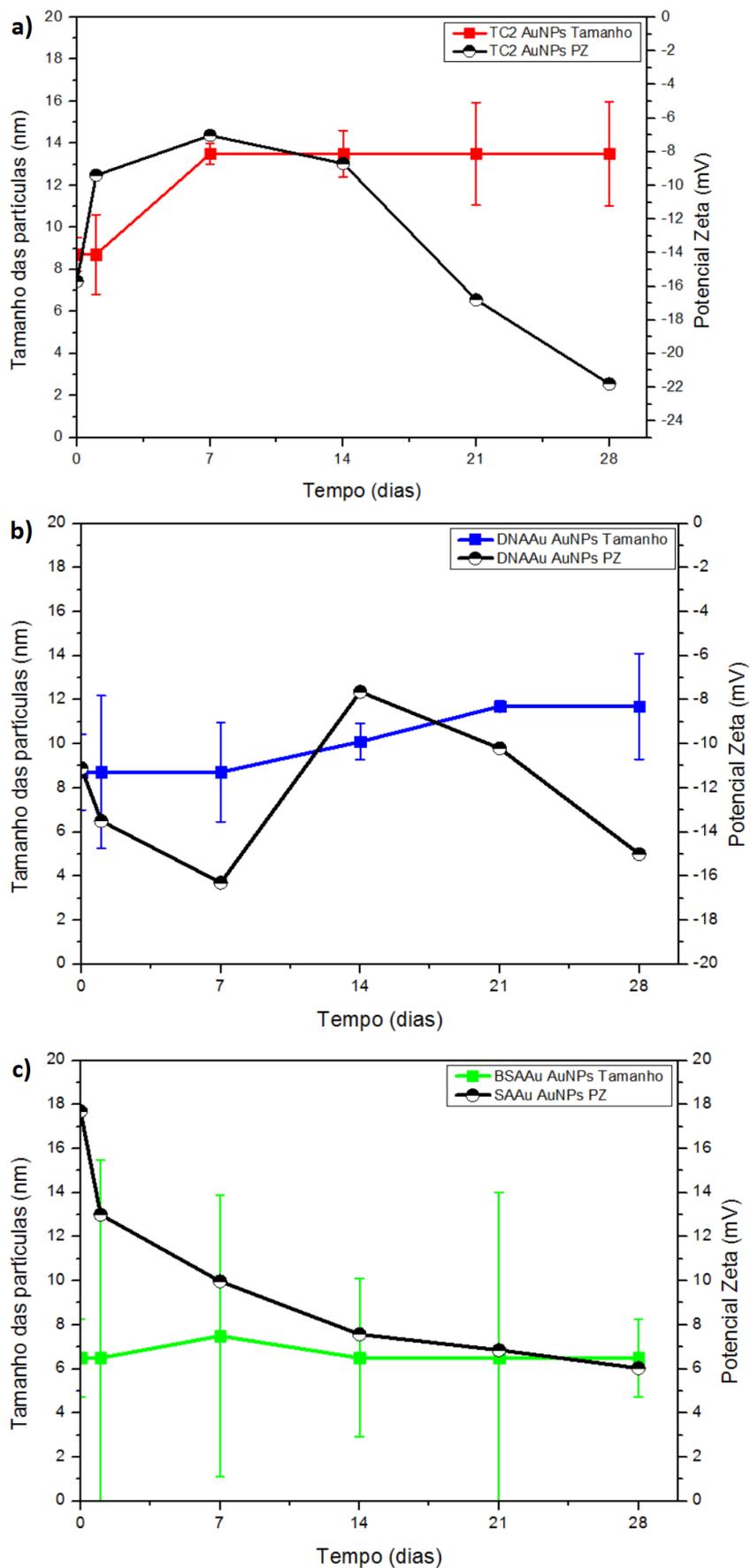


Figura 33 - Comparativo entre as variações de tamanho e PZ das amostras a) TC2, b) DNAAu e c) BSAAu após estocagem por 0, 1, 7, 14, 21 e 28 dias sob refrigeração à 4°C.

As AuNPs oriundas das amostras TC2 apresentaram uma variação de tamanho em menor tempo, ou seja, ela é a amostra menos estável das 3 analisadas. Já a amostra BSAAu aparenta ser a amostra mais estável das 3, uma vez que se manteve com aproximadamente 6 nm por até 28 dias. A presença de DNA e BSA pode ter agido como barreira para esse crescimento das AuNPs, resultando na maior estabilidade para as AuNPs de DNAAu e BSAAu se comparadas a estabilidade das AuNPs de TC2.

Com relação ao potencial zeta, pode-se notar que nas amostras TC2 e DNAAu a variação de PZ acompanhou a variação do tamanho das AuNPs. Somente no caso de BSAAu as AuNPs não apresentaram aumento de seu tamanho mesmo com a aproximação de 0 dos valores de PZ. Como já discutido anteriormente, o provável responsável por essa estabilidade é a presença da BSA e este alterou o pH da solução, o que também pode ter contribuído para esse resultado.

6. CONCLUSÕES

AuNPs de ouro foram sintetizadas por meio de uma rota modificada do que já encontra-se descrito na literatura. A síntese foi baseada na irradiação de uma solução de sal de ouro por meio de um laser com λ em 532 nm (geração do 2º harmônico).

As AuNPs obtidas por esse método apresentaram tamanhos que variaram de 2 à 30 nm, morfologia esférica e estrutura cristalina CFC, a mais estável energeticamente. Com a alteração da concentração inicial de sal de ouro obteve-se variações no tamanho e na de morfologia das AuNPs. Uma menor concentração apresentou menores tamanhos enquanto o inverso ocorreu com uma maior concentração. Na maior concentração também houveram algumas partículas de morfologia diferente da esférica.

Também foi testada a presença de biopolímeros na amostra enquanto houve a irradiação à laser. A presença desses biopolímeros alterou o pH das amostras, o que acarretou em variações de tamanho das partículas. Na ausência de biopolímeros, as amostras apresentaram os maiores tamanhos de AuNPs enquanto as amostras com DNA e BSA apresentaram o segundo menor e o menor tamanho respectivamente. O tamanho médio das AuNPs produzidas em presença de BSA ficou por volta de 3 nm.

A estrutura cristalina das amostras não apresentou mudanças mesmo com a alteração de concentração de sal de ouro ou com a presença de biopolímeros.

O mecanismo de formação desta síntese via irradiação à laser com λ de 532 nm foi proposto segundo o seguinte mecanismo: O laser ao incidir na amostra promove a fotólise dos íons de sal de ouro e da água. A fotólise dos íons de sal de ouro promovem a formação das primeiras AuNPs. A fotólise da água promove a formação de radicais livres, elétrons hidratados e água oxigenada. Esses três produtos da fotólise da água posteriormente auxiliam na redução do ouro presente nos íons de ácido tetracloroáurico.

O sucesso dessa síntese comprova não só a possibilidade de síntese por irradiação à laser com comprimentos de onda da luz visível, como também advoga a favor do método de irradiação à laser com qualquer comprimento de onda. Com isso este trabalho esperar abrir portas não só para o refinamento deste método, mas também para a expansão dele para obtenção de outras nanopartículas metálicas.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A primeira sugestão é relacionada ao refinamento do método apresentado neste trabalho. É necessário um estudo mais refinado para mapear a influência da concentração do sal de ouro inicial no tamanho e morfologia da AuNP final. Outro estudo importante seria um estudo refinado sobre a variação do pH inicial da amostra e a variação de tamanho e morfologia da AuNP final. A estabilidade também merece uma maior atenção. Seria importante determinar a influência da variação de pH na estabilidade das AuNPs de forma a comprovar se o pH ou o BSA são os verdadeiros responsáveis pela maior estabilidade das AuNPs.

Com relação a novos biopolímeros, deve-se testar este método de síntese na presença de biopolímeros úteis para futuras aplicações que apresentem terminações com afinidade com o ouro, para verificar se é possível a síntese e se esses biopolímeros conseguem encapsular ou prender já na síntese as AuNPs.

Por fim, uma última sugestão seria utilizar o método desenvolvido neste trabalho para a síntese de outras nanopartículas metálicas.

REFERÊNCIAS

ANYFANTIS, G. C. et al. Synergistic Action of Alginate Chemical Reduction and Laser Irradiation for the Formation of Au Nanoparticles with Controlled Dimensions. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 32, n. 3, p. 389-397, 2015.

BALASUBRAMANIAN, S. K. et al. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 9023-9030, 2010.

BALOGH, L. et al. Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 4, p. 281-296, 2007.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, n. Supplement C, p. 337-351, 2016.

BINAYMOTLAGH, R. et al. In situ generation of the gold nanoparticles–bovine serum albumin (AuNPs–BSA) bioconjugated system using pulsed-laser ablation (PLA). **Materials Chemistry and Physics**, v. 177, p. 360-370, 2016.

BRUST, M. et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 7, p. 801-802, 1994.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials Science and Engineering SI Version**. 8. John Wiley & Sons, Incorporated, 2011.

CAO, G.; WANG, Y. **Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications**. World Scientific, 2011.

CHASSENIEUX, C. et al. Biopolymers: State of the Art, New Challenges, and Opportunities. In: (Ed.). **Handbook of Biopolymer-**

Based Materials: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p.1-6.

CHENG, Q. et al. Double quantum dots decorated 3D graphene flowers for highly efficient photoelectrocatalytic hydrogen production. **Applied Surface Science**, v. 422, n. Supplement C, p. 528-535, 2017.

CHENG, Y. et al. Highly Efficient Drug Delivery with Gold Nanoparticle Vectors for in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 32, p. 10643-10647, 2008.

CHIN, S. L.; LAGACÉ, S. Generation of H₂, O₂, and H₂O₂ from water by the use of intense femtosecond laser pulses and the possibility of laser sterilization. **Applied Optics**, v. 35, n. 6, p. 907-911, 1996.

COUTO, C.; VITORINO, R.; DANIEL-DA-SILVA, A. L. Gold nanoparticles and bioconjugation: a pathway for proteomic applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 238-250, 2017.

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, n. 1, p. 293-346, 2004.

DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Wiley, 2007.

DONG, S. et al. Photochemical synthesis of gold nanoparticles by the sunlight radiation using a seeding approach. **Gold Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 187-195, 2004.

EGUCHI, M. et al. Simple Reductant Concentration-Dependent Shape Control of Polyhedral Gold Nanoparticles and Their Plasmonic Properties. **Langmuir**, v. 28, n. 24, p. 9021-9026, 2012.

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.

FAN, X.; ZHENG, W.; SINGH, D. J. Light scattering and surface plasmons on small spherical particles. **Light Sci Appl**, v. 3, p. e179, 2014.

FREESTONE, I. et al. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 270-277, 2007.

FRIED, J. R. **Polymer Science and Technology**. Pearson Education, 2014.

GÖKCE, B.; AMENDOLA, V.; BARCIKOWSKI, S. Opportunities and Challenges for Laser Synthesis of Colloids. **ChemPhysChem**, v. 18, n. 9, p. 983-985, 2017.

GOODHEW, P. J.; HUMPHREYS, J.; BEANLAND, R. **Electron Microscopy and Analysis, Third Edition**. Taylor & Francis, 2000.

GRZELCZAK, M. et al. Shape control in gold nanoparticle synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1783-1791, 2008.

HAISS, W. et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.

HAWKINS, J. W.; DUGAICZYK, A. The human serum albumin gene: structure of a unique locus. **Gene**, v. 19, n. 1, p. 55-58, 1982.

HONARVAR, Z.; HADIAN, Z.; MASHAYEKH, M. Nanocomposites in food packaging applications and their risk assessment for health. **Electronic Physician**, v. 8, n. 6, p. 2531-2538, 2016.

HUANG, B. X.; KIM, H.-Y.; DASS, C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, n. 8, p. 1237-1247, 2004.

HURST, S. J.; LYTTON-JEAN, A. K. R.; MIRKIN, C. A. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 24, p. 8313-8318, 2006.

KALISHWARALAL, K. et al. Biological synthesis of gold nanocubes from *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5356-5358, 2009.

KANNATEY-ASIBU, E. Types of Lasers. In: (Ed.). **Principles of Laser Materials Processing**: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p.135-187. ISBN 9780470459300.

KONG, F.-Y. et al. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1445, 2017.

LEE, J.; LEE, M. Laser-Induced Conversion of Au Powders to Highly Stable Nanoparticles with a Narrow Size Distribution. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 24, p. 13256-13262, 2016.

LI, Z. et al. Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 7, p. 1558-1562, 2002.

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. 4212-4217, 1999.

MA, P. C.; TANG, B. Z.; KIM, J.-K. Effect of CNT decoration with silver nanoparticles on electrical conductivity of CNT-polymer composites. **Carbon**, v. 46, n. 11, p. 1497-1505, 2008.

MAJOREK, K. A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, v. 52, n. 3, p. 174-182, 2012.

MAYER, K. M.; HAFNER, J. H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 6, p. 3828-3857, 2011.

MESSERSMITH, R. E.; NUSZ, G. J.; REED, S. M. Using the Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles To Monitor Lipid Membrane Assembly and Protein Binding. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 50, p. 26725-26733, 2013.

MOORE TIBBETTS, K. et al. Elucidating Strong Field Photochemical Reduction Mechanisms of Aqueous $[\text{AuCl}_4]^-$: Kinetics of Multiphoton Photolysis and Radical-Mediated Reduction. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 120, n. 20, p. 3562-3569, 2016.

NEHL, C. L.; LIAO, H.; HAFNER, J. H. Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 683-688, 2006.

NERSISYAN, H. H. et al. Combustion synthesis of zero-, one-, two- and three-dimensional nanostructures: Current trends and future perspectives. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 63, n. Supplement C, p. 79-118, 2017.

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. 10, p. 1957-1962, 2003.

NIST. Hydrogen. 2017a. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1333740&Units=SI&Mask=200#>>. Acesso em: 23 de outubro de 2017.

_____. Oxygen. 2017b. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7782447&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>>. Acesso em: 23 de outubro de 2017.

_____. Chlorine. 2017c. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7782505&Mask=200>>. Acesso em: 23 de outubro de 2017.

OWEN, T. **Fundamentals of UV-visible Spectroscopy: A Primer**. Agilent Technologies, 2000.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: An Introduction**. Springer New York, 2007.

PETSKO, G. A.; RINGE, D. **Protein Structure and Function**. New Science Press, 2004.

PILENI, M.-P. The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals. **Nature Materials**, v. 2, n. 3, p. 145-150, 2003.

PRIYADARSHINI, E.; PRADHAN, N. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, n. Supplement C, p. 888-902, 2017.

PROTEIN DATA BANK. Crystal structure of Bovine Serum Albumin. 2017. Disponível em:
<<https://www.rcsb.org/pdb/ngl/ngl.do?pdbid=3V03&bionumber=1>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

REISS, G.; HÜTTEN, A. Applications beyond data storage. **Nature Materials**, v. 4, p. 725, 2005.

SHIM, J.-H. et al. Molecular dynamics simulation of the crystallization of a liquid gold nanoparticle. **Journal of Crystal Growth**, v. 250, n. 3, p. 558-564, 2003.

SONG, J. et al. DNA templated synthesis of branched gold nanostructures with highly efficient near-infrared photothermal therapeutic effects. **RSC Advances**, v. 6, n. 57, p. 51658-51661, 2016.

TANGEYSH, B. et al. Gold Nanotriangle Formation through Strong-Field Laser Processing of Aqueous KAuCl₄ and Postirradiation Reduction by Hydrogen Peroxide. **Langmuir**, v. 33, n. 1, p. 243-252, 2017.

TETSU, Y.; MIZUKI, S.; TOYOKI, K. Practical Preparation of Size-Controlled Gold Nanoparticles in Water. **Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 619-620, 1997.

THE BRITISH MUSEUM, T. B. The Lycurgus Cup. **Collection online**, 2017. Acesso em: 11 de nov. 2017.

THOMPSON, D. Michael Faraday's recognition of ruby gold: the birth of modern nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 267-269, 2007.

TORRES-MENDIETA, R. et al. Characterization of Tin/Ethylene Glycol Solar Nanofluids Synthesized by Femtosecond Laser Radiation. **ChemPhysChem**, v. 18, n. 9, p. 1055-1060, 2017.

TOWE, K. M. Studying Mineral Particulates of Biogenic Origin by Transmission Electron Microscopy and Electron Diffraction. In: KIRSCHVINK, J. L.; JONES, D. S., *et al* (Ed.). **Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism**. Boston, MA: Springer US, 1985. p.167-181. ISBN 978-1-4613-0313-8.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 0, p. 55-75, 1951.

WAGNER, F. E. et al. Before striking gold in gold-ruby glass. **Nature**, v. 407, p. 691, 2000.

YANG, X. et al. DNA–Gold Nanoparticle Conjugates-Based Nanoplasmonic Probe for Specific Differentiation of Cell Types. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 6, p. 3227-3231, 2014.

ZHANG, J. Z.; NOGUEZ, C. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures. **Plasmonics**, v. 3, n. 4, p. 127-150, 2008.

ZHANG, Y. et al. Intense enhancement of yellow luminescent carbon dots coupled with gold nanoparticles toward white LED. **Dyes and Pigments**, v. 140, p. 122-130, 2017.

ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 3, p. 638-665, 2013.