

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA
NÍVEL MESTRADO**

DUANE DA SILVA MORAES

**SÍNTESE DE SOLUÇÃO COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
PARA APLICAÇÃO EM DISPOSITIVOS DE DETECÇÃO DE BIOMARCADORES**

São Leopoldo

2022

DUANE DA SILVA MORAES

SÍNTESE DE SOLUÇÃO COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
PARA APLICAÇÃO EM DISPOSITIVOS DE DETECÇÃO DE BIOMARCADORES

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
em Engenharia Elétrica, pelo Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da
Universidade do Vale do Rio dos Sinos –
UNISINOS

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Louise Avila de Campos Rocha

São Leopoldo

2022

M828s Moraes, Duane da Silva.

Síntese de solução coloidal de nanopartículas de ouro para aplicação em dispositivos de detecção de biomarcadores / por Duane da Silva Moraes. – 2022.
158 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, São Leopoldo, RS, 2022.

“Orientadora: Dr.^a Tatiana Louise Avila de Campos Rocha”.

1. Nanopartículas de ouro. 2. Citrato de sódio.
3. Borohidreto de sódio. 4. Biossensores.
5. Funcionalização. 6. Polietilenoimina. I. Título.

CDU: 621.3:549.283

*“Na natureza nada se cria, nada se perde,
tudo se transforma.”*

Antoine Lavoisier

AGRADECIMENTOS

As palavras me faltam neste momento, mas os sentimentos por outro lado transbordam. Existiram momentos de mais pura felicidade, de comemorações e de alívio pelo trabalho entregue, mas também houve momentos de tristeza, apreensão e nervosismo, noites sem dormir e finais de semana estudando. Se você esteve ao meu lado em cada um desses momentos, o meu mais sincero Muito Obrigada, foi o apoio de cada um que permitiu com que eu não desistisse e me mantivesse firme até aqui!!!

Devo agradecer imensamente aos meus pais, Celso e Rosângela, pelo apoio incondicional, pelos esforços que fizeram com que eu chegasse até aqui, por prestigiarem as vitórias e me receberem de braços abertos nas derrotas. Vocês são o meu alicerce e é por vocês que estou aqui.

Às minhas avós, Nira e Erça, que estiveram comigo em um momento muito especial apesar das dificuldades que a vida lhes impôs. Muito obrigada por serem exatamente como são!!! Amo muito vocês!!!

Às minhas tias, tios, dinda, dindo, primas, primos e afilhado que me aguentaram nos meus mais extremos de felicidade e irritação, que entenderam a minha ausência e também me tiraram do isolamento pela simples preocupação de me ver bem.

À minha querida orientadora, prof^a Tati, que com uma simples mensagem fez de uma menina sem nenhuma expectativa pós formatura em uma quase mestre. Você vê em mim um potencial que nem eu consigo enxergar, esteve comigo nos períodos mais importantes e, hoje, consigo dizer que ganhei uma grande amiga!!!

Aos professores e professoras que estiveram comigo em todos esses anos de graduação e mestrado, que contribuíram com a minha formação. Em especial, à professora Cristiane, ainda me lembro da minha aula de físico-química e do quão impressionada eu fiquei com a professora organizada que és.

Ao time do itt Chip que me recebeu de braços abertos e me fez sentir parte desse time. Professor Celso, muito obrigada por aceitar esse projeto sem nem mesmo ter me conhecido, pelas aulas, conselhos, correções e conversas no corredor. Aos meus amigos, Tayná, Paola, Luise, Sabrina, Samuel e Rodrigo que estiveram presentes nesse processo e transformaram um cafezinho em um momento de descontração e muita troca de conhecimento. Vocês são incríveis!

À Helena que tive o prazer de conhecer durante esse projeto e se transformou no meu braço direito em tudo! Você tem um potencial enorme e merece todo o sucesso do mundo. Espero poder te visitar na Alemanha nesse ano!

Aos meus “chefes” Priscila e Willyan que confiaram a sua empresa a alguém com muita força de vontade e que sonhava em fazer parte de um grupo como a Biosens. Muito obrigada pela oportunidade, por acreditarem em mim, pelos *feedbacks* que levo no coração e pelo ambiente que vocês construíram. Muito obrigada a todos os meus colegas de trabalho que fazem da Biosens a minha segunda casa!!! Em especial, preciso agradecer imensamente a Júlia, Natasha e Bruna pelas risadas, desabafos, conselhos, cafés e *waffles*. Agradeço a Deus, todos os dias, por terem colocado vocês no meu caminho.

Às minhas amigas incríveis que me alegram a cada mensagem, Adrielly, Natália, Vitória, Ana Letícia, Mayra e Jalir!!! O orgulho que vocês dizem sentir de mim é recíproco. Não consigo me imaginar chegando até aqui sem vocês.

Finalmente, devo agradecer também à banca examinadora, Prof^a Iara, Prof^o Paulo e Prof^o José que ajudaram a elaborar esse trabalho e torná-lo cada vez melhor, e ao Prof^o Fernando Morisso da Universidade Feevale que me recebeu de braços abertos em seu laboratório.

Se você não foi diretamente mencionado nesse texto, me desculpe, mas o marco que você fez na minha vida é inesquecível. Muito obrigada por tudo!!! Existe uma frase que eu gosto muito e que diz: “Amigo não é aquele que diz vá em frente, mas sim aquele que diz vou com você” e vocês vieram comigo até aqui!!!!

Simplesmente, MUITO OBRIGADA!

Com amor, Duane. ❤️

RESUMO

As nanopartículas de ouro (AuNPs) se tornaram fortes candidatas para aplicações em biossensores, uma vez que apresentam elevada condutividade elétrica e atividade catalítica, resistência à corrosão, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, alta estabilidade em fluidos biológicos e fácil funcionalização. Uma das metodologias mais consolidadas na literatura para a síntese de AuNPs consiste na redução química de íons Au^{3+} em ouro metálico através de agentes redutores químicos, sendo que qualquer alteração nos parâmetros da síntese, bem como a inserção de reagentes estabilizantes influencia no formato e tamanho das nanopartículas produzidas. Diante do exposto, esse trabalho tem como objetivo estudar a síntese de nanopartículas de ouro, visando a sua aplicação em biossensores. O processo metodológico foi dividido em três etapas: a primeira etapa consistiu no estudo do agente redutor mais adequado para a síntese de AuNPs, no qual avaliou-se os agentes Citrato de Sódio e Borohidreto de Sódio; na segunda etapa, avaliaram-se outros parâmetros da síntese, como velocidade de agitação, velocidade de adição do agente redutor e relação molar entre os agentes redutor e precursor; na terceira etapa, a solução de AuNPs escolhida como a síntese promissora foi funcionalizada com Polietilenoimina para ativação da sua superfície e possibilitar o acoplamento do bioreceptor. Todas as sínteses realizadas apresentaram a banda característica do ouro metálico entre 500 e 550 nm na análise de UV-visível, confirmando a formação das nanopartículas de ouro. As soluções coloidais sintetizadas com Citrato de Sódio apresentaram coloração mais intensa, além do método experimental ser mais simples e demandar menos tempo de reação, em comparação às AuNPs produzidas com Borohidreto de Sódio. As análises de caracterização das amostras da segunda etapa revelaram que quanto maior a velocidade de agitação do sistema, maior será a velocidade de difusão das espécies químicas em solução e menor será o tamanho das nanopartículas de ouro. Em relação à razão molar entre os reagentes precursor e redutor adicionados à síntese, pode-se concluir que existe uma relação molar ideal e que maiores ou menores concentrações do agente redutor na solução contribui para um aumento no tamanho das AuNPs. Por fim, quanto à velocidade de adição do agente redutor no meio reacional, pode-se inferir que uma adição mais lenta ocasiona a produção de nanopartículas maiores, com variabilidade de tamanhos e aglomerados. Os resultados da terceira etapa do trabalho apresentaram a possibilidade de funcionalizar as nanopartículas de ouro com

Polietilenoimina, que interage com as AuNPs por forças de Van der Waals. A caracterização eletroquímica de eletrodos comerciais modificados com as nanopartículas de ouro funcionalizadas revelou uma redução significativa na resistência à transferência de cargas quando comparado com o dispositivo não modificado, devido à capacidade condutiva das AuNPs, contribuindo para o aumento na sensibilidade dos eletrodos em detectar reações químicas/biológicas. Assim, conclui-se que é possível aplicar a solução de nanopartículas de ouro funcionalizadas produzidas neste trabalho na construção de biossensores e que o próximo passo do estudo deve focar no acoplamento do bioreceptor que dependerá, por sua vez, do biomarcador alvo do diagnóstico.

Palavras-chave: nanopartículas de ouro; citrato de sódio; borohidreto de sódio; biossensores; funcionalização; polietilenoimina.

ABSTRACT

The gold nanoparticles (GNPs) have become strong candidates for applications in biosensors, as they have high electrical conductivity and catalytic activity, corrosion resistance, biocompatibility, low cytotoxicity, high stability in biological fluids and easy functionalization. One of the most consolidated methodologies in the literature for the synthesis of GNPs is the chemical reduction of Au^{3+} ions in metallic gold through chemical reducing agents, and any change in the synthesis parameters, as well as the insertion of stabilizing reagents influence the shape and size of the nanoparticles. Considering the above, the objective of this work is to study the synthesis of gold nanoparticles, aiming its application in biosensors. The methodological process was divided into three stages: the first stage consists of the study of the most suitable reducing agent for the synthesis of GNPs, in which the agents Sodium Citrate and Sodium Borohydride were evaluated; in the second stage, other synthesis parameters were evaluated, such as stirring speed, reduction agent addition speed and molar ratio between the reducing agent and precursor; in the third step, the GNPs solution chosen as the promising synthesis was functionalized with Polyethyleneimine to activate its surface and enable the bioreceptor coupling. All syntheses performed showed the characteristic band of metallic gold between 500 and 550 nm in the UV-visible analysis, confirming the formation of gold nanoparticles. The colloidal solutions synthesized with Sodium Citrate showed more intense coloration, the experimental method is simpler and requires less reaction time, compared to GNPs produced with Sodium Borohydride. The characterization analyzes of the samples from the second stage revealed that the higher the stirring speed of the system, the greater the diffusion speed of the chemical species in solution and the smaller the size of the gold nanoparticles. Regarding the molar ratio between precursor and reducing reagents added to the synthesis, it can be concluded that there is an ideal molar ratio and that higher or lower concentrations of the reducing agent in the solution contribute to an increase in the size of GNPs. Finally, regarding the addition speed of the reducing agent in the reaction medium, it can be inferred that a slower addition causes the production of larger nanoparticles, with variability of sizes and agglomerates. The results of the third stage of the work presented the possibility of functionalizing the gold nanoparticles with Polyethyleneimine, which interacts with GNPs by Van der Waals forces. The electrochemical characterization of commercial electrodes modified with functionalized

gold nanoparticles revealed a significant reduction in charge transfer resistance when compared to the unmodified device, due to the conductive capacity of GNPs, contributing to the increased sensitivity of the electrodes in detecting chemical/biological reactions. Thus, it is concluded that it is possible to apply the solution of functionalized gold nanoparticles produced in this work in the construction of biosensors and that the next step of the study should focus on the bioreceptor coupling, which will depend, in turn, on the target biomarker for the diagnosis.

Key-words: gold nanoparticles; sodium citrate; sodium borohydride; biosensors; functionalization; polyethyleneimine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taça de Lycurgus.....	28
Figura 2 - Classificação de um sistema de nanopartículas	30
Figura 3 – Propriedades das nanopartículas de ouro e ilustração esquemática do sistema de detecção baseado em AuNPs.....	32
Figura 4 – Ressonância de plasmon de superfície em uma nanopartícula, devido à interação entre os elétrons da banda de valência do material e a luz.....	33
Figura 5 – Mudança na coloração de uma suspensão de nanopartículas de ouro em água devido ao processo de agregação, na presença de 4-mercaptopiridina	34
Figura 6 – Reações envolvidas na síntese de AuNPs usando citrato com agente redutor.....	35
Figura 7 – AuNPs sintetizadas com citrato de sódio/goma arábica e com aquecimento/radiação	36
Figura 8 – Quimiosorção de alcanotóis em nanopartículas de ouro na presença e ausência de surfactante	37
Figura 9 – Funcionalização de nanopartículas de ouro em duas etapas	38
Figura 10 – Registro fotográfico da obtenção de AuNPs a partir de ouro metálico ...	40
Figura 11 – Sistema para síntese do Ácido Cloroáurico em solução aquosa	41
Figura 12 – Representação esquemática da monocamada auto-organizável de polietilenoglicol sobre a superfície da nanopartícula de ouro.....	43
Figura 13 – Funcionalização de nanopartículas de ouro com Cumarina-Polietilenoglicol-tiol.....	44
Figura 14 – Ilustração esquemática do complexo formado com AuNP funcionalizada com grupos amina e o conjugado PEG-siRNA.....	45
Figura 15 – Representação esquemática da formação de nanopartículas de ouro a partir da redução química com Ácido Glutâmico e a sua conjugação com proteína .	46
Figura 16 – Formação de complexo AuNP-DNA.....	47
Figura 17 – Representação esquemática de um biossensor.....	50
Figura 18 – Biossensor eletroquímico para detecção de micro RNA com amplificação de sinal através de AuNPs funcionalizadas com DNA	51
Figura 19 – Estratégia para detecção de miRNA através de um biossensor SPR com amplificação de sinal	51

Figura 20 – Biossensor de Fluxo Lateral usando reações de hibridização DNA/miRNA/DNA-AuNPs.....	51
Figura 21 – Biossensor para detecção do vírus HCV utilizando AuNPs	54
Figura 22 – Representação esquemática do biossensor colorimétrico para detecção de glicose	55
Figura 23 – Tomografia computadorizada de amostras contendo AuNPs conjugadas com 2-desoxi-D-glicose	58
Figura 24 – Espectros de UV-visível da redução do corante azul de metileno pelo Borohidreto de sódio na ausência (a) e na presença (b) de AuNPs.....	60
Figura 25 – Degradação de compostos nitroaromáticos pelo Borohidreto de sódio e catalisada por AuNPs: (a) 1,4-DNB; (b) 2-NP; (c) 3-NP; (d) 4-NP.....	61
Figura 26 – Fluxograma das etapas experimentais realizadas	64
Figura 27 – Representação esquemática da síntese de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar.....	67
Figura 28 – Representação esquemática da síntese de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar.....	69
Figura 29 – Representação esquemática da síntese de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal	71
Figura 30 – Solução mãe de Ácido Cloroáurico (3 mg/mL).....	72
Figura 31 – Bomba de seringa utilizada para adição controlada do agente redutor nas sínteses 14 e 15	72
Figura 32 – Representação esquemática da reciclagem do ouro	76
Figura 33 – Fluxograma do processo de funcionalização das AuNPs	78
Figura 34 – Componentes de um espectrofotômetro de UV-vis.....	79
Figura 35 – Espectrofotômetros de UV-vis.....	80
Figura 36 – Espectrômetro de FTIR: (a) estrutura base e (b) equipamento.....	81
Figura 37 – Equipamento NanoBrook 90Plus PALS para análise de Espalhamento de Luz Dinâmico.....	82
Figura 38 – Microscópio Eletrônico de Transmissão e componentes básicos	84
Figura 39 – Circuito elétrico equivalente	86
Figura 40 – Nyquist plot	86
Figura 41 – Registro da análise de EIS e dimensões do eletrodo.....	87
Figura 42 – Registro da síntese de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar	89

Figura 43 – Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar.....	90
Figura 44 – Espectros de ATR-FTIR das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar.....	93
Figura 45 – Registro da síntese de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar.....	93
Figura 46 – Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar.....	94
Figura 47 – Espectros ATR-FTIR das sínteses de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar.....	96
Figura 48 - Registro das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal	99
Figura 49 – Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal	100
Figura 50 – Espectros de UV-visível da Síntese 09 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	104
Figura 51 – Espectros de UV-visível da Síntese 10 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	104
Figura 52 – Espectros de UV-visível da Síntese 11 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	105
Figura 53 – Espectros de UV-visível da Síntese 12 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	105
Figura 54 – Espectros de UV-visível da Síntese 13 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	106
Figura 55 – Espectros de UV-visível da Síntese 14 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	106
Figura 56 – Espectros de UV-visível da Síntese 15 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	107
Figura 57 – Espectros de ATR-FTIR das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal	108
Figura 58 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 09.....	111
Figura 59 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 10.....	111
Figura 60 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 11.....	112
Figura 61 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 12.....	112

Figura 62 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 13.....	113
Figura 63 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 14.....	113
Figura 64 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 15.....	114
Figura 65 – Registro do filme formado após secagem em estufa a 70 °C sob vácuo da Síntese 15 durante 3 horas (a) e 6 horas (b), e da solução de Citrato de Sódio (c)	116
Figura 66 – Registro da síntese de AuNPs pelo método de reciclagem de ouro (amostra de ouro do itt Chip).....	118
Figura 67 – Registro da síntese de AuNPs pelo método de reciclagem de ouro (amostra de ouro da Feevale)	119
Figura 68 - Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro do itt Chip).....	121
Figura 69 - Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro da Feevale)	122
Figura 70 – Espectros de UV-visível da Síntese 17 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	125
Figura 71 – Espectros de UV-visível da Síntese 18 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	125
Figura 72 – Espectros de UV-visível da Síntese 19 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	126
Figura 73 – Espectros de UV-visível da Síntese 20 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	126
Figura 74 – Espectros de UV-visível da Síntese 23 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	127
Figura 75 – Espectros de UV-visível da Síntese 24 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	127
Figura 76 – Espectros de UV-visível da Síntese 25 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente	128
Figura 77 – Análise visual da estabilidade das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro do itt Chip)	129
Figura 78 – Análise visual da estabilidade das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro da Feevale).....	130
Figura 79 – Espectros de ATR-FTIR das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro do itt Chip)	131

Figura 80 – Espectros de ATR-FTIR das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro da Feevale).....	132
Figura 81 – Funcionalização das AuNPs com PEI	133
Figura 82 – Espectros de UV-visível da funcionalização das nanopartículas de ouro	134
Figura 83 – Nyquist plot da análise de EIS	136
Figura 84 – Compilado com os <i>fittings</i> das curvas	138

LISTA DE QUADROS

Quadro 1a – Comparativo entre os agentes redutores Citrato de Sódio e Borohidreto de Sódio para a síntese de nanopartículas de ouro	96
Quadro 1b – Continuação...Comparativo entre os agentes redutores Citrato de Sódio e Borohidreto de Sódio para a síntese de nanopartículas de ouro.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades do ouro metálico.....	29
Tabela 2 – Formulação das sínteses preliminares via Citrato de Sódio.....	67
Tabela 3 – Formulação das sínteses preliminares via Borohidreto de Sódio.....	69
Tabela 4 – Formulação das sínteses principais via Citrato de Sódio.....	73
Tabela 5 – Formulação das sínteses de reciclagem do ouro.....	76
Tabela 6 – Comprimento de onda da banda de ressonância plasmônica das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar.....	91
Tabela 7 – Comprimento de onda da banda de ressonância plasmônica das sínteses de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar.....	95
Tabela 8 – Comprimento de onda da banda de ressonância plasmônica das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal.....	101
Tabela 9 – Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal.....	109
Tabela 10 – Teste de concentração das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal.....	115
Tabela 11 - Comprimento de onda da banda de ressonância plasmônica das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro.....	123

LISTA DE SIGLAS

ATR	Reflexão Total Atenuada
AuNP	Nanopartículas de ouro
CT	Tomografia Computadorizada
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSN	Nuclease Específica para Duplex
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
HCV	Hepatite tipo C
GNP	<i>Gold Nanoparticle</i>
MB	Azul de metileno
MBC	Mínima Concentração Bactericida
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MIC	Mínima Concentração Inibitória
OCP	Potencial de Circuito Aberto (<i>Open Circuit Potential</i>)
OCT	Tomografia de Coerência Óptica
PAH	Polialilamina
PDI	Índice de Polidispersão
PEG	Poli(etileno)glicol
PEI	Poli(etileno)imina
PIB	Produto Interno Bruto
PVA	Álcool Polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido Ribonucleico
SAM	Monocamadas Auto-organizadas (<i>Self-Assembled Monolayer</i>)
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNISINOS	Universidade do Vale do Rio dos Sinos
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.2 OBJETIVOS	24
1.2.1 Objetivo Geral	24
1.2.2 Objetivos Específicos	24
1.3 JUSTIFICATIVA	25
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
2.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO	28
2.1.1 Propriedades das Nanopartículas de Ouro	31
2.1.2 Síntese Química das Nanopartículas de Ouro	34
2.1.3 Funcionalização das Nanopartículas de Ouro	42
2.1.4 Aplicações das Nanopartículas de Ouro	48
2.1.4.1 Biossensores	48
2.1.4.2 Terapêutica	56
2.1.4.3 Imagem	57
2.1.4.4. Atividade anti-bacteriana	59
2.1.4.5. Catálise	60
3 METODOLOGIA	63
3.1 REAGENTES	65
3.2 EQUIPAMENTOS	65
3.3 ESTUDO PRELIMINAR.....	66
3.3.1 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio	66
3.3.2 Síntese de AuNPs via redução química com Borohidreto de Sódio	68
3.4 ESTUDO PRINCIPAL.....	70
3.4.1 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico comercial	70
3.4.2 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico produzido a partir de ouro metálico	73
3.5 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	77
3.6 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO	78
3.6.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis)	78
3.6.2 Análise de estabilidade	80
3.6.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ...	80

3.6.4 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e índice de polidispersão (PDI)	82
3.6.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	83
3.6.6 Teste de concentração.....	84
3.6.7 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	85
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4.1 ESTUDO PRELIMINAR.....	88
4.1.1 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio	88
4.1.1.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis).....	90
4.1.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)	92
4.1.2 Síntese de AuNPs via redução química com Borohidreto de Sódio.....	93
4.1.2.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis).....	94
4.1.2.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)	95
4.1.3 Discussão dos resultados	96
4.2 ESTUDO PRINCIPAL.....	98
4.2.1 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico comercial	98
4.2.1.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis).....	100
4.2.1.2 Análise de estabilidade.....	103
4.2.1.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)	108
4.2.1.4 Espelhamento de Luz Dinâmico (DLS) e índice de polidispersão (PDI).....	109
4.2.1.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	110
4.2.1.6 Teste de concentração	115
4.2.2 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico produzido a partir de ouro metálico	117
4.2.2.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis).....	120
4.2.2.2 Análise de estabilidade.....	124
4.2.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)	131
4.2.3 Discussão dos resultados	132
4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	133
4.3.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis).....	134

4.3.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	135
4.3.3 Discussão dos resultados	138
5 CONCLUSÃO	140
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	143
REFERÊNCIAS.....	144

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem sendo considerada como uma das tecnologias mais relevantes do Século XXI, devido ao seu potencial econômico em criar novos produtos ou otimizar aqueles já existentes, e às suas contribuições para a redução do estresse ecológico e do consumo de recursos naturais (BHAGYARAJ & OLUWAFEMI, 2018).

Os nanomateriais são assim classificados se pelo menos uma de suas dimensões estiver entre 1 e 100 nm, e apresentam propriedades químicas e físicas únicas, em relação à forma, tamanho, distribuição, cristalinidade, estado de aglomeração e morfologia (BALASOORIYA *et al.* 2017, OMRNA, 2020). Uma das principais características dos nanomateriais é a sua elevada área superficial em relação ao volume, devido à redução das suas dimensões espaciais e, portanto, tornam-se aptos a serem utilizados em vários segmentos, incluindo as indústrias de cosméticos, química e alimentos; na fabricação de componentes eletrônicos; na síntese de nanocompósitos poliméricos e de pigmentos; na área da saúde, com o projeto de dispositivos para a detecção de doenças, mecanismos alternativos para a entrega de drogas e transferência gênica; entre outros (BALASOORIYA *et al.*, 2017; COUTINHO & SOMOZA, 2019; DA SILVA, 2016).

Em especial para aplicações biomédicas, um dos nanomateriais mais explorados são as nanopartículas metálicas, como, por exemplo, as nanopartículas de ouro, porque elas apresentam alta relação área superficial por volume, alta energia de superfície, propriedades de emissão e absorção ajustáveis, biocompatibilidade e propriedades mecânicas, magnéticas, ópticas, elétricas e catalíticas aprimoradas (DAS *et al.*, 2013; OMRAN, 2020; SU *et al.*, 2017). A produção de nanopartículas pode ser conduzida através de duas abordagens: *top-down* e *bottom-up*. Na abordagem *top-down*, parte-se de grandes estruturas (como, por exemplo, uma placa metálica), quebrando-a em infinitas partes até se obter estruturas nanométricas. A técnica *bottom-up*, por sua vez, envolve a obtenção de nanomateriais a partir de átomos, moléculas, monômeros, etc, que se encaixam formando a nanoestrutura desejada. A produção de nanopartículas pela técnica *bottom-up* é mais vantajosa do que pela abordagem *top-down*, ao possibilitar a produção de nanopartículas com formato e tamanho mais homogêneos e altamente controlados (BALASOORIYA *et al.*, 2017; OMRAN, 2020).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) se tornaram fortes candidatas para aplicações em dispositivos utilizados na detecção de doenças virais e bacterianas, devido a sua biocompatibilidade intrínseca, baixa citotoxicidade, alta estabilidade em fluidos biológicos e fácil funcionalização com as espécies biológicas de interesse (GILJOHANN *et al.*, 2010; HEUER-JUNGEMANN *et al.*, 2013). Uma das metodologias mais estudadas e consolidadas na literatura para a síntese de nanopartículas de ouro consiste na técnica *bottom-up* de redução química de íons Au^{3+} , presentes em precursores como o Ácido Cloroáurico, em ouro metálico, através de agentes redutores como o Citrato de Sódio (TURKEVICH *et al.*, 1951) e o Borohidreto de Sódio (BRUST *et al.*, 1994). As nanopartículas de ouro sintetizadas quimicamente se encontram dispersas em um meio líquido, produzindo uma solução coloidal que pode se apresentar com diferentes colorações, dependendo do tamanho dessas nanopartículas. A alteração nos parâmetros da síntese, bem como a inserção de reagentes estabilizantes influencia no formato e tamanho das nanopartículas produzidas, interferindo, conseqüentemente, na aplicação a que essas nanopartículas serão submetidas.

Um biossensor consiste em um dispositivo formado por um bioreceptor e um transdutor. O primeiro é responsável por reconhecer o analito a ser detectado na amostra biológica do paciente, enquanto o segundo converte o reconhecimento do analito em um sinal mensurável, como, por exemplo, um sinal elétrico. Exemplos de bioreceptores incluem sequências de DNA ou RNA, enzimas, anticorpos, antígenos, além de elementos de reconhecimento sintéticos, enquanto os transdutores podem ser eletroquímicos, piezoelétricos, ópticos e térmicos (SHIRZADFAR & KHANAHMADI, 2018; VIDOTTI *et al.*, 2011).

Um biossensor para aplicação na detecção precoce e no prognóstico de cepas virais pandêmicas deve apresentar onze atributos muito importantes, são eles: 1-alta seletividade, 2-alta sensibilidade, 3-tempo de resposta curto, 4-possibilitar análises multiplex (detecção de mais de um biomarcador), 5-diferentes modos de detecção em um único dispositivo, 6-ser descartável, 7-durabilidade, 8-fácil de usar, 9-acessibilidade (custo-benefício), 10-possibilidade de ser produzido em larga escala, e 11-autônomo e conectado com os sistemas centrais de saúde (BHALLA *et al.*, 2020). Dentre as características citadas, a alta sensibilidade é um dos primeiros atributos avaliados no projeto de um novo biossensor, porque, geralmente, projeta-se o dispositivo com capacidade para volumes muito pequenos de amostra biológica,

exigindo, assim, uma resposta sensível para a detecção dos biomarcadores em pequenas concentrações.

A sensibilidade de um biossensor é determinada pela fixação do analito na superfície do sensor e a inclusão de nanopartículas metálicas para a fixação dos bioreceptores no biossensor representa uma alternativa para aumentar a sensibilidade desses dispositivos (BHALLA *et al.*, 2020; NUNNA *et al.*, 2019; RASHEED & SANDHYARANI, 2015). Segundo Vidotti *et al.* (2011), a aplicação de nanopartículas de ouro em biossensores beneficia o desempenho do dispositivo, uma vez que aumentam a transferência de elétrons em biossensores eletroquímicos, mudam seu estado disperso para agregado alterando a sua banda de ressonância plasmônica característica em dispositivos ópticos, e intensificam a massa em transdutores piezoelétricos.

Diante do exposto, o presente trabalho consistiu na síntese de uma solução coloidal contendo nanopartículas de ouro, visando a sua aplicação em dispositivos de detecção de biomarcadores, os biossensores. Dessa forma, realizou-se um estudo sobre as metodologias de síntese de nanopartículas de ouro e a sua respectiva caracterização, bem como avaliou-se o processo de funcionalização das nanopartículas para a ligação com o bioreceptor.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho consiste em sintetizar uma solução coloidal de nanopartículas de ouro, visando a sua aplicação em dispositivos eletroquímicos para detecção de biomarcadores.

1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho englobam:

- a) Estudar o processo de síntese de nanopartículas de ouro (solução coloidal de nanopartículas de ouro);

- b) Avaliar as melhores condições de síntese de nanopartículas de ouro, variando os parâmetros da reação;
- c) Estudar o processo de síntese de nanopartículas de ouro utilizando ouro metálico como precursor (reciclagem do ouro);
- d) Caracterizar a solução coloidal de nanopartículas de ouro quanto às suas propriedades físico-químicas e morfológicas;
- e) Estudar o processo de funcionalização das nanopartículas de ouro em solução; e
- f) Avaliar a possibilidade de aplicação das nanopartículas de ouro na construção de biossensores.

1.3 JUSTIFICATIVA

Dentre todos os nanomateriais existentes, as nanopartículas metálicas são as mais exploradas para aplicações destinadas à área da saúde, sendo que as características físico-químicas das nanopartículas de ouro em particular as tornam mais desejáveis nessas aplicações, em detrimento de outras nanopartículas metálicas nobres.

Além disso, dependendo do formato e tamanho das nanopartículas de ouro, quando em solução, estas se apresentam em diferentes colorações, como vermelho, rosa, roxo, laranja e azul. Esta propriedade, conhecida como Ressonância Plasmônica de Superfície (que será abordada com mais detalhes ao longo do trabalho) possibilita a utilização dessas nanopartículas em aplicações ópticas, como, por exemplo, na construção de biossensores colorimétricos. Um exemplo de biossensor colorimétrico, que atualmente ficou conhecido no mundo inteiro, são os testes rápidos, cujas faixas avermelhadas que apresentam como resultado, nada mais são do que nanopartículas de ouro acumuladas naquela região e funcionalizadas com os anticorpos da doença (JAPOLLA *et al.*, 2015).

A detecção precoce de agentes virais, como o SARS-CoV-2, no organismo humano é de suma importância para um tratamento antecipado do paciente, além de prevenir a contaminação de outras pessoas. Os testes rápidos, assim como os biossensores no geral, são uma alternativa para esses casos, porque apresentam uma boa relação custo-benefício, flexibilidade e rapidez. Entretanto, a fabricação desses dispositivos nacionalmente ainda é pouco explorada, como o evidenciado com

o surgimento da pandemia de COVID-19 no final de 2019, no qual o país iniciou tardiamente os testes das primeiras suspeitas de infecção, uma vez que necessitava importar os testes rápidos de outros países.

Um dos principais motivos pela não fabricação de testes rápidos para a detecção do novo Coronavírus nacionalmente é a produção da solução coloidal de nanopartículas de ouro que é depositada sobre o substrato do sensor e, em seguida, é funcionalizada com os anticorpos da doença. A alternativa encontrada por muitos pesquisadores é adquirir ouro coloidal de outros fabricantes para a aplicação direta no dispositivo. Esse cenário é muito comum nos artigos publicados na literatura que possuem como tema, a construção de biossensores. Assim, o estudo da síntese de nanopartículas de ouro auxilia no desenvolvimento de propriedade intelectual nacional que, por sua vez, contribui para o desenvolvimento do setor industrial de tecnologias para a saúde, a geração de empregos e a formação de mão-de-obra qualificada. Além disso, influencia na redução do custo final do dispositivo, uma vez que menos insumos são importados.

Atualmente, existem aproximadamente onze empresas que comercializam solução coloidal de nanopartículas de ouro, concentradas nos Estados Unidos, Alemanha, Irlanda, Reino Unido e Holanda. Apenas uma empresa das onze catalogadas é brasileira, com sede no Estado de Santa Catarina. Tendo em vista a ampla gama de aplicações a que essas nanopartículas podem ser e vem sendo utilizadas, o Brasil ainda apresenta falta de mais produtores desse insumo no país, que consigam compreender todas as pesquisas em desenvolvimento. Esse fato é uma consequência da falta de incentivo governamental à produção de insumos em nosso país. Segundo o relatório divulgado pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, em 2017, os gastos com ações e serviços públicos de saúde (ASPS) representaram apenas 4,05% do PIB (Produto Interno Bruto) total do país (VIEIRA *et al.*, 2019). Dados do Siscomex (Sistema Integrado de Comércio Exterior) revelaram que a balança comercial farmacêutica do Brasil continua deficitária e dependente da importação de insumos e medicamentos de empresas estrangeiras, atingindo o seu pico entre 2018 e 2019 com um déficit de cerca de R\$ 36 bilhões (DA SILVA, 2020).

Tendo em vista o exposto, este projeto objetiva a síntese da solução coloidal de nanopartículas de ouro, visando a sua aplicação em dispositivos para detecção de doenças (os biossensores), e conseqüentemente, promover a redução da

dependência por empresas estrangeiras para a construção desse tipo de sensor no país.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesse capítulo, são abordados os temas estudados no presente trabalho, cujos conceitos são importantes para o entendimento completo da pesquisa desenvolvida.

2.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO

O ouro (símbolo atômico – Au, derivado da palavra em latim, *Aurum*), elemento de número atômico 79 da tabela periódica, trata-se de um metal nobre com coloração dourada (amarela brilhante), resistente à corrosão, dúctil e maleável, que dissolve-se apenas em água-régia ou em soluções de sais de cianeto. É encontrado na natureza como um único isótopo (átomos de um mesmo elemento químico que possuem o mesmo número atômico, mas diferentes números de massa) estável. As aplicações deste metal na fabricação de objetos datam de 4.600 a 4.200 a.C., encontrado em sepulcros na Bulgária (DA SILVA, 2016; KRAMER & GAGOSZ, 2014). O “elixir de ouro” (ou “elixir da longa vida”), por exemplo, descoberto por alquimistas egípcios em aproximadamente 4.000 a.C., utilizado como uma bebida estimulante da mente e restauradora da juventude, era na verdade constituído por partículas de ouro (com tamanho médio na ordem de 1 – 100 nm) em suspensão líquida. Registros atestam que em 3.600 a.C., os egípcios descobriram uma tecnologia para separar o ouro de minérios por aquecimento. A famosa Taça de Lycurgus, apresentada na Figura 1, originária do século IV d.C., é constituída por nanopartículas de ouro e prata, e exibe colorações verde e vermelha dependendo de como a luz interage com a superfície, respectivamente, se a mesma é refletida ou transmitida (ALVES, 2004).

Figura 1 – Taça de Lycurgus



Fonte: The British Museum [2021?].

Desde os tempos passados até hoje, o interesse pelo ouro ainda é muito pronunciado, devido ao elevado valor agregado que possui, às características físico-químicas mencionadas que o torna interessante para diversas aplicações, além da sua relativa escassez (KRAMER & GAGOSZ, 2014). A Tabela 1 apresenta as principais propriedades físico-químicas, mecânicas, elétricas e térmicas do ouro.

Tabela 1 – Propriedades do ouro metálico

Propriedades gerais	
<i>Densidade</i>	1.930 – 1.940 kg/m ³
Propriedades mecânicas	
<i>Módulo de Young</i>	76 – 81 GPa
<i>Resistência à tração</i>	180 – 220 MPa
<i>Alongamento</i>	2 – 6%
<i>Dureza</i>	50 – 70 HV
<i>Limite de resistência à fadiga</i> ¹	70 – 110 MPa
Propriedades térmicas	
<i>Temperatura de fusão</i>	1.060 – 1.070 °C
<i>Condutividade térmica</i>	305 – 319 W/m.°C
<i>Capacidade calorífica específica</i>	125 – 135 J/kg.°C
<i>Coefficiente de expansão térmica</i>	13,5 – 14,5 µ/°C
Propriedades elétricas	
<i>Resistividade elétrica</i>	2 – 3 µΩ.cm

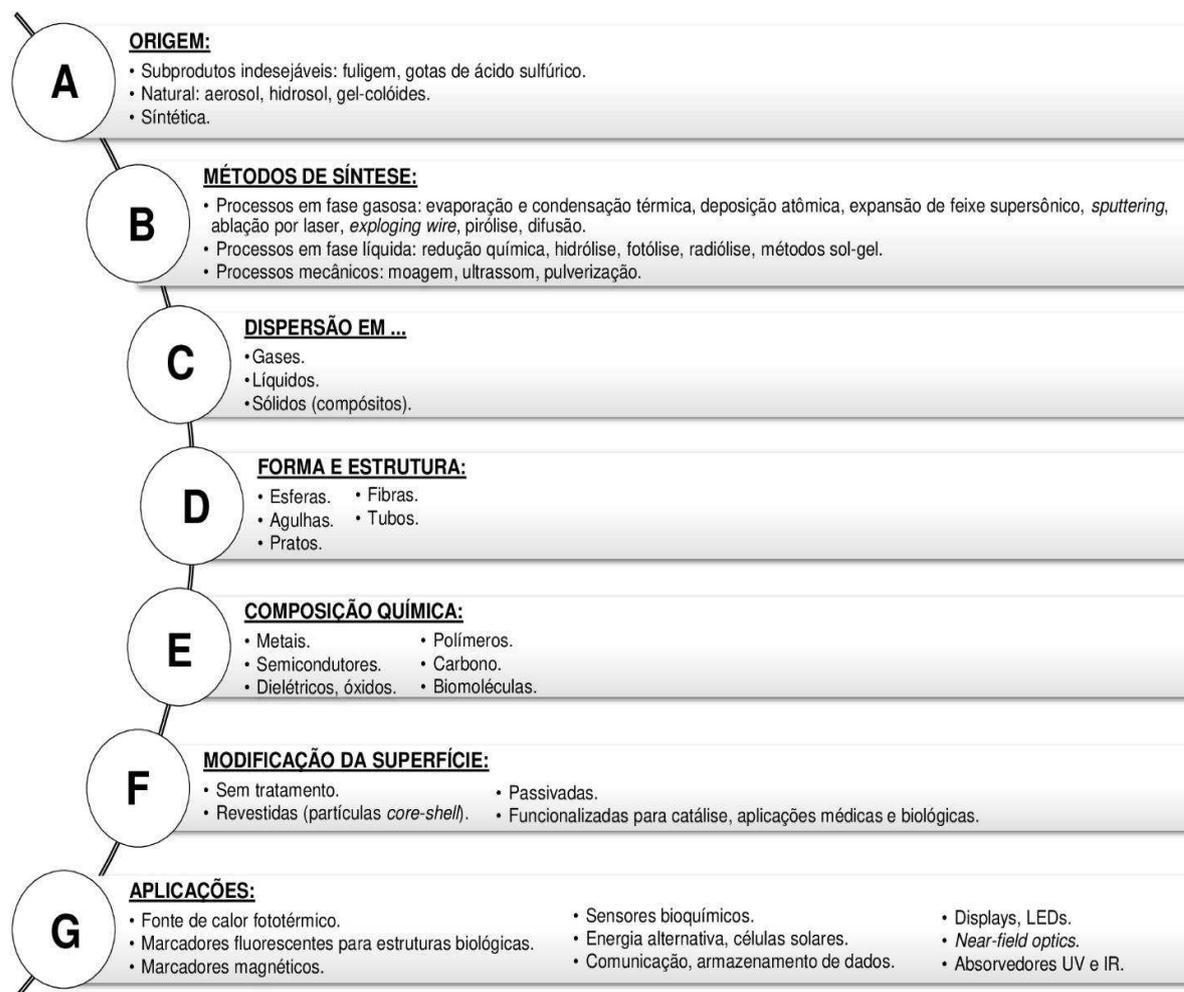
¹ Limite de resistência à fadiga após 10⁷ ciclos.

Fonte: ANSYS GRANTA EDUPACK (2021).

Os nanomateriais são assim classificados quando possuem uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm. As suas características únicas os tornam aptos a serem utilizados na fabricação de componentes eletrônicos, na síntese de nanocompósitos poliméricos e de pigmentos, no projeto de dispositivos para a detecção de doenças (como os biossensores), na administração de medicamentos e na produção de cosméticos para melhorar o transporte ativo entre as camadas da pele (COUTINHO & SOMOZA, 2019; DA SILVA, 2016). Em especial para aplicações biomédicas, um dos nanomateriais mais explorados são as nanopartículas metálicas, como, por exemplo, as nanopartículas de ouro, porque elas apresentam alta relação área superficial por volume, alta energia de superfície, propriedades de emissão e absorção ajustáveis, propriedades mecânicas aprimoradas e biocompatibilidade (DAS *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2017).

Quinten (2011) apresenta em sua obra uma classificação completa dos sistemas nanoparticulados, conforme apresentado pela Figura 2, a seguir.

Figura 2 - Classificação de um sistema de nanopartículas



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Adaptado de Quinten (2011, p. 10 – 12).

A partir da Figura 2, observa-se que as nanopartículas de ouro se enquadram no grupo dos sistemas nanoparticulados sintéticos, preparadas pelo método de redução química e pertencente ao grupo dos processos com fase líquida, cujo procedimento será aprofundado na seção 2.1.2.

Quanto à forma de dispersão, elas têm o potencial para serem aplicadas em diferentes produtos, então, a escolha pela sua dispersão em meios gasosos, líquidos ou sólidos será realizada pensando na sua aplicação final. O meio de dispersão das nanopartículas influencia significativamente na estabilidade do sistema particulado, uma vez que as diferentes interações entre as nanopartículas podem se tornar relevantes à aplicação, afetando a mobilidade das partículas e a sua distribuição espacial. Para os biossensores em particular, dispositivos a serem discutidos mais detalhadamente na seção 2.1.3, as nanopartículas de ouro geralmente encontram-se

dispersas em um meio líquido, posteriormente fixadas ou não em um substrato sólido como vidro, metal ou polímero.

Sobre a forma, modificação da superfície e aplicação, existem inúmeras possibilidades para as nanopartículas de ouro, que dependerão da síntese utilizada, dos parâmetros do processo, do objetivo final da aplicação, entre outros fatores, os quais serão discutidos nas seções 2.1.1, 2.1.2 e 2.1.3 respectivamente.

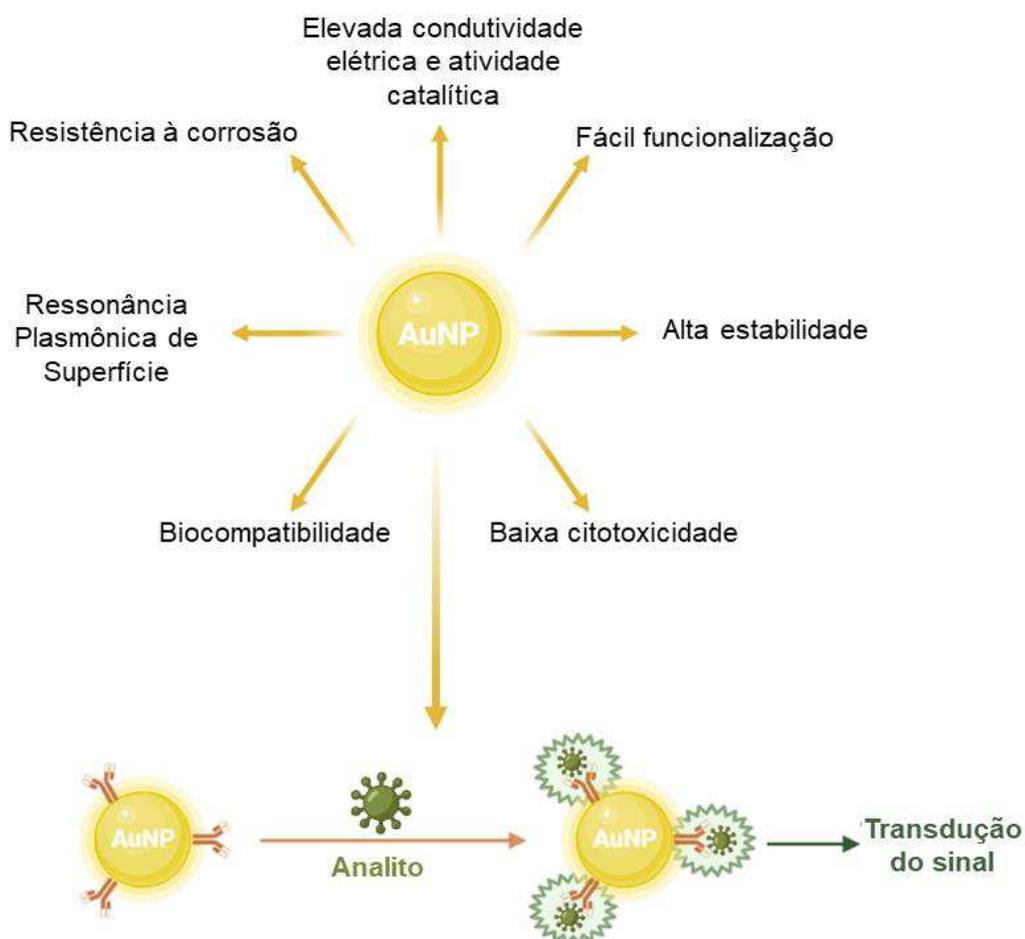
Por fim, quanto à composição química das nanopartículas de ouro, estas podem se apresentar apenas como metal, quando não funcionalizadas, ou podem ser revestidas (funcionalizadas) por uma camada polimérica.

2.1.1 Propriedades das Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) se tornaram fortes candidatas para aplicações em dispositivos utilizados na detecção de doenças virais e bacterianas, uma vez que apresentam elevada condutividade elétrica e atividade catalítica (ABDULBARI & BASHEER, 2017; SAHA *et al.*, 2012), resistência à corrosão, propriedades de ressonância plasmônica de superfície (SPR) (ZENG *et al.*, 2014), biocompatibilidade intrínseca, baixa citotoxicidade, alta estabilidade em fluidos biológicos e fácil funcionalização com as espécies biológicas de interesse (GILJOHANN *et al.*, 2010; HEUER-JUNGEMANN *et al.*, 2013). A Figura 3 resume as características das AuNPs e um esquema simplificado de como é realizada a detecção de biomoléculas facilitada pelo uso dessas nanopartículas.

No esquema apresentado pela Figura 3, observa-se que a nanopartícula de ouro atua como um substrato para a fixação do elemento de reconhecimento, que pode ser um anticorpo, um antígeno, uma sonda de DNA, entre outros. Quando a amostra biológica contém o analito alvo para detecção, este analito se liga ao elemento de reconhecimento fixado na superfície das nanopartículas de ouro, gerando uma alteração do sinal elétrico ou óptico do dispositivo.

Figura 3 – Propriedades das nanopartículas de ouro e ilustração esquemática do sistema de detecção baseado em AuNPs

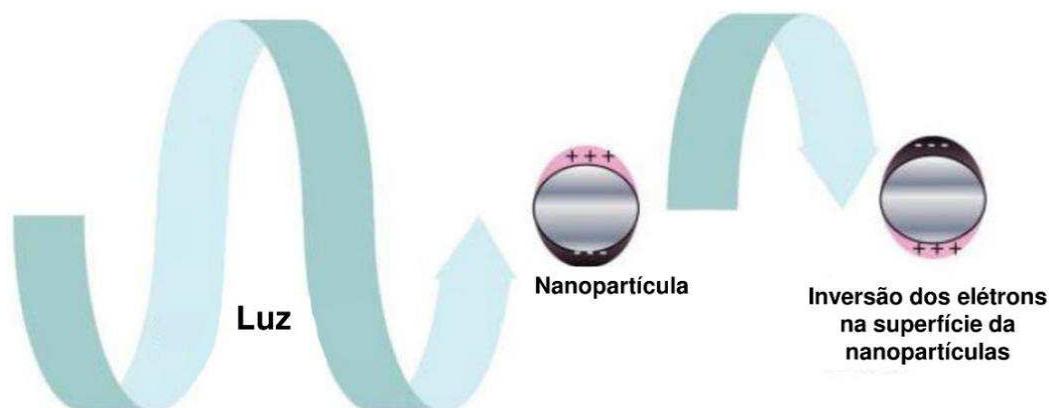


Fonte: Adaptado de Saha *et al.* (2012, p. 2).

As nanopartículas de ouro, assim como as nanopartículas de prata e de cobre, apresentam ressonância plasmônica de superfície (ressonância de plasmon de superfície ou SPR) que explica o comportamento óptico desses nanomateriais. Alguns autores, ainda, nomeiam essa propriedade como ressonância plasmônica de superfície localizada para diferenciar o comportamento de um filme metálico do comportamento das nanopartículas metálicas (COUTINHO & SOMOZA, 2019). A ressonância plasmônica de superfície é basicamente uma interação entre uma onda eletromagnética, a luz, e a matéria, um substrato metálico nobre, como ouro, prata ou cobre. Quando a luz é incidida sobre o substrato metálico e atinge a nuvem eletrônica presente em sua superfície (os metais possuem elétrons livres), tanto a onda eletromagnética como a nuvem eletrônica oscilam. Como o comprimento de onda eletromagnética da luz é muito maior que o tamanho da nanopartícula metálica, criam-se condições de ressonância permanentes, como mostra a Figura 4. Essa luz em

ressonância faz com que os elétrons livres presentes nas nanopartículas metálicas também oscilem, polarizando a densidade de elétrons para uma superfície (EUSTIS & EL-SAYED, 2006).

Figura 4 – Ressonância de plasmon de superfície em uma nanopartícula, devido à interação entre os elétrons da banda de valência do material e a luz

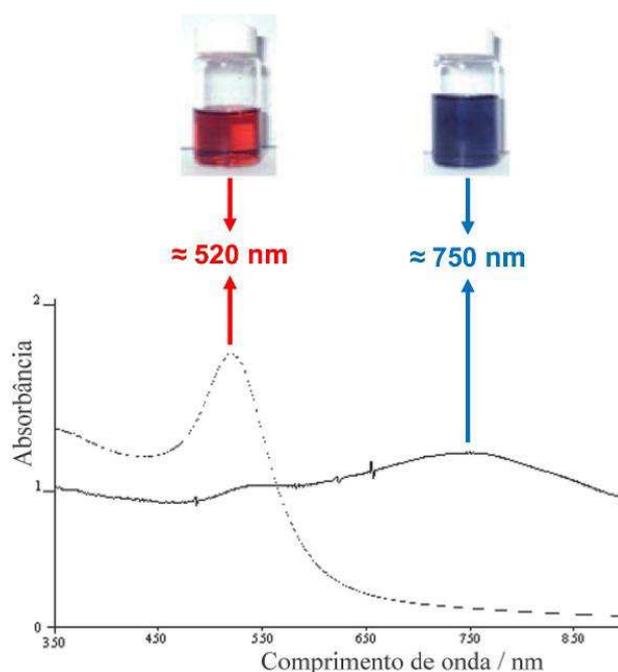


Fonte: Eustis & El-Sayed (2006, p. 212).

Devido à propriedade de ressonância plasmônica de superfície, as nanopartículas de ouro se apresentam em diferentes colorações quando estão em solução aquosa, passando de vermelho intenso para roxo, à medida que o tamanho médio das partículas aumenta de 1 nm para 100 nm, uma vez que um tamanho de partículas maior aumenta a densidade de estados eletrônicos na superfície das nanopartículas e, conseqüentemente, reduz a energia de transição entre as bandas (EUSTIS & EL-SAYED, 2006; GIRI, 2017; JAIN *et al.*, 2006; LINK & EL-SAYED, 1999; TOMA & BONIFÁCIO, 2005).

Como já fora mencionado anteriormente, as nanopartículas de ouro podem ser facilmente modificadas (funcionalizadas) com moléculas que têm elevada afinidade a substratos específicos, como anticorpos, aptâmeros e antígenos. Especificadamente para aplicações em diagnóstico, quando as nanopartículas de ouro funcionalizadas detectam a presença desses substratos, interagindo ou, até mesmo, ligando-se a eles, ocorre a agregação das nanopartículas de ouro que, por sua vez, leva também a uma alteração na coloração da solução, que passa de vermelho (solução com nanopartículas dispersas) a azul (solução com nanopartículas aglomeradas), conforme mostra a Figura 5 (PIRIYA *et al.*, 2017).

Figura 5 – Mudança na coloração de uma suspensão de nanopartículas de ouro em água devido ao processo de agregação, na presença de 4-mercaptopiridina



Fonte: Toma & Bonifácio (2005, p. 900).

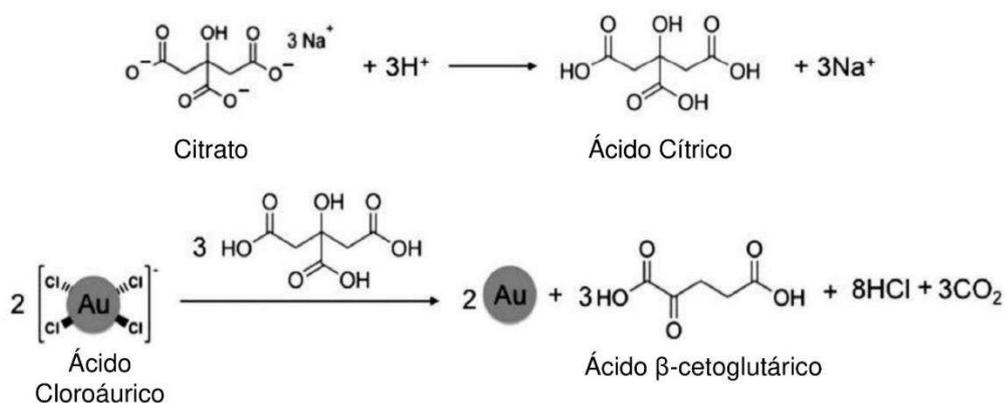
A Figura 5 revela que o processo de agregação das nanopartículas de ouro gera alterações visuais na solução coloidal através da mudança de coloração que pode ser, ainda, confirmada tecnicamente pela análise de Espectroscopia na região do UV-visível, através do deslocamento da banda de máxima absorvância de 520 nm aproximadamente (característica das soluções coloidais de ouro) para 750 nm. No caso apresentado na Figura 5, a agregação das nanopartículas de ouro foi promovida pela adição de 4-mercaptopiridina (C_5H_5NS), que liga-se às nanopartículas de ouro, devido à alta afinidade do grupamento tiol ($-SH$) pelo ouro e, como a 4-mercaptopiridina não possui cargas, não é capaz de estabilizar as nanopartículas ocasionando sua agregação (TOMA & BONIFÁCIO, 2005).

2.1.2 Síntese Química das Nanopartículas de Ouro

As metodologias para síntese química de nanopartículas de ouro pela abordagem *bottom up* encontradas na literatura são numerosas, mas o princípio básico é semelhante em todas: a redução química de íons Au^{3+} em ouro Au^0 , através de agentes redutores como o Citrato de Sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) e o Borohidreto de Sódio ($NaBH_4$).

A primeira síntese de AuNPs publicada foi desenvolvida em 1951 por Turkevich e colaboradores, na qual o Ácido Cloroáurico (HAuCl_4 , reagente precursor do ouro) foi tratado com ácido cítrico em água em ebulição; assim, o citrato funcionou tanto como agente redutor, quanto como agente estabilizante para a formação das nanopartículas, impedindo a sua agregação (GIRI, 2017; TURKEVICH *et al.*, 1951; YEY *et al.*, 2012). A Figura 6, a seguir, apresenta as reações químicas envolvidas durante a síntese de nanopartículas de ouro através do método de redução via Citrato de Sódio.

Figura 6 – Reações envolvidas na síntese de AuNPs usando citrato com agente redutor



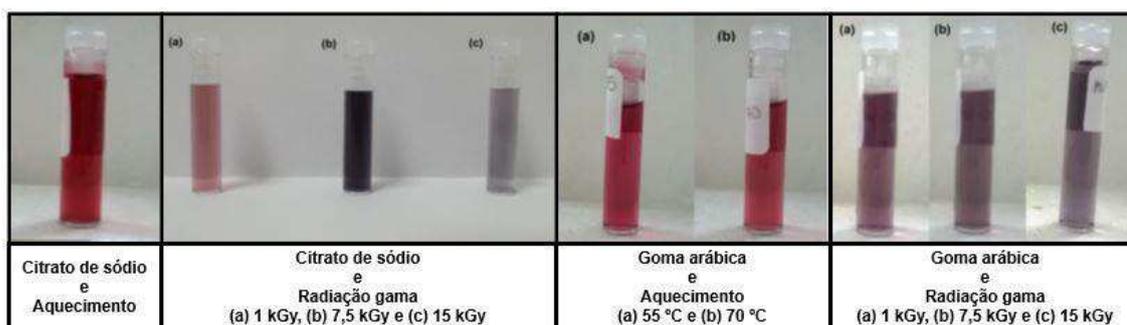
Fonte: Giri (2017, p. 104).

A Figura 6 mostra que, quando em solução, o Citrato de Sódio se dissocia em íons citrato e íons de sódio. Na presença da solução de Ácido Cloroáurico em ebulição (ou sob aquecimento), os íons citrato ligam-se aos íons de hidrogênio (H^+) e se transformam em Ácido Cítrico. Por fim, o Ácido Cítrico reduz o Au^{3+} em Au^0 , que se agrega para formar as nanopartículas de ouro (AuNPs). A reação é visual, na medida em que o Au^{3+} em solução aquosa apresenta-se como uma solução amarelada; ao adicionar o Citrato de Sódio, a solução torna-se rapidamente incolor, muda para azul e, lentamente, se estabiliza em uma coloração avermelhada (vermelho escuro – vinho) (GIRI, 2017).

Este procedimento é o mais replicado na literatura, sendo que os autores realizam modificações nos parâmetros da síntese, como na velocidade de agitação, temperatura, pH e quantidade de reagentes, mas a ideia central proposta por Turkevich e colaboradores em 1951 é mantida. Da Silva (2016), por exemplo, realizou a caracterização de nanopartículas de ouro sintetizadas e estabilizadas por citrato de sódio e por goma arábica, baseada na metodologia desenvolvida por Turkevich *et al.*

(1951), e avaliou a utilização da radiação gama em substituição ao aquecimento para reduzir o tempo de síntese e comprovar a realização de uma possível esterilização das AuNPs produzidas, visando a sua aplicação em cosméticos. A Figura 7, apresentada a seguir, reúne as amostras sintetizadas por Da Silva (2016) e mostra a diferença visual de cada uma, com base no processamento realizado.

Figura 7 – AuNPs sintetizadas com citrato de sódio/goma arábica e com aquecimento/radiação



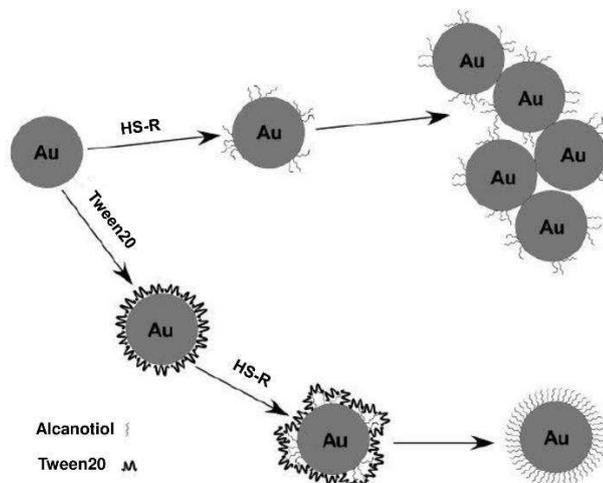
Fonte: Adaptado de Da Silva (2016, p. 34-36).

Observando a Figura 7, é possível evidenciar a presença de quatro colorações basicamente: vermelho (claro e escuro), roxo, cinza e preto. A síntese de nanopartículas de ouro com Citrato de Sódio como agente redutor e realizada com aquecimento apresentou coloração vermelha, indicando a formação efetiva das AuNPs, com forma provavelmente esférica e sem presença de precipitados. A síntese com Citrato de Sódio como agente redutor e com uso de radiação gama apresentou a formação de AuNPs apenas com dose de radiação igual a 1 kGy. Já os procedimentos realizados com goma arábica como agente redutor mostrou a formação de nanopartículas de ouro em ambos os casos, com aquecimento e com radiação, mas devido à diferença visual identificada entre as sínteses (solução com cores diferentes), pode-se inferir que o tamanho das partículas é diferente (DA SILVA, 2016).

Posteriormente, foram desenvolvidas outras metodologias para a síntese de nanopartículas de ouro, incluindo no meio reacional, além do precursor e do agente redutor, agentes estabilizantes e surfactantes. Aslan e Pérez-Luna (2002) citam a existência de apenas duas abordagens para funcionalizar nanopartículas de ouro: 1 – modificando a superfície de uma solução de ouro coloidal já sintetizada, através da quimiosorção de grupos tióis e 2 – sintetizar AuNPs com uma monocamada orgânica em uma única etapa. Os autores, por exemplo, modificaram dispersões de ouro

coloidal, incluindo na superfície das nanopartículas de ouro uma camada adsorvida de alcanotióis, na presença e na ausência de surfactante. O grupo tiol (RSH) é caracterizado pela presença de um átomo de enxofre ligado a uma cadeia hidrocarbônica, responsável pela adsorção da molécula na superfície do substrato, sendo que a interação RS-Au é extremamente forte (ligação covalente) e, por isso, é muito utilizada quando se pretende construir monocamadas auto-organizadas (SAM – *self-assembled monolayer*). No caso do estudo desenvolvido por Aslan e Pérez-Luna (2002), os autores utilizaram os ácidos 11-Mercaptoundecanóico (11-MUDA) e 16-Mercaptohexadecanóico (16-MHDA) como precursores do grupo tiol para a construção da monocamada auto-organizada e o surfactante Tween 20 para avaliar se o mesmo impediria a agregação das nanopartículas, conforme hipótese criada pelos próprios autores. A Figura 8, a seguir, apresenta esquematicamente o processo estudado por Aslan e Pérez-Luna (2002), os quais inferem que a monocamada auto-organizada construída ao redor das nanopartículas de ouro possui os grupos metileno expostos, conferindo às partículas um caráter hidrofóbico e, conseqüentemente, promovendo sua agregação. Por outro lado, na presença do surfactante, os grupos oligo(etilenoglicol) do Tween 20 impedem a agregação das AuNPs por meio de interações estéricas, as quais permanecem até mesmo durante a quimiosorção dos alcanotióis, permitindo a construção da SAM sem que ocorra a agregação das nanopartículas durante e após o processo.

Figura 8 – Quimiosorção de alcanotióis em nanopartículas de ouro na presença e ausência de surfactante

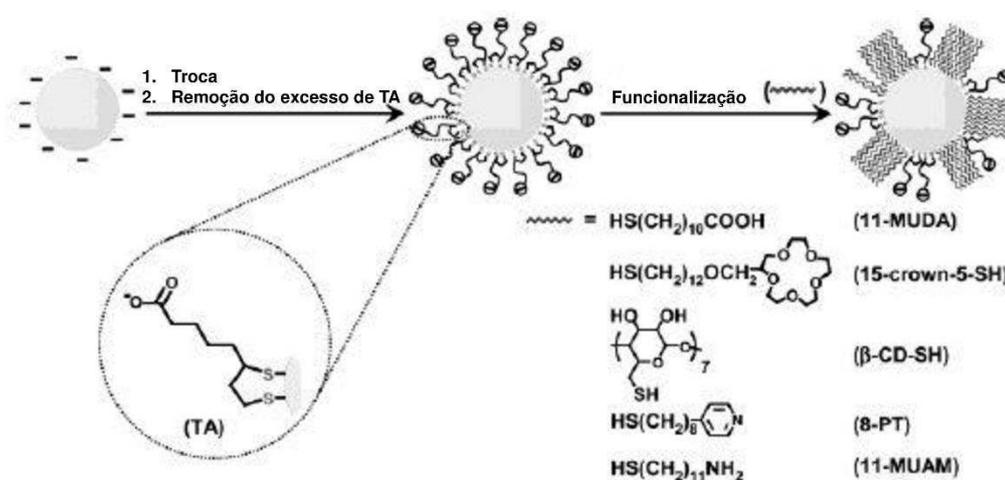


Fonte: Aslan & Pérez-Luna (2002, p. 6060).

Os autores identificaram diferentes valores para o parâmetro de floculação dependendo do pH da solução, sendo que na ausência do Tween 20, o parâmetro de floculação para o ouro coloidal modificado com 11-MUDA e 16-MHDA atingiu seu valor mínimo sob pH 5. Já na presença do surfactante, o parâmetro de floculação atingiu seu valor mínimo sob pH 7 nas amostras modificadas com 11-MUDA e pH 8 nas amostras modificadas com 16-MHDA. Além disso, segundo Aslan e Pérez-Luna (2002), a modificação da superfície com longas cadeias carbônicas (16-MHDA) pode resultar em coloides mais estáveis, porque a densidade de empacotamento e a ordem das monocamadas auto-organizadas aumenta com o número de grupos metileno.

Lin *et al.* (2004) desenvolveram um método semelhante ao trabalho de Aslan e Pérez-Luna (2002), mas incluíram o Ácido Tióctico (TA, ou Ácido Lipóico – $C_8H_{14}O_2S_2$) como um reagente intermediário à funcionalização das nanopartículas de ouro em um procedimento realizado em duas etapas, conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Funcionalização de nanopartículas de ouro em duas etapas



Fonte: Lin *et al.* (2004, p. 2135).

Os autores concluíram que a inclusão do TA antes da funcionalização principal com os ω -tióis desenvolve uma maior estabilização estérica, devido à lenta taxa de deslocamento das moléculas de ácido tióctico. Em determinados pH, ocorreu a floculação das nanopartículas de ouro, que, após serem centrifugadas e dissolvidas novamente em soluções tampão adequadas, as partículas se redispersaram, demonstrando o sucesso da proteção dos núcleos de ouro por estabilização estérica através do procedimento estudado.

A síntese das nanopartículas de ouro pode ser também realizada através de outro agente redutor, o Borohidreto de Sódio. Brust e co-autores alcançaram um

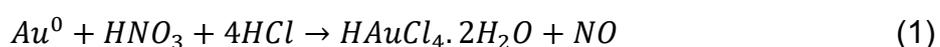
avanço na síntese de nanopartículas de ouro em 1994, ao desenvolver um método experimental de síntese com o Borohidreto de Sódio como agente redutor, além de usar o Dodecanotiol ($C_{12}H_{25}SH$) como um alcanotiol orgânico solúvel para a estabilização das nanopartículas e o Brometo de Tetraoctilamônio (TOAB, $[CH_3(CH_2)_7]_4NBr$) dissolvido em tolueno como reagente de transferência de fase do Ácido Cloroáurico de uma fase aquosa para uma fase orgânica (BRUST *et al.*, 1994). A solução coloidal obtida pelos autores mostrou-se muito estável, sem sinais de decomposição ou agregação após várias semanas que a síntese foi realizada. Após a solução ser filtrada e o precipitado passar por uma etapa de secagem, os autores obtiveram um produto sólido de coloração marrom escura, solúvel em solventes apolares (como o tolueno, pentano e clorofórmio) e com diâmetro médio das partículas entre 1 e 3 nm.

Variando as condições reacionais, como a razão entre ouro e tiol, a taxa de redução e a temperatura da reação é possível produzir AuNPs de baixa dispersividade e com tamanhos médios de partícula de 1,5 a 5 nm (HOSTETLER *et al.*, 1998).

Casanova (2010) investigou a estabilidade de nanopartículas de ouro sintetizadas a partir da redução com o Borohidreto de Sódio e na presença de diferentes tióis e estabilizantes poliméricos. A autora utilizou o Ácido Cloroáurico como precursor do ouro, os polímeros Polialilamina (PAH) e Álcool Polivinílico (PVA) como estabilizantes, e os tióis Ácido 11-Mercaptoundecanóico (11-MUDA) e Ácido 3-Mercaptopropiônico (3-AMP) também como estabilizantes. Os resultados obtidos pela autora revelam rapidez na formação das AuNPs com Borohidreto de Sódio como agente redutor, já que o mesmo trata-se de um agente redutor forte, e as soluções sintetizadas apresentaram colorações diferentes: as soluções de AuNPs estabilizadas com PAH apresentaram uma coloração avermelhada (tamanho médio igual a 4 nm), enquanto que nas soluções de AuNPs estabilizadas com PVA, a coloração obtida foi roxa (não foi possível identificar o tamanho médio das nanopartículas, pois estavam aglomeradas).

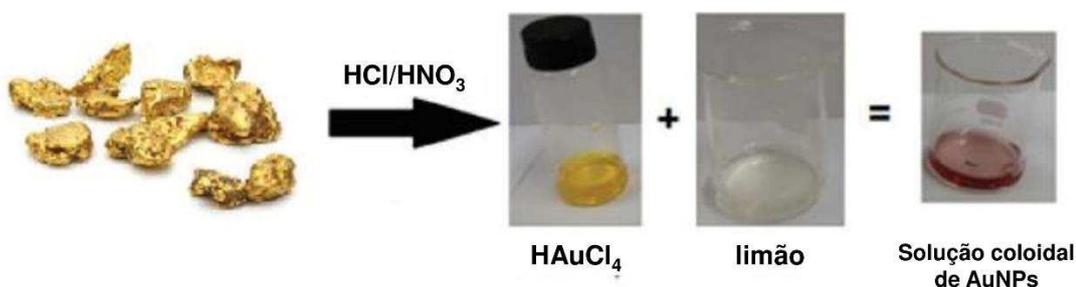
Alguns autores optam, ainda, por sintetizar as nanopartículas de ouro a partir de uma certa massa de ouro metálico. Dessa forma, se faz necessário incluir uma etapa inicial de produção do Ácido Cloroáurico (ou também chamado de Cloreto de Ouro III) que pode ser realizada comumente com água-régia (CAMMAROSANO, 1979; COURA *et al.*, 2018), ou utilizando Permanganato de Potássio e Ácido Clorídrico em um procedimento novo estudado por King *et al.* (2015).

A água-régia consiste em uma mistura de Ácido Clorídrico (HCl) e Ácido Nítrico (HNO₃) concentrados na proporção molar 3:1 respectivamente (sendo que a proporção volumétrica muitas vezes é convertida a 4:1 de HCl:HNO₃, em decorrência das concentrações desses reagentes – 37 e 65% respectivamente) (HELMENSTINE, 2020). O trabalho desenvolvido por Coura e co-autores (2018) teve como objetivo a síntese de AuNPs a partir do ouro metálico, utilizando suco de espécies diferentes de limão como agente redutor. A reação química 1, apresentada na sequência, descreve como é formado o Ácido Cloroáurico a partir de ouro metálico e água-régia.



Os autores observaram a dissolução completa da placa metálica de ouro após 45 minutos de reação, que foi conduzida sob aquecimento a 90 °C e em atmosfera ambiente, e através da estequiometria da reação química 1, foi possível estimar a concentração da solução de HAuCl₄ obtida, a partir da massa inicial de ouro metálico e do volume final presente no béquer. Após o procedimento para obtenção do Ácido Cloroáurico, os autores seguiram com a síntese das AuNPs pelo método descrito por Turkevich *et al.* (1951), com algumas adaptações, devido à alteração do agente redutor para suco dos limões taiti, siciliano, cravo e galego. Coura *et al.* (2018) observaram uma rápida alteração na coloração da solução durante a síntese, que passou de amarelo (característica da solução de Ácido Cloroáurico) para avermelhada, confirmando a obtenção das AuNPs em solução, com um tamanho médio de partícula entre 5 e 25 nm. A Figura 10, a seguir, apresenta as soluções de HAuCl₄ e das AuNPs obtidas pelos autores.

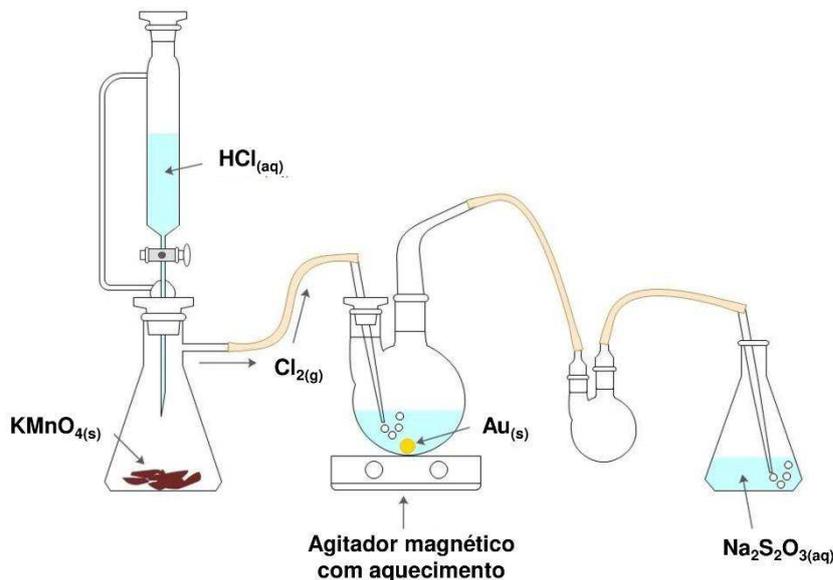
Figura 10 – Registro fotográfico da obtenção de AuNPs a partir de ouro metálico



Fonte: Coura *et al.* (2018, p. 537).

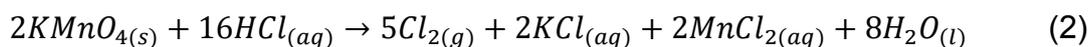
King e co-autores (2015) desenvolveram uma rota alternativa para a dissolução do ouro metálico e produção de Ácido Cloroáurico, conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Sistema para síntese do Ácido Cloroáurico em solução aquosa

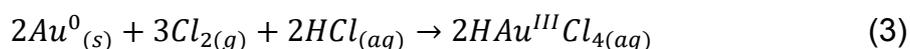


Fonte: King *et al.* (2015, p. 1456).

No sistema proposto por King *et al.* (2015), o Ácido Clorídrico (HCl) foi lentamente gotejado em um recipiente contendo o Permanganato de Potássio (KMnO_4), resultando na produção de gás cloro (Cl_2) conforme apresentado pela reação química 2.



O gás cloro resultante da reação apresentada anteriormente passa para um outro frasco contendo o ouro metálico e água, sendo borbulhado diretamente no líquido para a produção do Ácido Cloroáurico (HAuCl_4), conforme descrito pela reação química 3. O gás cloro que não foi dissolvido na etapa anterior é levado a uma solução de Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).



Os autores não detectaram nenhum subproduto contendo manganês na solução de HAuCl_4 e a maior taxa de reação foi obtida a temperatura de 50 °C,

aumentando quando os pellets de ouro metálico foram achatados para espessuras inferiores a 1 mm: 12 h para dissolver toda a amostra de ouro a 50 °C *versus* 35 h para a amostra esférica, sob a mesma temperatura. O Ácido Cloroáurico aquoso obtido foi, então, reservado e utilizado para a síntese das nanopartículas de ouro via redução com Citrato de Sódio.

Os dois últimos procedimentos descritos são estudados como rotas alternativas para a síntese de nanopartículas de ouro, tornando-a mais econômica, uma vez que ao invés de realizar a compra do reagente precursor, o Ácido Cloroáurico é produzido *in situ* em um processo que pode ser chamado de reciclagem do ouro. No entanto, segundo Wilson (2008), a síntese de AuNPs pode ser considerada como um processo econômico, pois, embora demande reagentes onerosos, as quantidades utilizadas desses reagentes são pequenas e as concentrações são muito baixas.

2.1.3 Funcionalização das Nanopartículas de Ouro

A funcionalização de nanopartículas de ouro é um processo de ativação da superfície, através da inserção de agentes químicos que se ligarão quimicamente ou fisicamente à mesma, com o objetivo de: 1. evitar a agregação das nanopartículas, ou 2. ligar um terceiro agente, como no exemplo dos bioreceptores, a fim de aumentar a compatibilidade biológica e a especificidade das partículas, para a sua aplicação em biossensores, administração medicamentosa, transferência gênica, entre outras (DREADEN *et al.*, 2012). Atualmente, os métodos para funcionalização das AuNPs envolvem a combinação de um ou mais grupos funcionais como, por exemplo, Polietilenoglicol (PEG), Albumina Sérica Bovina (BSA), Aminoácidos e Peptídeos, Oligonucleotídeos, entres outros agentes semelhantes (AMINA & GUO, 2020).

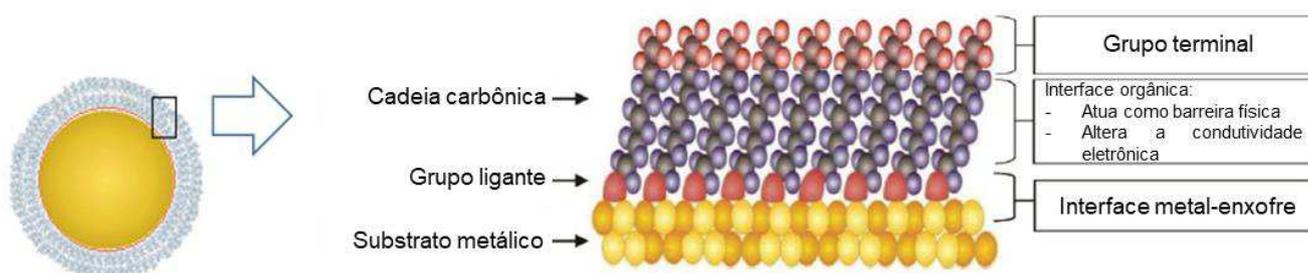
O Polietilenoglicol (PEG) trata-se de um polímero termoplástico, da família dos poliéteres, é classificado como uma macromolécula não-imunogênica¹ e não-antigênica², isto é, não prejudica as proteínas ou as células ativas, mesmo quando em contato e interagindo com elas. O Polietilenoglicol heterofuncional, por sua vez, possui grupos funcionais, como carboxilas (-COOH), tióis (R-SH) e aminas (-NH₂, -NH-) nas extremidades da sua cadeia polimérica, podendo, inclusive, possuir um grupo funcional diferente em cada extremidade. A funcionalização de nanopartículas de ouro

1 Imunogenicidade é a capacidade que uma substância tem de induzir uma resposta imunológica ao organismo.

2 Antigenicidade é a capacidade que uma substância tem de se ligar aos componentes do sistema imune.

utilizando Polietilenoglicol, denominado “*PEGylation*”, é o método mais comum para funcionalização de AuNPs, no qual as nanopartículas são recobertas por uma camada (layer) de PEG sozinho ou conjugado com outras moléculas, como biotina, peptídeos ou oligonucleotídeos, facilitando a internalização das AuNPs nas células (TIWARI *et al.*, 2011). A representação de uma nanopartícula de ouro funcionalizada e estabilizada com PEG-heterofuncional pode ser visualizada na Figura 12.

Figura 12 – Representação esquemática da monocamada auto-organizável de polietilenoglicol sobre a superfície da nanopartícula de ouro



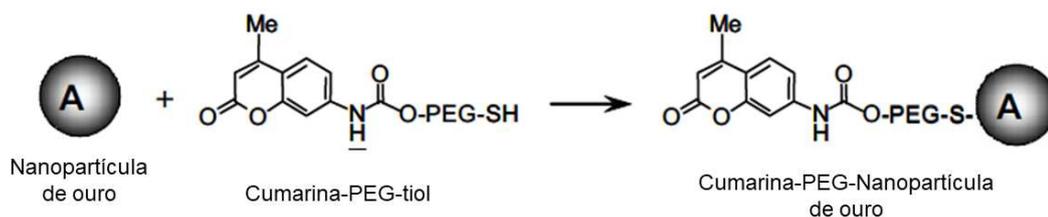
Fonte: Bianco (2019, p. 35).

O átomo de ouro apresenta uma configuração eletrônica composta pelo subnível 5d ($5d^{10}$) completo e o subnível 6s com apenas 1 elétron ($6s^1$), de modo que a ligação formada entre o ouro e o enxofre se deve a disponibilidade de carga presente no átomo de ouro e a compatibilidade entre os subníveis desses dois átomos (BIANCO, 2019).

Rahme e colaboradores (2013) estudaram a funcionalização de nanopartículas de ouro (com diâmetro igual a 15 nm) com Polietilenoglicol tiolado (mPEG-SH) com massas molares variando de 2.100 a 51.000 g/mol e avaliaram a influência do tamanho da cadeia polimérica sobre o diâmetro, estabilidade, número e conformação dos ligantes poliméricos sobre a superfície das AuNPs. Os autores observaram que o diâmetro médio das nanopartículas aumentou com o aumento da massa molar do mPEG-SH utilizado, em um comportamento não-linear. A utilização do polímero com maior massa molar resultou, também, em um decréscimo do número de ligantes, devido ao aumento do impedimento estérico e da entropia conformacional das nanopartículas.

A produção de nanopartículas de ouro funcionalizadas com Polietilenoglicol heterofuncional possuindo um agente fluorescente, a cumarina, foi reportado por Shenoy e colaboradores (2006), conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Funcionalização de nanopartículas de ouro com Cumarina-Polietilenoglicol-tiol



Fonte: Shenoy *et al.* (2006, p. 53).

O complexo obtido consiste em nanopartículas de ouro funcionalizadas com Polietilenoglicol-tiol, através da ligação covalente entre ouro e enxofre, e o agente fluorescente é ligado na outra extremidade do PEG. Os autores evidenciaram, a partir de análises de citotoxicidade celular e fluorescência confocal, que o complexo não apresentou toxicidade e pode ser eficientemente internalizado nas células dentro de 1 hora de incubação. Esse estudo visou a aplicação de tal complexo no rastreamento intracelular de células MDA-MB-231, pertencente a linhagem de células do câncer de mama (AMINA & GUO, 2020; SHENOY *et al.*, 2006).

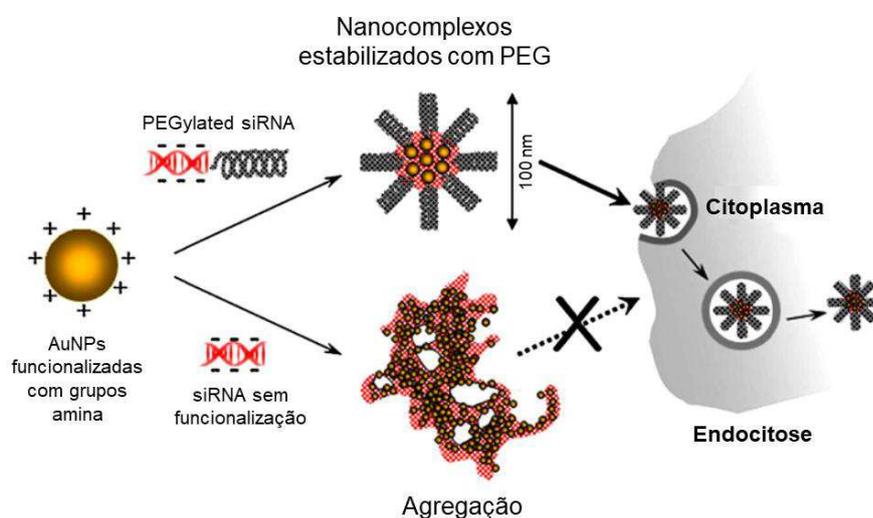
As vantagens da utilização do PEG para funcionalização de nanopartículas de ouro englobam a redução do grau de forças de atração entre as AuNPs, expandindo o gap estérico entre as partículas, além de interagir com o solvente por meio de ligações tipo pontes de hidrogênio (AVGOUSTAKIS, 2004). O PEG, ainda, altera a flexibilidade das nanopartículas de ouro, tornando-as mais “macias” (AMINA & GUO, 2020). Apesar do PEG apresentar uma elevada resistência à degradação por amostras biológicas, característica essa vantajosa no que se refere à estabilidade das nanopartículas de ouro, é desejado para determinadas aplicações que as AuNPs funcionalizadas sejam biodegradadas *in-vivo*, sem interferência externa e sem gerar maiores danos ao organismo, após um certo período de tempo. Outro desafio da funcionalização com o PEG está relacionado a sua fragmentação por luz, calor ou estresse, resultando na diminuição de sua capacidade de revestimento (KNOP *et al.*, 2010).

Aminoácidos e peptídeos englobam um segundo método para funcionalização de nanopartículas de ouro, uma vez que os grupos amina presentes nessas moléculas se ligam às nanopartículas, enquanto os grupos carboxílicos carregados negativamente se estendem para fora, estabilizando as AuNPs ou, ainda, podendo se ligar a um bioreceptor como, por exemplo, uma sequência de DNA (AMINA & GUO,

2020). Os aminoácidos são compostos orgânicos formados por grupos amina ($-\text{NH}_2$) e grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$), são as unidades estruturais básicas das proteínas e desempenham diversos papéis no fornecimento de energia e na formação de uma série de outras biomoléculas importantes, como hormônios e neurotransmissores (DIETZEN, 2018). Os peptídeos, por sua vez, são biomoléculas formadas por dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Essas ligações peptídicas caracterizam a formação de uma ligação amida quando o nitrogênio do grupo amina de um aminoácido reage com o carbono do grupo carboxila de um segundo aminoácido.

A síntese de AuNPs estabilizadas com grupos amina, derivado da molécula de cisteamina, e conjugadas com PEG-siRNA foi realizada por Lee *et al.* (2008). Nesse estudo, o complexo apresentado na Figura 14, com diâmetro hidrodinâmico igual a $96,3 \pm 25,9$ nm, foi internalizado em células de carcinoma relacionadas ao câncer de próstata, e a captação intracelular do siRNA inibiu a expressão de um gene alvo dentro das células sem mostrar citotoxicidade grave.

Figura 14 – Ilustração esquemática do complexo formado com AuNP funcionalizada com grupos amina e o conjugado PEG-siRNA

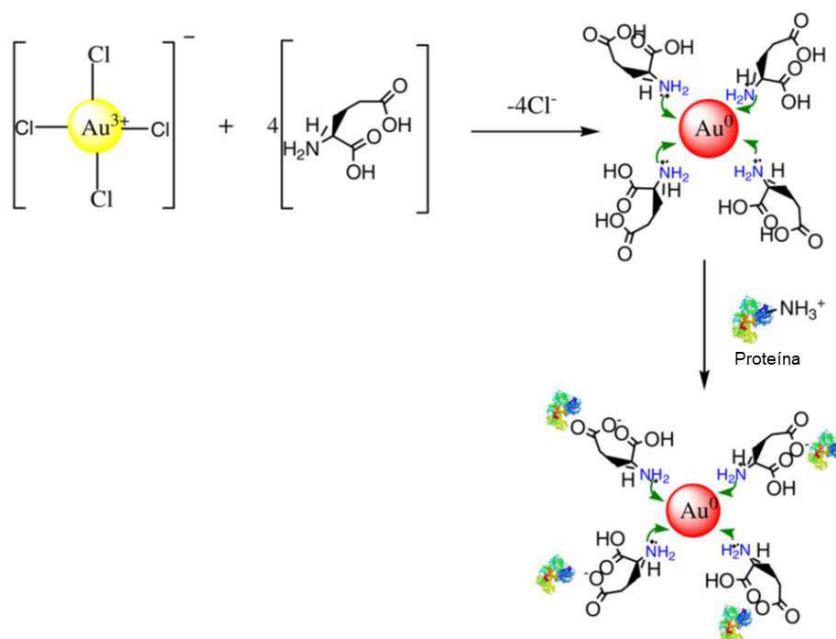


Fonte: Lee *et al.* (2008, p. 95).

Wangoo e co-autores (2008) realizaram a síntese de nanopartículas de ouro com Ácido Glutâmico (aminoácido) como agente redutor e estabilizante, na medida em que além de reduzir os íons de Au^{3+} presentes no precursor, os grupos amina do Ácido Glutâmico interagem com a superfície das AuNPs, enquanto os grupos carboxílicos do aminoácido estendem-se para fora e se ligam a grupos amina de

proteínas, realizando a conjugação das nanopartículas funcionalizadas (AMINA & GUO, 2020), conforme pode ser visualizado na Figura 15.

Figura 15 – Representação esquemática da formação de nanopartículas de ouro a partir da redução química com Ácido Glutâmico e a sua conjugação com proteína



Fonte: Wangoo *et al.* (2008, p. 249).

As nanopartículas de ouro funcionalizadas com os seguintes aminoácidos: lisina, polilisina e glicina, ligam-se a sequências de DNA com alta eficiência para a transferência gênica, não apresentando toxicidade às células, favorecido pela interação entre as aminas primárias presentes na cadeia hidrocarbônica desses aminoácidos e os grupos catiônicos do DNA (TIWARI *et al.*, 2011). Apesar da eficiência na ligação entre aminoácidos ou peptídeos com nanopartículas de ouro, para a sua aplicação na entrega de medicamentos, esse método de funcionalização causa a agregação das AuNPs. Uma alternativa nesses casos seria o uso de reagentes tiolados, porém, para administração medicamentosa, os grupos tióis presentes na funcionalização podem ser substituídos por outros grupos tióis presentes no organismo humano em altas concentrações (HOSTETLER *et al.*, 1999). Outro desafio associado ao método é a determinação da sequência exata de peptídeos a ser utilizada para obter a função desejada (AMINA & GUO, 2020).

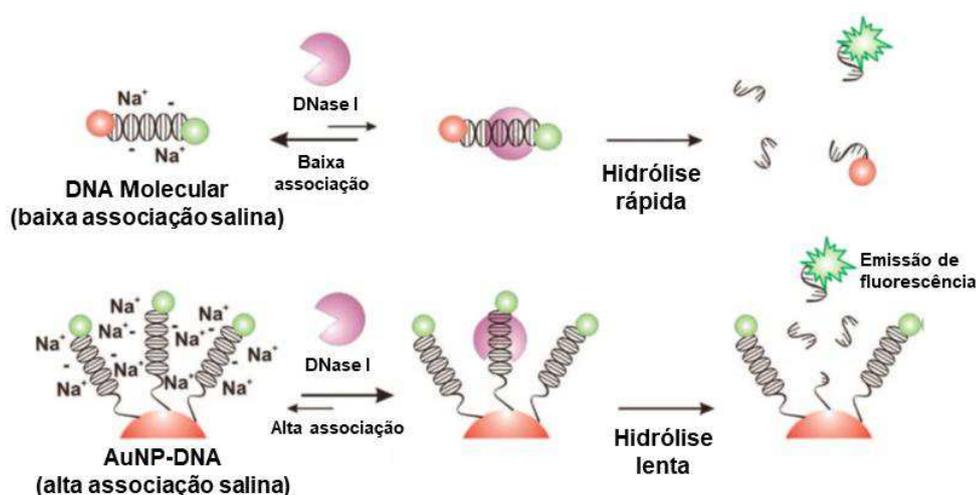
As interações do tipo ligações de hidrogênio formadas entre duas sequências complementares de DNA são específicas e reversíveis, tornando essas biomoléculas um agente único de ligação; por esse motivo, a síntese de nanopartículas

funcionalizadas com DNA tornou-se uma área de grande interesse para a pesquisa (AMINA & GUO, 2020; GEERTS & EISER, 2010).

Em um estudo sobre a cinética e termodinâmica envolvidas na conjugação de DNA em nanopartículas de ouro, evidenciou-se que a sonda de DNA (DNA de fita simples, ou, ssDNA) primeiro se liga às AuNPs e, então, se espalha gradualmente em sua superfície (CHEN *et al.*, 2009). Tais nanoestruturas podem ser formadas através de metodologias controladas que incluem a ligação de um número específico de moléculas de DNA de fita simples mediada por grupos tiol (R-SH) ou pela saturação da superfície das AuNPs com as moléculas de DNA (PELLEGRINO *et al.*, 2007).

A Figura 16 apresenta esquematicamente a funcionalização de nanopartículas de ouro com oligonucleotídeos; o conjugado resultante se mostrou resistente à degradação por enzima e apresentou alta internalização celular (SEFEROS *et al.*, 2009).

Figura 16 – Formação de complexo AuNP-DNA



Fonte: Seferos *et al.* (2009, p. 310).

A funcionalização de nanopartículas de ouro (com diâmetro igual 20 nm) com aptâmeros foi realizada por Javier e co-autores (2008) para aplicações como agentes de contraste em técnicas de imagem, utilizando aptâmeros como agente de direcionamento e as nanopartículas como agentes de imagem para a detecção de PSMA (*prostate-specific membrane antigen*) relacionado ao câncer de próstata. Os aptâmeros são oligonucleotídeos de cadeia simples, selecionados para ligarem-se a alvos específicos, com elevada sensibilidade, seletividade e especificidade (PEREIRA, 2017). Os autores observaram que a integridade e a estabilidade dos aptâmeros foi facilmente preservada durante a sua bioconjugação com as

nanopartículas, além de que apenas uma pequena quantidade de aptâmeros foi necessária para a completa funcionalização e estabilização das mesmas (JAVIER *et al.*, 2008).

2.1.4 Aplicações das Nanopartículas de Ouro

Os dispositivos em escala nanométrica são capazes de interagir com biomoléculas tanto de modo extracelular quanto intracelular, uma vez que os dispositivos menores que 50 nm conseguem penetrar a membrana celular da maioria das células, enquanto os dispositivos menores que 20 nm podem se mover para fora dos vasos sanguíneos, circulando pelo corpo. Assim, as características desses nanomateriais ampliam as possibilidades de aplicação, como, por exemplo, para detectar doenças, monitorar células dentro do sistema vivo e administrar medicamentos (DAS *et al.*, 2013). Além disso, as nanopartículas podem ser usadas nas técnicas de imagem (PARK *et al.*, 2010), para a detecção de biomoléculas em amostras de sangue (LIU *et al.*, 2004) e na engenharia de tecidos (HARRISON & ATALA, 2007).

Conforme apresentado no capítulo anterior, as nanopartículas de ouro são facilmente funcionalizadas com moléculas de reconhecimento, como anticorpos, antígenos ou oligonucleotídeos para detecção de biomoléculas alvo complementares às moléculas de reconhecimento, tornando possível a sua aplicação para a detecção *in vitro* e diagnóstico de doenças (YEH *et al.*, 2012). Na sequência, serão apresentados alguns exemplos de aplicação das nanopartículas de ouro na área da saúde, que foi a área de escolha para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1.4.1 Biossensores

Thévenot *et al.* (1999) definem os biossensores como um dispositivo que combina um sistema de reconhecimento bioquímico (receptor) e um transdutor (detector), transformando uma resposta bioquímica, desde a concentração de um componente específico da amostra até a análise da composição total, em um sinal de saída mensurável. Esses dispositivos, quando aplicados na área da saúde, são utilizados para o diagnóstico de inúmeras doenças, como câncer, doenças virais, doenças autoimunes, entre outras (RAPP *et al.*, 2010).

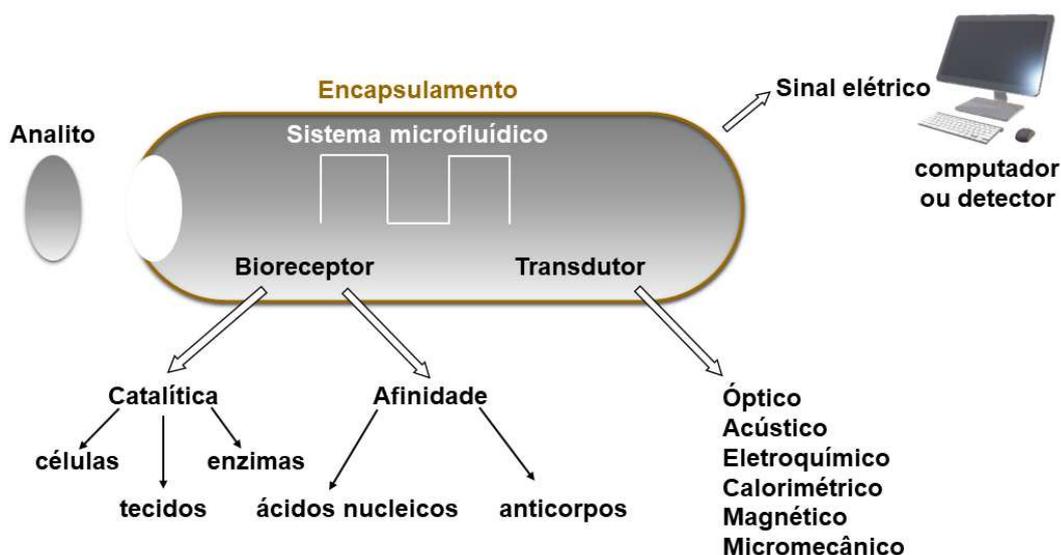
Existem dois tipos principais de biossensores: os dispositivos “*labeled*” (rotulados) e os “*label-free*” (traduzindo literalmente para “sem rótulos/etiquetas”). No primeiro caso (“*labeled*”), utilizam-se enzimas, nanopartículas e sondas fluorescentes ou eletroquimioluminescentes como marcadores, tornando possível a detecção de baixas concentrações. No entanto, algumas desvantagens do método incluem o aumento nos custos operacionais e no tempo de desenvolvimento devido à utilização dos marcadores, a impossibilidade de monitorar em tempo real a ligação do analito à superfície do marcador e a probabilidade dos marcadores em gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos (RAPP *et al.*, 2010).

No segundo caso (“*label-free*”), não são utilizados marcadores e a resposta do dispositivo muda no exato momento em que as moléculas do analito se ligam à superfície do transdutor; o grande desafio desse dispositivo ocorre quando a amostra do usuário é uma amostra complexa, como, por exemplo, soro, porque componentes não analíticos na amostra podem se ligar na superfície do sensor, levando a resultados falso-positivos (RAPP *et al.*, 2010).

Além disso, existem outras duas etapas que compõem a construção de um biossensor: a etapa de encapsulamento e a integração do dispositivo com um sistema microfluídico. O processo de encapsulamento é crucial, porque é responsável por envolver o dispositivo em um invólucro que o protege de influências externas indesejadas e assegura a sua integridade elétrica, óptica, mecânica e biológica. O encapsulamento de biossensores deve ser projetado de uma forma que o dispositivo seja vedado/selado apenas parcialmente para permitir o impacto de uma tensão externa, por exemplo, para medição da pressão, ou a presença de uma amostra biológica, como sangue. O sistema microfluídico, por sua vez, é responsável por realizar a ligação entre a amostra (provida pelo usuário) e o dispositivo (RAPP *et al.*, 2010).

A ligação entre o analito alvo a ser detectado no dispositivo e a biomolécula imobilizada (elemento de reconhecimento ou bioreceptor) é governada por dois tipos de interações: 1 – catalítica ou enzimática, quando utilizam-se enzimas, amostras de tecido ou células; ou 2 – por afinidade, como as interações não-covalentes ocorridas entre antígeno-anticorpo (Ag/Ab), na hibridização de duas sondas de DNA ou na ligação do ácido nucleico a sua proteína correspondente (BELLUZO *et al.*, 2008; MASCINI & TOMBELLI, 2008). A Figura 17, a seguir, resume os componentes de um biossensor.

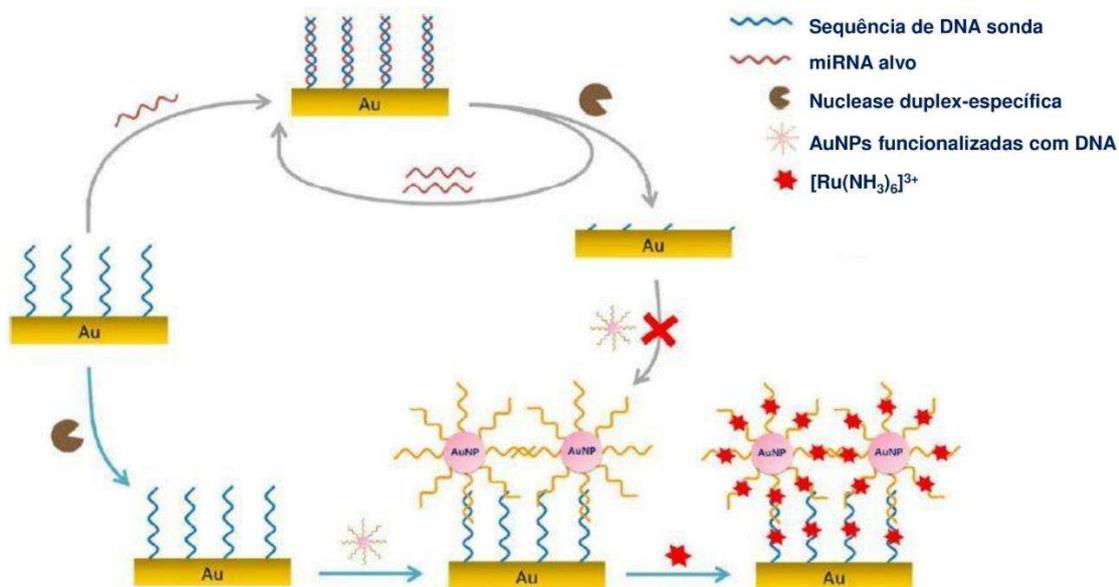
Figura 17 – Representação esquemática de um biossensor



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Adaptado de Mascini & Tombelli (2008, p. 638) e Rapp *et al.* (2010, p. 2404).

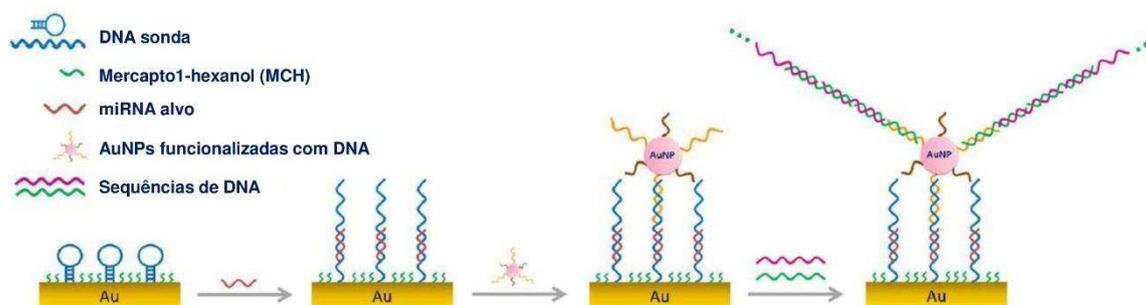
Coutinho e Somoza (2019) desenvolveram um estudo sobre a aplicação de nanopartículas de ouro em biossensores para a detecção de micro RNAs (miRNAs), através de uma revisão bibliográfica compreendendo aplicações reportadas entre 2013 e 2019. Os miRNAs são uma classe de RNA não codificados, contendo 19 a 24 nucleotídeos, presentes no meio celular de animais e plantas. Sua desregulação tem um efeito causal na progressão de infecções virais, doenças metabólicas e câncer (COUTINHO & SOMOZA, 2019; FERRACIN *et al.*, 2010). Foram catalogadas seis técnicas de detecção de miRNAs, divididas em dois grupos: os sensores em solução e os sensores com suporte sólido. No primeiro grupo, as nanopartículas de ouro são dispersas em uma solução e, em seguida, adicionam-se o elemento de reconhecimento e a amostra biológica contendo o analito alvo; este grupo compreende as técnicas de Detecção Colorimétrica e Detecção Fluorescente. Já no segundo grupo, as nanopartículas de ouro são fixadas em um suporte sólido (eletrodo de ouro, base polimérica ou lâmina de vidro), englobando os dispositivos de Detecção Eletroquímica, Detecção SPR, Fluxo Lateral e Baseados em Lâminas de Vidro. As Figuras 18, 19 e 20 apresentam uma imagem esquemática dos sensores de Detecção Eletroquímica, de Detecção SPR e de Fluxo Lateral respectivamente, para exemplificar a aplicação discutida.

Figura 18 – Biossensor eletroquímico para detecção de micro RNA com amplificação de sinal através de AuNPs funcionalizadas com DNA



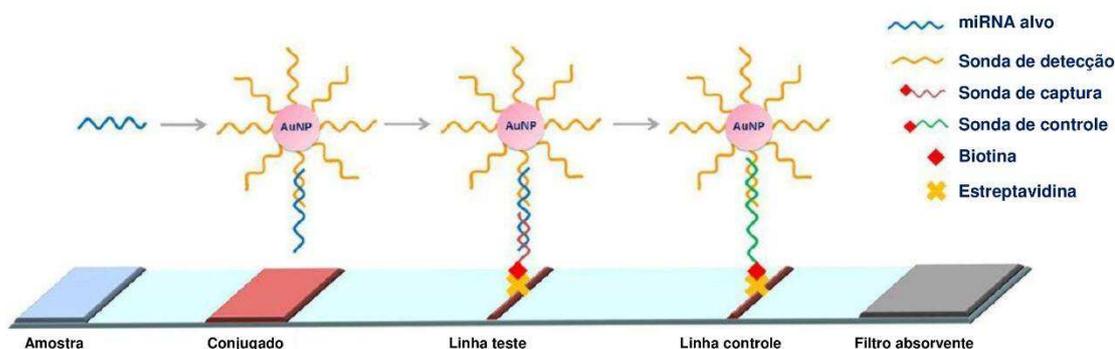
Fonte: Coutinho & Somoza (2019, p. 1813).

Figura 19 – Estratégia para detecção de miRNA através de um biossensor SPR com amplificação de signal



Fonte: Coutinho & Somoza (2019, p. 1815).

Figura 20 – Biossensor de Fluxo Lateral usando reações de hibridização DNA/miRNA/DNA-AuNPs



Fonte: Coutinho & Somoza (2019, p. 1816).

O dispositivo apresentado na Figura 18 foi proposto por Miao e co-autores (2016) para a detecção do miR-29a-3p, um micro RNA que é significativamente regulado para baixo em casos de influenza. Como mostra a figura, uma sonda de DNA (DNA de cadeia simples), que é complementar à fita do micro RNA a ser detectado, é imobilizada em um eletrodo de ouro. Quando o eletrodo é submerso em uma amostra com micro RNA, ocorre a formação de um heteroduplex de DNA/miRNA que, por sua vez, é reconhecido por uma nuclease específica para duplex (DSN) que hidroliza o DNA presente no heteroduplex e libera o micro RNA. Caso a amostra biológica não apresente o micro RNA, não ocorre a formação do heteroduplex e a sonda de DNA presente na superfície do eletrodo de ouro não é degradada. Assim, em uma segunda etapa, essa sonda de DNA não degradada interage com as nanopartículas de ouro (com tamanho médio igual a ≈ 13 nm) previamente funcionalizadas com uma fita de DNA complementar à sonda da primeira etapa. Devido à concentração de DNA carregado negativamente na superfície do eletrodo, um grande número de espécies eletroquímicas do tipo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (hexamina de rutênio) passarão a ficar localizadas na superfície do eletrodo, gerando um sinal elétrico elevado. No caso da amostra biológica contiver o miR-29a-3p, nenhuma dessas interações citadas na segunda etapa ocorrem e, por conseguinte, evidencia-se uma diminuição do sinal eletroquímico de resposta. Além disso, pode-se relacionar a diminuição do sinal com a concentração do micro RNA na amostra biológica, pois baixas concentrações de micro RNA correspondem a grandes quantidades de DNA-AuNPs imobilizadas na superfície do eletrodo e um sinal elevado.

Wang e co-autores (2016) estudaram a criação de um biossensor de SPR para detecção do miR-21, que funciona como um oncogene (genes relacionados ao aparecimento e crescimento de tumores) em vários tipos de tumores, como neuroblastoma, glioblastoma, câncer colorretal, de pulmão, de mama e de pâncreas. Os autores combinaram as propriedades de ressonância plasmônica do ouro metálico como um filme e o plasmon localizado das nanopartículas de ouro conforme mostra a Figura 19, aumentando a mudança do ângulo de ressonância quando o dispositivo entra em contato com o miRNA e, por isso, a sensibilidade do biossensor também aumenta. A sonda de DNA que é complementar ao micro RNA alvo de estudo foi imobilizada na superfície do ouro, previamente funcionalizada com MCH (tiol). Por sua vez, as nanopartículas de ouro com tamanho médio igual a 13 nm foram funcionalizados com oligonucleotídeos também complementares à outra ponta do

micro RNA, sendo capturados na superfície do ouro ao hibridizar com a sonda de DNA já existente ali. Além disso, mais duas sequências de DNA foram adicionadas à superfície das AuNPs funcionalizadas, produzindo um supersanduíche de DNA, com alto peso molecular, a fim de aumentar ainda mais o deslocamento de ressonância e o índice de refração do meio. O acoplamento eletrônico entre a onda de plasmon de superfície do filme de Au e o plasmon localizado das AuNPs aumenta a mudança do ângulo de ressonância, aumentando, assim, a sensibilidade do sensor SPR.

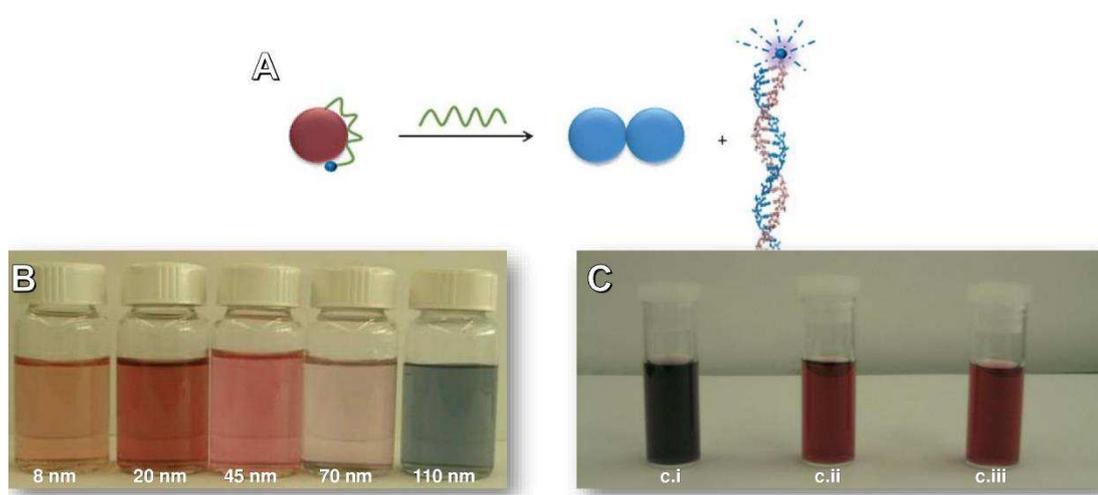
A Figura 20, por sua vez, apresenta um biossensor de fluxo lateral para detectar o miR-215, um micro RNA relacionado à proliferação, migração e progressão do ciclo celular em células de carcinoma de pulmão, proposto por Gao *et al.* (2014). Os dispositivos de fluxo lateral (comumente conhecidos como testes rápidos) são dispositivos microfluídicos projetados como os testes imunocromatográficos, compostos por: um filtro de amostra, cuja função é distribuir uniformemente e de forma controlada a amostra do paciente no substrato, fabricada, geralmente, de celulose ou sílica; o conjugado, o qual consiste na combinação de anticorpos ou antígenos com uma camada de nanopartículas de ouro coloidal; uma membrana de nitrocelulose contendo reagentes de captura na linha teste e na linha controle; e, por fim, o filtro de adsorção de celulose laminado sobre um substrato polimérico termoplástico, que é responsável por atrair a amostra em uma única direção, evitando o retorno do fluido ao filtro de amostra (COUTINHO & SOMOZA, 2019; JAPOLLA *et al.*, 2015).

O suporte do conjugado no biossensor proposto pelos autores é constituído por nanopartículas de ouro com ≈ 15 nm de tamanho médio, funcionalizadas e estabilizadas com grupos tióis que se ligam à sonda de DNA, a qual, por sua vez, é complementar à sequência do micro RNA que se pretende detectar. Nas linhas teste e controle também foram inseridas sondas de DNA complementares, respectivamente, à sequência do miRNA e à sonda de DNA presente nas AuNPs. Quando a amostra contendo o miRNA é aplicada na parte inicial do dispositivo (no filtro de amostra), ela migra através da membrana, encontra o conjugado e o miRNA hibridiza com a sonda de DNA presente na superfície das AuNPs. O conjugado resultante – miRNA/DNA-AuNPs continua a migrar pelo biossensor e passa pela linha teste, onde é capturado pela sonda de DNA de captura, devido à hibridização com a outra metade do miRNA. O acúmulo das nanopartículas de ouro na linha teste gera uma faixa vermelha sobre a linha, indicando a presença do miRNA na amostra e a intensidade dessa faixa é proporcional à quantidade de miRNA presente na mesma.

Por fim, o excesso de DNA-AuNPs é capturado pela sonda de DNA na linha controle, gerando uma segunda faixa com coloração vermelha. Caso a amostra biológica não contenha o micro RNA, observa-se a formação da faixa vermelha somente na linha controle.

A detecção de RNA viral facilitada pelo uso de nanopartículas de ouro também é reportado na literatura. Griffin *et al.* (2009) desenvolveram um procedimento para detecção do vírus causador da Hepatite tipo C (HCV) através de uma técnica caracterizada pela transferência de energia de superfície das nanopartículas, dependendo do seu tamanho e distância. No sistema proposto pelos autores, uma sonda de RNA complementar ao RNA viral é funcionalizada com pontos fluorescentes e adsorvida na superfície das nanopartículas de ouro em solução. Quando a amostra contendo o RNA viral é adicionada à solução, ocorre uma reação de hibridização entre as duas sondas de RNA, gerando um complexo que, por sua vez, se desprende da superfície das AuNPs e uma emissão fluorescente é detectada (NEGAHDARI *et al.*, 2019). A Figura 21 apresenta um esquema representativo da reação de hibridização e a liberação do duplex de RNA formado para o meio líquido (imagem superior – A), as soluções coloidais de AuNPs produzidas (imagem à esquerda – B) e o resultado das soluções quando a amostra biológica foi adicionada (imagem à direita – C).

Figura 21 – Biossensor para detecção do vírus HCV utilizando AuNPs



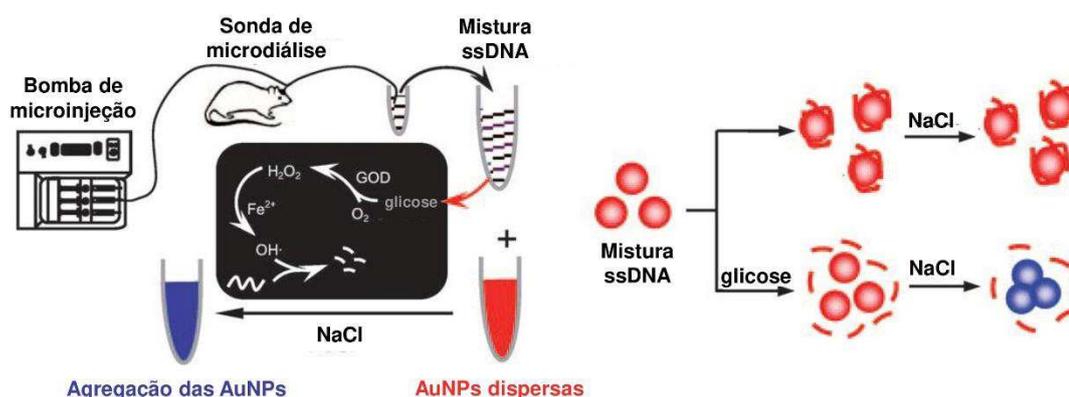
- A) Representação esquemática do processo de hibridização do RNA adsorvido na nanopartícula de ouro e sua consequente liberação.
- B) Registro fotográfico das soluções de nanopartículas de ouro sintetizadas com variação no tamanho médio das AuNPs, conforme descrito na imagem.
- C) Registro fotográfico evidenciando a mudança colorimétrica das soluções coloidais de nanopartículas de ouro após a adição de c.i) uma sonda de RNA exatamente complementar à sonda adsorvida na superfície das AuNPs, c.ii) uma sonda de RNA complementar com um par de bases incompatível, e c.iii) uma sonda de RNA não-complementar.

Fonte: Adaptado de Griffin *et al.* (2009, p. 344, 345 e 348).

A Figura 21-A revela, ainda, uma alteração na coloração da solução após a adição da amostra biológica contendo o RNA alvo, mudando de vermelho para azul, devido à conseqüente agregação das nanopartículas de ouro após a liberação do duplex de RNAs hibridizados.

Outro exemplo de biossensor colorimétrico utilizando AuNPs foi proposto por Jiang e colaboradores (2010) para a detecção de glicose em amostras biológicas extraídas do cérebro de ratos, uma vez que esse carboidrato representa a fonte de energia primária para o cérebro e desempenha papéis importantes na transmissão sináptica. Como mostra a Figura 22, a seguir, o sistema desenvolvido por Jiang *et al.* (2010) utilizou as mudanças colorimétricas das AuNPs induzidas por sua agregação e a técnica de Espectroscopia na região do UV-visível para caracterizar analiticamente os resultados obtidos.

Figura 22 – Representação esquemática do biossensor colorimétrico para detecção de glicose



Fonte: Adaptado de Jiang *et al.* (2010, p. 4800).

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas com Citrato de Sódio como estabilizante, produzindo uma solução coloidal com coloração vermelha, tamanho médio das AuNPs igual a 13 nm e que exibe uma banda de absorção em torno de 520 nm. Ao adicionar Cloreto de Sódio (NaCl), os autores observaram uma alteração na cor da solução que passou a ser azul, devido ao processo de agregação das nanopartículas, confirmado tecnicamente pelo novo pico de absorbância em 650 nm. Já a adição de uma sonda de DNA (ssDNA) e, posteriormente, do NaCl não apresentou alteração na coloração da solução, a qual manteve-se vermelha. Por fim, ao adicionar o ssDNA, a amostra biológica contendo glicose e NaCl, os autores

identificaram novamente a mudança de coloração da solução, confirmando a eficácia do sistema desenvolvido para detectar a presença de glicose na amostra.

2.1.4.2 Terapêutica

O transporte de agentes terapêuticos às células utilizando nanopartículas de ouro é um processo crítico no tratamento biomédico. Quando devidamente funcionalizadas, as AuNPs são capazes de penetrar na membrana celular ou, ainda, ficarem aprisionadas em corpos vesiculares; por isso, a aplicação de AuNPs para o tratamento e terapia de doenças apresenta outra abordagem potencial para o tratamento médico (YEH *et al.*, 2012).

As alternativas de tratamento clínico do câncer formam um grupo fechado, constituído por: restrições cirúrgicas, quimioterapia e irradiação que são algumas das táticas mais comuns usadas atualmente. No entanto, essas abordagens além de serem tóxicas e inespecíficas, podem causar uma série de efeitos colaterais ao paciente (MOHAMMED & AL-GAWHARI, 2020). Assim, justifica-se a busca por tratamentos alternativos aos já existentes e consolidados até o momento.

Kennedy e co-autores (2011) estudaram o transporte de nanopartículas de ouro abrigadas em células T humanas ativas (as células T ou linfócitos T são parte essencial do sistema imunológico que determinam a especificidade da resposta imune a antígenos no corpo). Foi evidenciado que as AuNPs não apresentaram impactos negativos à viabilidade, proliferação ou à função imunológica das células em que foram abrigadas; além disso, as células T foram capazes de transportar as AuNPs até o local com tumor em testes realizados *in vivo*. As nanopartículas obtidas por Kennedy *et al.* (2011) foram sintetizadas através do processo de redução química dos íons Au³⁺ presentes no Ácido Cloroáurico em Au⁰, mediante injeção de Monóxido de Carbono gasoso, e apresentaram tamanho médio entre 40 e 45 nm. A internalização das AuNPs nas células T foi realizada entre 1 a 24 horas de incubação e os autores obtiveram a máxima internalização igual a 14.900 ± 2.400 AuNPs por célula T. O método proposto neste estudo alterou a biodistribuição do ouro comparado ao método de injeção direta de AuNPs, além de demonstrar que a seleção de um veículo celular adequado pode ditar a biodistribuição das AuNPs.

Perrault *et al.* (2009), por sua vez, examinaram o efeito de nanopartículas de ouro, com tamanho médio variando de 10 a 100 nm, e a sua funcionalização química

com Polietilenoglicol (PEG) para o direcionamento passivo de tumores *in vivo*. Os autores identificaram que a diferença no tamanho médio das nanopartículas influencia sua permeação no tumor. Se, por exemplo, o objetivo é melhorar a sensibilidade do diagnóstico maximizando a quantidade do agente de contraste administrado no tumor, mas a localização dentro da massa tumoral não é importante, um tamanho de partícula moderado (como 20 – 30 nm) protegidas com uma camada espessa de PEG (com 5 ou 10 kDa), resultando em um diâmetro final entre 60 e 100 nm é suficiente. Já a administração medicamentosa dentro da área tumoral é mais complexa, pois, segundo os autores citados, partículas maiores (em torno de 100 nm) conseguem atravessar o espaço perivascular, mas apresentam pouca permeação no tumor; enquanto as partículas menores (em torno de 10 nm) conseguem atingir as células malignas, mas sua capacidade de transporte é restringida pelo seu tamanho.

2.1.4.3 Imagem

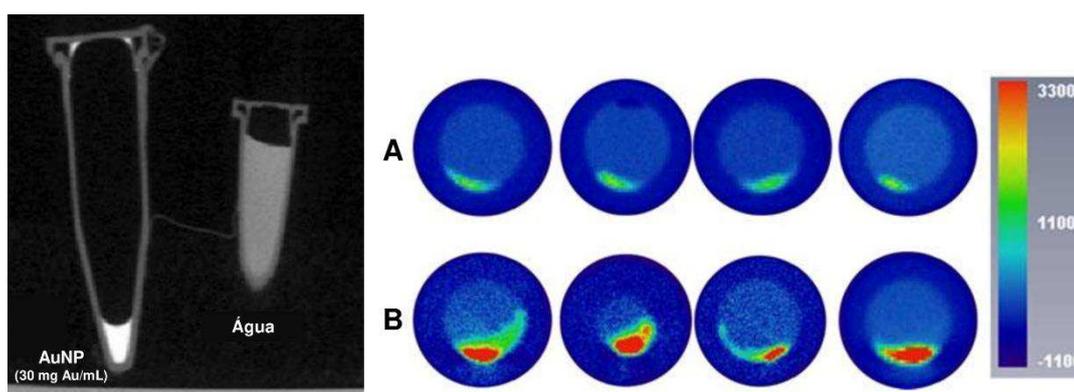
A aplicação das nanopartículas de ouro em técnicas de imagem está presente em muitos estudos encontrados na literatura que investigam a contribuição das AuNPs em aperfeiçoar o resultado obtido pela técnica, intensificando a nitidez da imagem e servindo, muitas vezes, como agente de contraste alternativo ao meio de contraste iodado. As técnicas de imagem estudadas incluem: tomografia computadorizada (CT, sigla do inglês *computed tomography*) (WANG *et al.*, 2011; AYDOGAN *et al.*, 2010), espalhamento de luz em campo escuro (HUANG *et al.*, 2010), tomografia de coerência óptica (OCT, sigla do inglês *optical coherence tomography*) (KIM *et al.*, 2009; ZAGAYNOVA *et al.*, 2008), espectroscopia Raman (ZAVALETA *et al.*, 2009; KEREN *et al.*, 2008), entre outras técnicas (YEH *et al.*, 2012).

No trabalho proposto por Aydogan *et al.* (2010), por exemplo, as nanopartículas de ouro, sintetizadas pelo método de redução química com citrato, foram funcionalizadas com o tiol Ácido Mercaptosuccínico ($C_4H_6O_4S$), cujo carbono na posição 2 sofreu uma reação de condensação com 2-amino-desoxiglicose, produzindo um “análogo de glicose”, 2-desoxi-D-glicose (2-DG). O produto final, nanopartículas de ouro conjugadas com 2-desoxi-D-glicose ou, como nomeado pelos autores, AuNP-DG foi aplicado como agente de contraste para a tomográfica computadorizada (CT) de uma célula tumoral humana, por meio de experimentos *in vitro*. As células tumorais foram incubadas com amostras de AuNP-DG e com amostras de ouro coloidal não

funcionalizado, possibilitando verificar um aumento significativo do contraste nas amostras de células incubadas com AuNP-DG em relação às amostras de células incubadas apenas com AuNPs não conjugadas.

A Figura 23 apresenta dois resultados do estudo de Aydogan e co-autores (2010). Na imagem da esquerda, os autores analisaram amostras de água e da solução coloidal de AuNP com concentração igual a 30 mg Au/mL, revelando uma diferença visual entre as amostras, sendo que a imagem da solução coloidal é mais nítida do que a imagem da água. A imagem da direita, por sua vez, apresenta as amostras celulares incubadas apenas com AuNP (linha A) e com as nanopartículas de ouro conjugadas com 2-DG (linha B); pode-se evidenciar um aumento de contraste aparente nas amostras da linha B (os anéis azuis escuros são as paredes dos frascos de plástico) confirmando as hipóteses do estudo.

Figura 23 – Tomografia computadorizada de amostras contendo AuNPs conjugadas com 2-desoxi-D-glicose



Fonte: Adaptado de Aydogan *et al.* (2010, p. 465 e 466).

A descoberta de Aydogan *et al.* (2010) e dos demais autores citados no início dessa seção contribuiu para a inovação dos agentes de contraste utilizados em técnicas de imagem que limitam-se, atualmente, aos compostos iodados, os quais apresentam uma série de desvantagens, como: alta osmolalidade (medida da concentração de soluto – sódio, potássio, cloreto, glicose e ureia – em uma solução – amostra de sangue ou urina) e meia-vida sanguínea curta (inferior a 10 min), obrigando a realização imediata do teste após a administração do agente.

2.1.4.4. Atividade anti-bacteriana

A inibição do crescimento bacteriano consiste em outra aplicação das nanopartículas de ouro, conforme estudo desenvolvido por Wongyai e colaboradores (2020). Os autores realizaram a síntese de nanopartículas de ouro através de uma rota “verde” como é caracterizada na literatura, uma vez que se utilizou extrato de plantas como agente redutor dos íons de ouro, ao invés de utilizar Citrato ou Borohidreto de sódio. No caso do trabalho citado, foi utilizado extrato de *Cryptolepis buchanani* Roem. and Schutt (*C. buchanani*), uma planta aplicada em tratamentos médicos populares no sudeste da Ásia, pois apresenta propriedades antibactericidas, anti-inflamatórias e analgésicas, além de produzir efeitos condoprotetores (medicações indicadas em casos de artrose) e hepatoprotetores (proteção das células hepáticas) (VINAYAKA *et al.*, 2010). O extrato de *C. buchanani* é constituído por compostos fenólicos bioativos que participam das reações redox, produzindo quinonas – compostos orgânicos formados por dois grupamentos carbonilas ligados a um anel insaturado de seis átomos de carbono (SOUSA *et al.*, 2016) –, posteriormente liberando elétrons capazes de reduzir os íons de ouro (Au^{3+}) para ouro metálico (Au^0), além de estabilizar as AuNPs em solução.

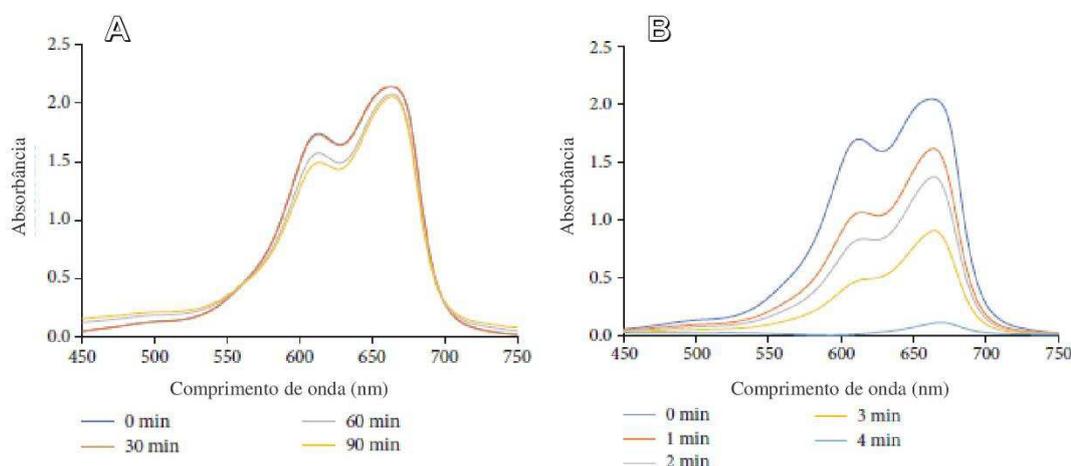
Wongyai *et al.* (2020) avaliaram a propriedade anti-bacteriana das AuNPs sintetizadas com extrato de *C. buchanani* (com diâmetro médio igual a 11 nm) contra três espécies de bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Acinetobacter baumannii*; sua capacidade inibidora do crescimento microbiano foi caracterizada pelos parâmetros MIC – “mínima concentração inibitória” (traduzida do inglês, *minimal inhibitory concentration*), definida pela menor concentração de AuNP que inibe visivelmente o crescimento bacteriano, e MBC – “mínima concentração bactericida” (traduzida do inglês, *minimal bactericidal concentration*) que consiste na menor concentração de AuNP capaz de inibir o crescimento de $\geq 99,99\%$ das cepas bacterianas. Os valores de MIC e MBC para cada um dos exemplares de cepas bacterianas avaliados foram, respectivamente, 0,209 $\mu\text{g/mL}$ e 0,418 $\mu\text{g/mL}$ para as espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, e 0,209 $\mu\text{g/mL}$ e 0,835 $\mu\text{g/mL}$ para *Acinetobacter baumannii*. Os autores concluíram, por fim, que as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) apresentaram sensibilidade superior à bactéria Gram-negativa (*Acinetobacter baumannii*), possivelmente, devido à presença de cápsulas

nas paredes celulares desta última espécie citada, que é mais complexa e, portanto, dificulta/impede a fixação das AuNPs (WONGYAI *et al.*, 2020).

2.1.4.5. Catálise

O estudo desenvolvido por Wongyai e co-autores (2020) descrito na seção anterior (2.1.4.4. Atividade anti-bacteriana) teve como objetivo avaliar, também, a atividade catalítica das nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato da planta *C. buchmanii*. Para tanto, os autores analisaram a reação de redução do corante azul de metileno (MB) pelo Borohidreto de Sódio (NaBH_4) catalisada pelas AuNPs, conduzida a temperatura ambiente e monitorada através da análise de Espectroscopia na região do UV-visível. Conforme apresentado na Figura 24-A, é possível verificar que a redução do corante azul de metileno conduzida apenas com NaBH_4 inicia-se somente após 60 min de contato entre os reagentes e, de acordo com os autores, nenhuma alteração nítida na coloração da solução foi observada. A Figura 24-B, por sua vez, revela a completa degradação (degradação em 95%) do corante passados apenas 4 min de reação, devido à presença das nanopartículas de ouro que agem como catalisadores da reação e, segundo os autores, observou-se uma alteração gradual da coloração do corante ao longo do tempo, passando de azul escuro para azul claro até que a solução tornou-se totalmente incolor, em decorrência da redução do azul de metileno a azul de leucometileno (CHEVAL *et al.*, 2012).

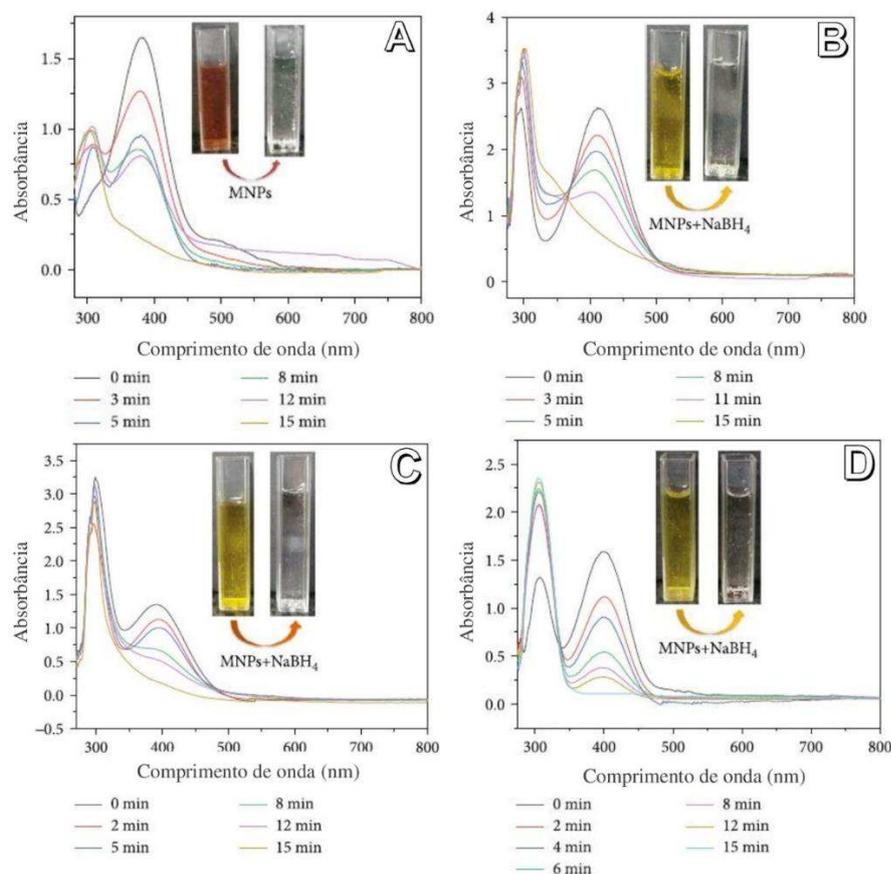
Figura 24 – Espectros de UV-visível da redução do corante azul de metileno pelo Borohidreto de sódio na ausência (a) e na presença (b) de AuNPs



Fonte: Wongyai *et al.* (2020, p. 8).

Doan *et al.* (2020) também analisaram a propriedade catalítica das nanopartículas de ouro, sintetizadas por uma abordagem “verde” usando extrato aquoso de raízes da planta *Codonopsis pilosula* como agente redutor e estabilizador. A *Codonopsis pilosula* é uma erva perene encontrada em montanhas do Vietnã, China e Índia, utilizada como medicamento tradicional para o tratamento de muitas doenças (DOAN *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2015). As AuNPs biosintetizadas com tamanho médio igual a $20 \pm 3,2$ nm foram aplicadas como catalisadoras da degradação de compostos nitroaromáticos, considerados poluentes perigosos ao meio ambiente e descarregados em efluentes industriais de refinarias, produtoras de pesticidas e de fertilizantes (HASSAN *et al.*, 2017), são eles: 1,4-dinitrobenzeno (1,4-DNB), 2-nitrofenol (2-NP), 3-nitrofenol (3-NP) e 4-nitrofenol (4-NP). A reação de degradação dos compostos orgânicos foi conduzida a temperatura ambiente, na presença de um agente redutor forte, o Borohidreto de Sódio, e das nanopartículas de ouro, e foi monitorada pela análise de Espectroscopia na região do UV-visível. A Figura 25, a seguir, resume os resultados obtidos por Doan *et al.* (2020).

Figura 25 – Degradação de compostos nitroaromáticos pelo Borohidreto de sódio e catalisada por AuNPs: (a) 1,4-DNB; (b) 2-NP; (c) 3-NP; (d) 4-NP



Fonte: Doan *et al.* (2020, p. 12-15).

A Figura 25-A revela um decréscimo gradual da banda de máxima absorvância em 380 nm e um aumento simultâneo do pico em 300 nm, demonstrando a decomposição do composto 1,4-DNB e a formação de 1,4-diaminobenzeno. Comportamento semelhante é observado na Figura 25-B, com a diminuição da absorvância em 410 nm e o conseqüente aumento em 290 nm, sugerindo que o 2-NP foi reduzido a 2-aminofenol. A decomposição do composto 3-NP (diminuição da banda de máxima absorvância em 390 nm) acompanhada pela produção de 3-aminofenol (surgimento da banda em 300 nm) é apresentada na Figura 25-C. Por fim, a Figura 25-D mostra a redução do pico de absorvância no comprimento de onda 400 nm, característico da coloração amarelo escuro da solução de 4-NP, e o aumento do pico em 300 nm relacionado à solução incolor de 4-aminofenol. Os tempos para completa degradação dos compostos permaneceram em torno de 15 minutos para a redução do 1,4-DNB e 2-NP, 13 minutos para o composto 3-NP e 14 minutos para o 4-NP.

Através da Figura 25, é possível observar que as nanopartículas de ouro sintetizadas pelo extrato da planta *Codonopsis pilosula* desempenharam o papel de catalisadoras no processo de degradação dos compostos nitroaromáticos avaliados no trabalho realizado por Doan e co-autores (2020), uma vez que em todas as análises, as soluções tornaram-se incolores.

3 METODOLOGIA

A metodologia do presente trabalho pode ser dividida em três etapas: 1^a) estudo preliminar; 2^a) estudo principal; 3^a) funcionalização das nanopartículas de ouro.

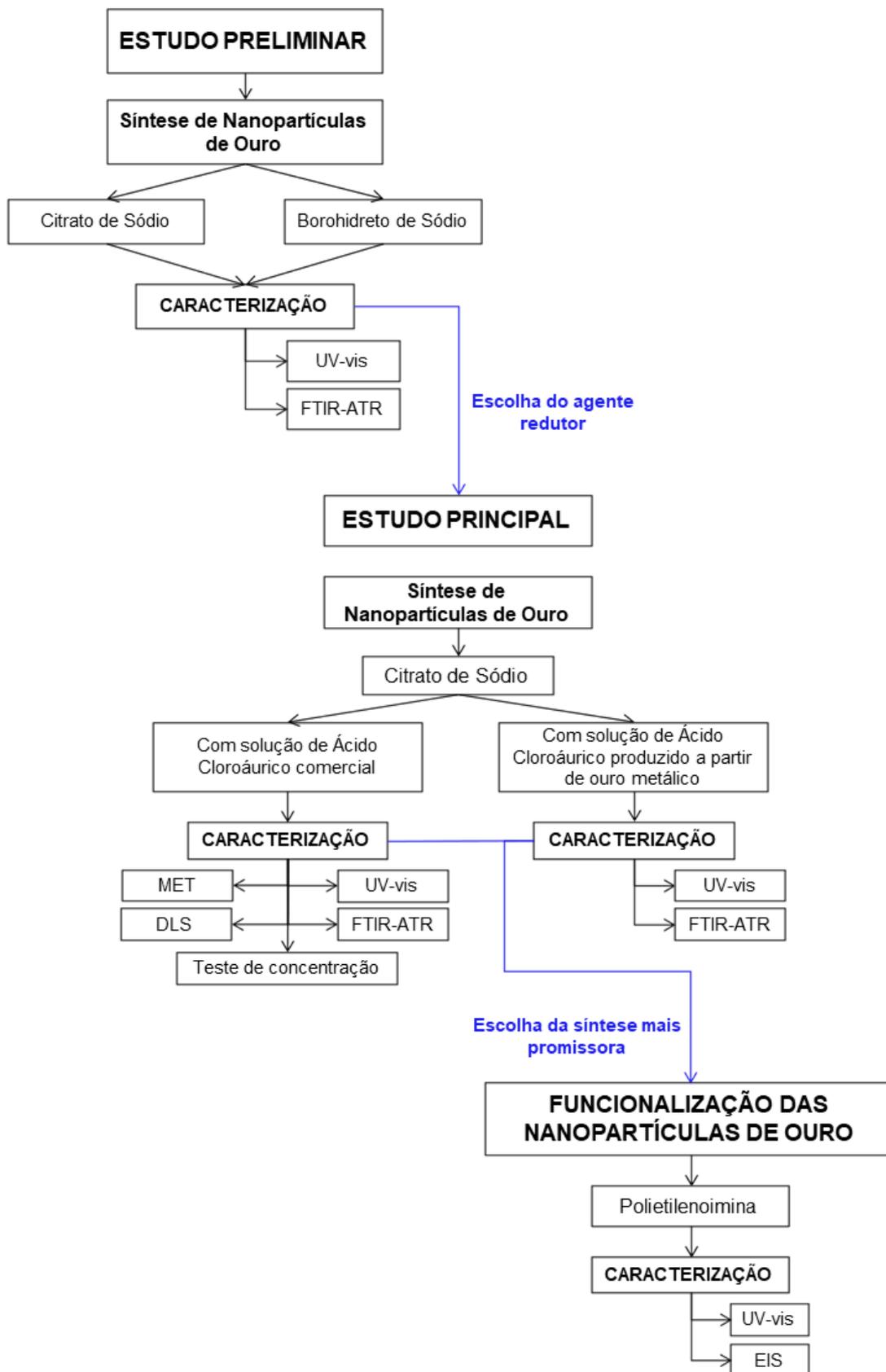
Como estudo preliminar, realizou-se uma busca na literatura por diferentes metodologias para a síntese de nanopartículas de ouro, cujos resultados encontrados foram descritos no capítulo 2.1.2 (Síntese das Nanopartículas de Ouro). A partir desta revisão bibliográfica, foram escolhidos dois métodos de síntese de nanopartículas de ouro baseados na redução química dos íons Au^{3+} em solução para Au^0 (ouro metálico) através dos seguintes agentes redutores: o Citrato de Sódio, seguindo a rota experimental proposta por Turkevich *et al.* (1951), e o Borohidreto de Sódio conforme o procedimento descrito por Lin *et al.* (2013) que utilizou o polímero Polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizante da reação.

Após a interpretação dos resultados obtidos com o estudo preliminar e a respectiva escolha do agente redutor, desenvolveu-se o estudo principal, no qual foi avaliada a natureza do agente precursor para a síntese das nanopartículas de ouro: Ácido Cloroáurico comercial baseado no trabalho desenvolvido por Da Silva (2016) e Ácido Cloroáurico produzido *in situ* durante a reação a partir de amostras de ouro metálico seguindo o método de reciclagem do ouro proposto por Coura *et al.* (2018). Além disso, avaliou-se a influência de algumas variações dos parâmetros da síntese nas características das nanopartículas produzidas, como a velocidade de agitação, a velocidade ou vazão de adição do agente redutor e a razão molar entre os agentes precursor e redutor presentes na reação.

Por fim, mediante os resultados encontrados no estudo principal, foi selecionada a síntese mais promissora em termos de tamanho da partícula, estabilidade e grau de dispersão no meio líquido. A síntese escolhida passou pelo processo de funcionalização das nanopartículas de ouro utilizando o polímero Polietilenoimina, seguindo o trabalho de Ferreira e co-autores (2017). Esta etapa do trabalho visa obter uma solução coloidal de nanopartículas de ouro funcionalizadas que poderão ser aplicadas na construção de dispositivos para diagnóstico de doenças, uma vez que possibilitarão a ligação do bioreceptor em sua superfície.

A Figura 26, a seguir, apresenta um fluxograma com todas as etapas experimentais executadas no presente trabalho, bem como evidencia as técnicas realizadas para caracterização das amostras sintetizadas.

Figura 26 – Fluxograma das etapas experimentais realizadas



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.1 REAGENTES

A lista de reagentes utilizados neste trabalho é descrita na sequência:

- Ácido Clorídrico (HCl) P.A. 37%, marca Química Moderna;
- Ácido Cloroáurico (HAuCl₄.3H₂O), marca Synth;
- Ácido Nítrico (HNO₃) P.A. 65%, marca Química Moderna;
- Água ultrapura (disponível no laboratório);
- Borohidreto de Sódio (NaBH₄), marca Sigma-Aldrich;
- Citrato de Sódio anidro (Na₃C₆H₅O₇), marca VETEC;
- Polietilenoimina (PEI, 60.000 g/mol, solução aquosa 50%), marca Acros Organics;
- Polivinilpirrolidona (PVP, 10.000 g/mol), marca Sigma-Aldrich.

3.2 EQUIPAMENTOS

A lista de equipamentos utilizados neste trabalho é descrita na sequência:

- Agitador magnético com aquecimento, marca IKA e modelo C-MAG HS 7 control, com sensor de temperatura de platina Pt1000 (localizado no Laboratório de Eletrônica Flexível – itt Chip);
- Balança semi-analítica marca SARTORIUS e modelo ED224S (localizado no Laboratório de Eletrônica Flexível – itt Chip);
- Banho ultrassônico marca UNIQUE e modelo USC-5000A, com frequência de 40 kHz, potência igual a 264 W e 21 L de volume (localizado no Laboratório de Nutracêuticos – itt Nutrifor);
- Bomba de seringa marca CHEMYX, com tubos de diâmetro externo igual a 1/16” e diâmetro interno igual a 1/32”, marca DARWIN microfluidics (localizado no Laboratório de Eletrônica Flexível – itt Chip);
- Centrífuga marca Eppendorf e modelo 5430 R (localizado no itt Nutrifor);
- Estufa marca ETHIK Technology e modelo 440-2D 47 L, com bomba a vácuo marca ECO 740 (localizado no Laboratório de Eletrônica Flexível – itt Chip).

3.3 ESTUDO PRELIMINAR

Nessa etapa, avaliou-se a síntese das nanopartículas de ouro através de dois procedimentos experimentais, ambos baseados no método de redução química dos íons de ouro em ouro metálico, utilizando dois agentes redutores diferentes: o Citrato de Sódio e o Borohidreto de Sódio.

3.3.1 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio

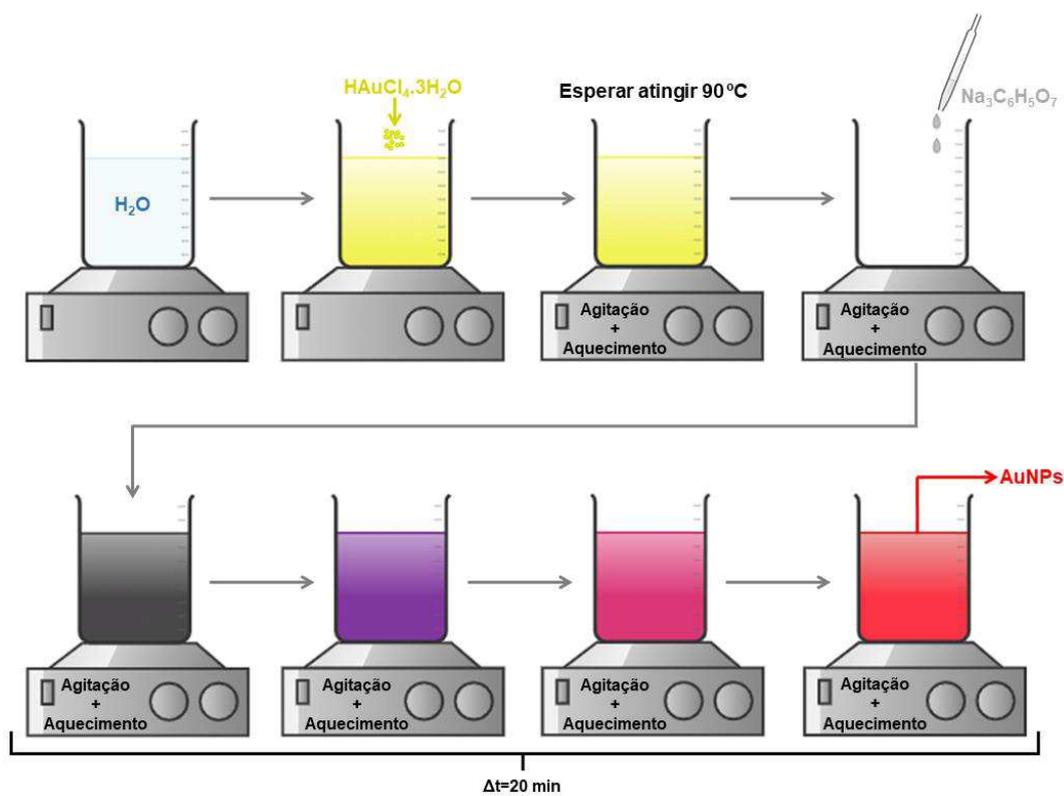
O procedimento experimental descrito nessa seção foi baseado na metodologia executada por Da Silva (2016) e criada em 1951 por Turkevich e colaboradores que consiste na formação de nanopartículas de ouro através da redução química de íons de ouro em ouro metálico utilizando Citrato de Sódio, o qual atua tanto como agente redutor quanto como estabilizante das AuNPs, impedindo a sua aglomeração.

Inicialmente, todas as vidrarias foram lavadas com água-régia, preparada pela adição de 10 mL de Ácido Nítrico (65%) em 40 mL de Ácido Clorídrico (37%), para a limpeza completa dos materiais e a eliminação de possíveis contaminações que possam interferir na formação das nanopartículas (DE SOUZA *et al.*, 2019).

Em 95 mL de água ultrapura, foi adicionado aproximadamente 15 mg de Ácido Cloroáurico tri-hidratado, sob constante agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 90 °C. Simultaneamente, uma solução padrão de Citrato de Sódio com concentração igual a 10 mg/mL foi preparada dissolvendo 1 g de Citrato de Sódio anidro a 100 mL de água ultrapura. Adicionou-se 5 mL da solução padrão de Citrato de Sódio mencionada, gotejando-a na solução de Ácido Cloroáurico com auxílio de uma pipeta graduada (procurou-se manter a velocidade de gotejamento igual em todas as sínteses, aproximadamente 1 gota/s). O sistema permaneceu sob aquecimento e agitação constantes por mais 20 minutos. Por fim, a solução foi mantida em repouso, à temperatura ambiente, para seu resfriamento gradual e conservada em geladeira (± 5 °C).

A Figura 27 resume o procedimento experimental descrito através de uma representação esquemática do processo.

Figura 27 – Representação esquemática da síntese de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Foram sintetizadas seis amostras, nas quais variou-se a velocidade de agitação do sistema, conforme mostra a Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Formulação das sínteses preliminares via Citrato de Sódio

Amostra	$m_{HAuCl_4 \cdot 3H_2O}$	Solução de $Na_3C_6H_5O_7$		Relação molar Ác. Cloroáurico:Citrato	Agitação	Adição do redutor*
		C	V			
Síntese 1	15,2 mg	10 mg/mL	5 mL	1:5	250 rpm	1 gota/s
Síntese 2	16,7 mg				500 rpm	
Síntese 3	15,0 mg				750 rpm	
Síntese 4	15,9 mg				1000 rpm	
Síntese 5	14,6 mg				1250 rpm	
Síntese 6	14,5 mg				1500 rpm	

C → Concentração e V → Volume.

* Essa velocidade foi determinada experimentalmente, sendo passível de variações entre as sínteses.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Decidiu-se avaliar a agitação do sistema na menor velocidade do equipamento (250 rpm) até a maior velocidade (1500 rpm), além de analisar velocidades intermediárias entre os pontos mínimo e máximo, com intervalo fixo de 250 rpm entre cada velocidade. Na literatura, este parâmetro não é descrito e quantificado, uma vez que os autores informam apenas que a solução foi “vagorosamente agitada”. Assim, o estudo sobre a velocidade de agitação mais adequada para a síntese das AuNPs pode ser uma característica inovadora deste trabalho.

3.3.2 Síntese de AuNPs via redução química com Borohidreto de Sódio

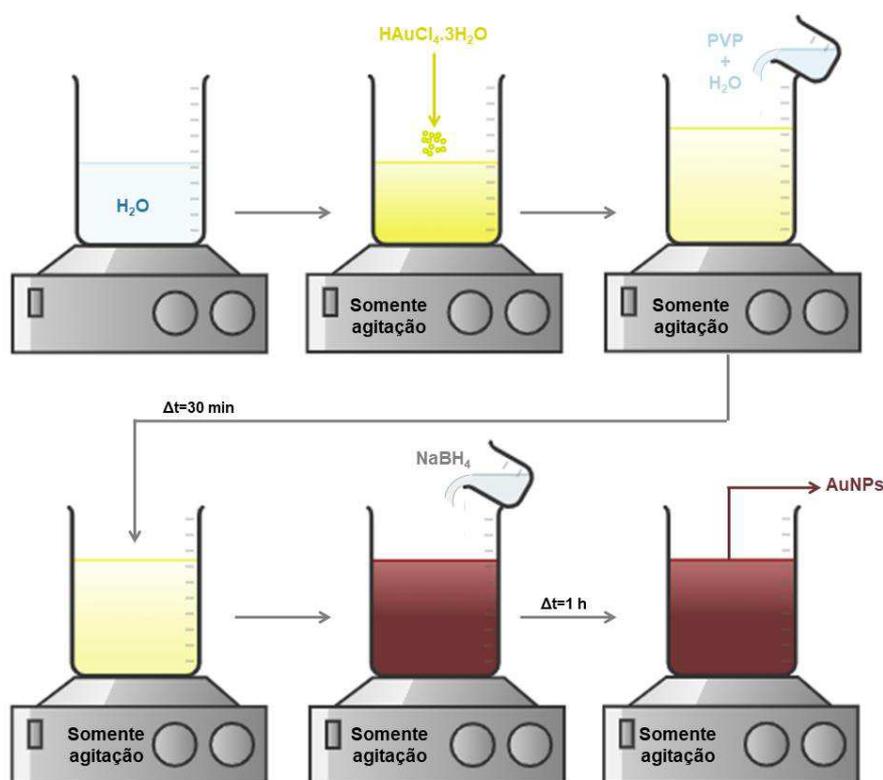
O procedimento experimental aqui detalhado foi baseado na metodologia criada por Liu *et al.* (2009), que consiste na síntese de nanopartículas de ouro por redução química via Borohidreto de Sódio utilizando Polivinilpirrolidona como reagente estabilizante (Lin *et al.*, 2013).

Todas as vidrarias foram inicialmente lavadas com água-régia, preparada conforme descrito na metodologia anterior (seção 3.3.1).

Em um béquer de 600 mL, adicionou-se aproximadamente 25 mg de Ácido Cloroáurico tri-hidratado e 60 mL de água ultrapura, sob constante agitação e sem aquecimento. Posteriormente, 10 mg de PVP foi adicionado aos poucos na solução, acompanhado de mais 35 mL de água ultrapura e o sistema foi mantido em agitação durante 30 min. Em seguida, adicionou-se 5 mL de uma solução de Borohidreto de Sódio em água ultrapura, contendo 1 mmol do agente redutor ($\approx 37,83$ mg, $MM_{NaBH_4} = 37,83 \text{ g/mol}$). O sistema foi mantido em agitação por mais 1 hora. Por fim, a solução foi conservada em geladeira (± 5 °C).

A Figura 28 resume o procedimento experimental descrito através de uma representação esquemática do processo.

Figura 28 – Representação esquemática da síntese de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Foram sintetizadas duas amostras, nas quais variou-se a velocidade de agitação do sistema, conforme mostra a Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 – Formulação das sínteses preliminares via Borohidreto de Sódio

Amostra	Massa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Massa de PVP	Massa de NaBH_4	Agitação	Adição do redutor*
Síntese 7	26 mg	14,5 mg	37,8 mg	750 rpm	-
Síntese 8	26,3 mg	10,9 mg	37,9 mg	1500 rpm	-

* O agente redutor foi adicionado de uma só vez (vertido) no sistema.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A partir da varredura realizada anteriormente, na síntese de AuNPs com Citrato de Sódio, observou-se que velocidades intermediárias não apresentavam diferenças na solução obtida apenas com uma variação de 250 rpm entre as sínteses. Assim, decidiu-se avaliar na síntese com Borohidreto apenas duas velocidades de agitação: 750 e 1500 rpm.

As soluções de nanopartículas de ouro sintetizadas nessa primeira etapa do trabalho foram avaliadas através das análises de Espectroscopia Ultravioleta-visível e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, técnicas utilizadas para a caracterização de propriedades ópticas das nanopartículas de ouro formadas e da composição química da solução coloidal produzida, cujos detalhes sobre o equipamento e os parâmetros de análise utilizados estão descritos nos itens 3.6.1 e 3.6.3 respectivamente.

3.4 ESTUDO PRINCIPAL

A partir do estudo preliminar, a síntese de nanopartículas de ouro pelo método de redução química via Citrato de Sódio apresentou melhores resultados do que o procedimento experimental com Borohidreto de Sódio, no que diz respeito ao tempo de execução da síntese, à eficácia do processo, à natureza química e função dos agentes redutores (a discussão desses resultados encontra-se no capítulo 4.2). Assim, no estudo principal foram realizadas novas formulações de sínteses de AuNPs utilizando apenas Citrato de Sódio como agente redutor e avaliou-se nessas formulações a natureza do Ácido Cloroáurico (agente precursor) utilizado na síntese: Ácido Cloroáurico comercial e Ácido Cloroáurico produzido *in situ* durante a reação a partir de ouro metálico.

3.4.1 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico comercial

O procedimento experimental de síntese de nanopartículas de ouro utilizando Citrato de Sódio como agente redutor e Ácido Cloroáurico como agente precursor foi aperfeiçoado com algumas modificações, detalhadas a seguir:

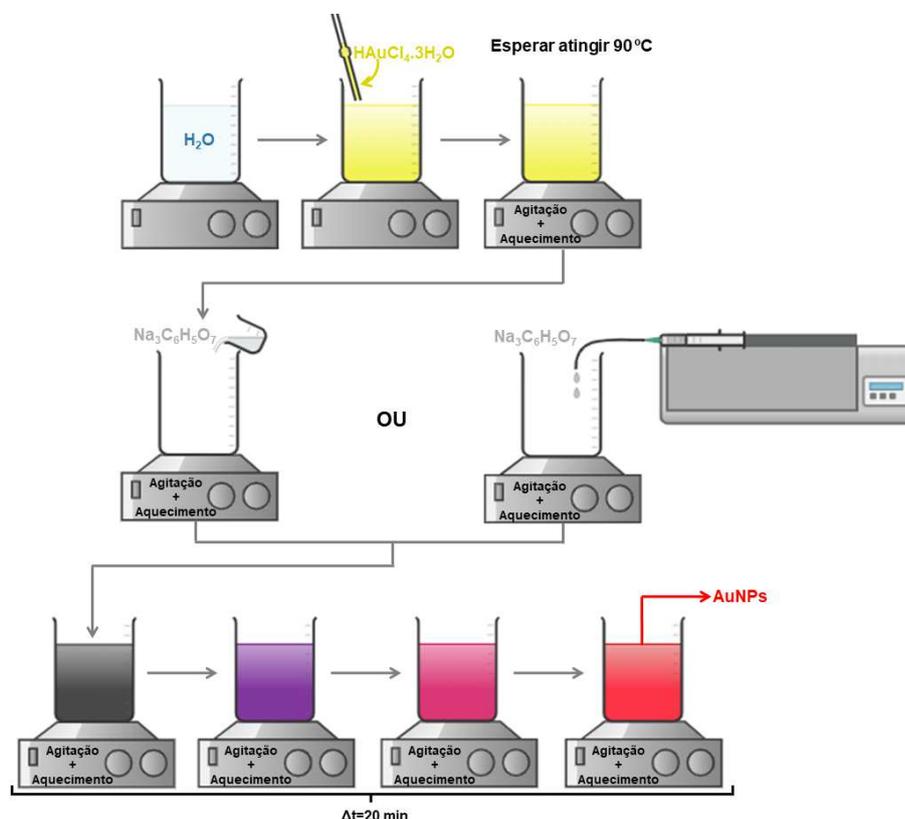
- Optou-se por produzir uma única solução de Ácido Cloroáurico, com concentração igual a 3 mg/mL ao invés de pesar a quantidade necessária do reagente para cada síntese, assim, eliminaram-se as diferenças de massa do precursor do ouro apresentadas na Tabela 2;
- Alterou-se a velocidade de adição da solução de Citrato de Sódio, uma vez que nessa etapa pode-se utilizar uma bomba de seringa cuja velocidade de gotejamento é medida de forma precisa e correta;

- Foram produzidas três soluções padrão de Citrato de Sódio em água ultrapura com as seguintes concentrações: ≈ 10 mg/mL; $\approx 20,65$ mg/mL e $\approx 41,29$ mg/mL para as relações (em base molar) entre o Ácido Cloroáurico e o Citrato de Sódio ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}:\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) iguais a 1:5, 1:10 e 1:20 respectivamente.

Portanto, nessa etapa do trabalho, a síntese das nanopartículas de ouro foi realizada da seguinte forma: em 90 mL de água ultrapura, foi adicionado 5 mL da solução de Ácido Cloroáurico (3 mg/mL), sob constante agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 90 °C. Posteriormente, foi adicionado 5 mL da solução de Citrato de Sódio previamente preparada (avaliaram-se diferentes velocidades de adição indicadas na Tabela 4 apresentada na sequência). O sistema permaneceu sob aquecimento e agitação constantes por mais 20 minutos. Por fim, a solução foi mantida em repouso, à temperatura ambiente, para seu resfriamento gradual e conservada em geladeira (± 5 °C).

A Figura 29 resume o procedimento experimental descrito através de uma representação esquemática da síntese realizada.

Figura 29 – Representação esquemática da síntese de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

As Figuras 30 e 31 apresentam, respectivamente, a solução de Ácido Cloroáurico preparada e que foi utilizada como precursora em todas as sínteses, e a bomba de seringa utilizada para adição do agente redutor nas sínteses 14 e 15.

Figura 30 – Solução mãe de Ácido Cloroáurico (3 mg/mL)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 31 – Bomba de seringa utilizada para adição controlada do agente redutor nas sínteses 14 e 15



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

No estudo principal, foram avaliadas três velocidades de agitação durante a reação, três concentrações e três velocidades de gotejamento da solução de Citrato de Sódio, e três relações entre os reagentes precursor e redutor, conforme mostra a Tabela 4 a seguir. Cabe destacar que, para fins de análise e comparação entre os

resultados, um dos parâmetros citados variou enquanto os demais foram mantidos iguais entre as sínteses.

Tabela 4 – Formulação das sínteses principais via Citrato de Sódio

Amostra	Solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$		Solução de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		Relação molar Ác. Cloroáurico:Citrato	Agitação	Adição do redutor
	<i>C</i>	<i>V</i>	<i>C</i>	<i>V</i>			
Síntese 9	3 mg/mL	5 mL	10 mg/mL	5 mL	1:5	250 rpm	*
Síntese 10			10 mg/mL		1:5	750 rpm	*
Síntese 11			10 mg/mL		1:5	1500 rpm	*
Síntese 12			20,65 mg/mL		1:10	1500 rpm	*
Síntese 13			41,29 mg/mL		1:20	1500 rpm	*
Síntese 14			41,29 mg/mL		1:20	1500 rpm	1 mL/min
Síntese 15			41,29 mg/mL		1:20	1500 rpm	5 mL/min

C → Concentração e *V* → Volume.

* Nas sínteses 9 a 13, o agente redutor foi adicionado de uma só vez (vertido) no sistema.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

As nanopartículas de ouro sintetizadas na segunda etapa do trabalho foram caracterizadas através das análises de Espectroscopia ultravioleta-visível (procedimento descrito nos itens 3.6.1 e 3.6.2), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (item 3.6.3), Espalhamento de Luz Dinâmico (item 3.6.4) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (item 3.6.5). Além disso, realizou-se uma avaliação da concentração de nanopartículas em cada uma das soluções produzidas (conforme procedimento detalhado no item 3.6.6).

3.4.2 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico produzido a partir de ouro metálico

A partir dos resultados obtidos após a síntese descrita anteriormente, em que utilizou-se o Ácido Cloroáurico comercial como precursor dos íons de Au^{3+} , foram determinados os parâmetros mais adequados para a síntese das nanopartículas de ouro, no que diz respeito à velocidade de agitação do sistema durante a síntese e ao método de adição do agente redutor. Então, avaliou-se um terceiro método de síntese de nanopartículas de ouro que utiliza como precursor uma amostra de ouro metálico em substituição ao reagente químico Ácido Cloroáurico, e Citrato de Sódio como

agente redutor. Esse método pode ser encontrado na literatura como reciclagem de ouro e vem sendo estudado como forma de substituição à metodologia tradicional, uma vez que o Ácido Cloroáurico trata-se de um insumo com elevado valor comercial (R\$1.552,31 segundo consulta realizada no site da Synth.com em 07/09/2021), podendo, assim, aumentar os custos laboratoriais, especialmente quando se pretende produzir grandes quantidades de nanopartículas de ouro (KING *et al.*, 2015).

O procedimento experimental para a síntese das AuNPs pelo método de reciclagem do ouro descrito nessa seção foi baseado nos trabalhos de Coura *et al.* (2018), Da Silva (2016) e Turkevich *et al.* (1951). Inicialmente, é preciso produzir o Ácido Cloroáurico a partir de uma amostra de ouro metálico, através da dissolução de da amostra de ouro metálico com água-régia preparada pela mistura de Ácido Nítrico 65% e Ácido Clorídrico 37% na proporção volumétrica 1:4. A solução foi aquecida a 90 °C até ocorrida a dissolução completa da amostra de ouro metálico. A solução obtida através da reação química entre o ouro metálico e a água-régia trata-se do Ácido Cloroáurico di-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, conforme reação química 1 apresentada na página 33) e através da estequiometria da reação, é possível estimar a concentração da solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ obtida a partir da massa inicial de ouro metálico e do volume final de solução presente no béquer, conforme apresentado pela Equação 01, na qual utilizam-se as massas molares do ouro (196,97 g/mol) e do Ácido Cloroáurico di-hidratado (375,77 g/mol).

$$C_{\text{solução de HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = \frac{\left(\frac{1 \text{ mol} \times 375,77 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times m_{\text{ouro metálico}}}{1 \text{ mol} \times 196,97 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \right)}{V_{\text{solução final}}} \quad \text{Eq. 01}$$

Para produzir uma solução de Ácido Cloroáurico di-hidratado com concentração igual a 2 mg/mL, deve-se diluir a solução produzida anteriormente em água ultrapura e, para tanto, o volume da alíquota da solução concentrada a ser diluída foi calculado conforme mostra a Equação 02.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_{\text{solução concentrada}} \times V_{\text{alíquota}} = C_{\text{solução diluída}} \times V_{\text{solução diluída (balão volumétrico)}}$$

$$C_{\text{solução HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} \times V_{\text{alíquota}} = 2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times V_{\text{solução diluída (balão volumétrico)}}$$

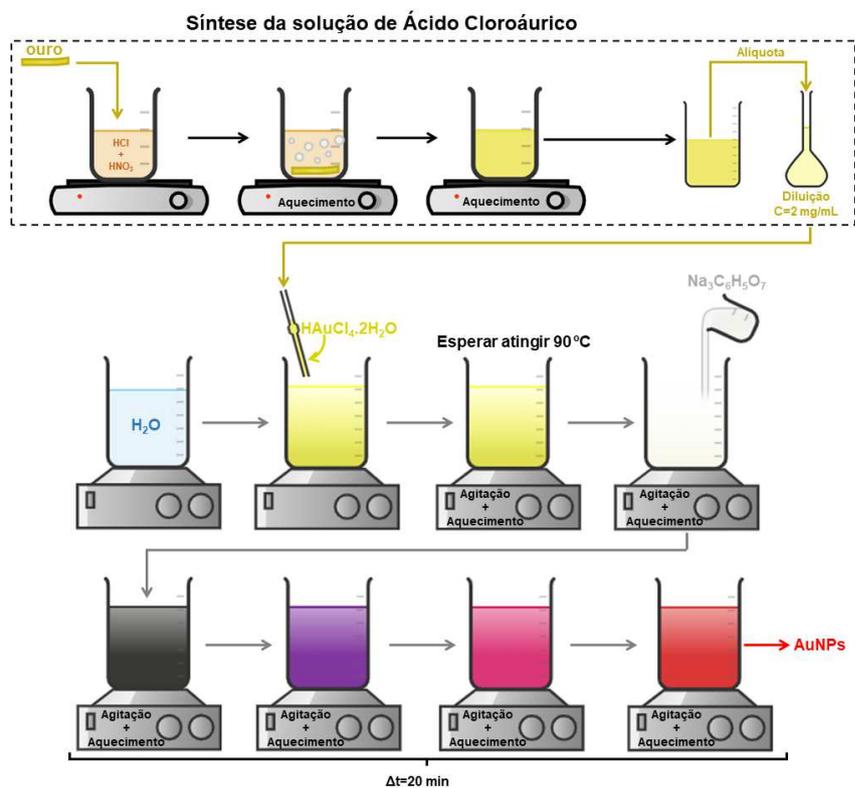
$$V_{\text{alíquota}} = \frac{2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times V_{\text{solução diluída (balão volumétrico)}}}{C_{\text{solução HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}} \quad \text{Eq. 02}$$

A solução de Ácido Cloroáurico di-hidratado diluída é denominada então como “solução mãe” e utilizada na síntese das nanopartículas de ouro.

Para tanto, 5 mL da solução de Ácido Cloroáurico di-hidratado (2 mg/mL) foi adicionado em 90 mL de água ultrapura, sob constante agitação a 1500 rpm e aquecimento até atingir a temperatura de 90 °C. Posteriormente, foi adicionado 5 mL de uma solução de Citrato de Sódio previamente preparada, sendo vertida instantaneamente no béquer contendo o Ácido Cloroáurico e a água ultrapura. O sistema permaneceu sob aquecimento e agitação constantes por mais 20 minutos. Por fim, a solução foi mantida em repouso, à temperatura ambiente, para seu resfriamento gradual e conservada em geladeira (± 5 °C).

A Figura 32 resume o procedimento experimental descrito através de uma representação esquemática da síntese realizada. A relação molar entre os reagentes Ácido Cloroáurico e Citrato de Sódio foi variada conforme apresentado na Tabela 5, partindo da relação molar ideal obtida no estudo principal com o Ácido Cloroáurico comercial e aumentando a concentração de Citrato de Sódio em relação ao agente precursor, devido à coloração da solução coloidal observada ao final da primeira síntese. Além disso, foram utilizadas duas amostras diferentes de ouro: 1 – fios de ouro oriundos do processo de *Wire Bonding* localizada no Instituto Tecnológico de Semicondutores da Unisinos (itt Chip); e 2 – alvo de ouro da metalizadora do Microscópio Eletrônico de Varredura pertencente à Feevale (Novo Hamburgo).

Figura 32 – Representação esquemática da reciclagem do ouro



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 5 – Formulação das sínteses de reciclagem do ouro

Amostra	Solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		Solução de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		Relação molar Ác. Cloroáurico:Citrato	Amostra de ouro metálico
	C	V	C	V		
Síntese 16	2 mg/mL	5 mL	6,87 mg/mL	5 mL	1:5	Fios de ouro (itt Chip)
Síntese 17			13,74 mg/mL		1:10	
Síntese 18			27,47 mg/mL		1:20	
Síntese 19			54,94 mg/mL		1:40	
Síntese 20			82,41 mg/mL		1:60	
Síntese 21			109,88 mg/mL		1:80	
Síntese 22	2 mg/mL	5 mL	6,87 mg/mL	5 mL	1:5	Alvo de ouro (Feevale)
Síntese 23			13,74 mg/mL		1:10	
Síntese 24			27,47 mg/mL		1:20	
Síntese 25			54,94 mg/mL		1:40	
Síntese 26			82,41 mg/mL		1:60	
Síntese 27			109,88 mg/mL		1:80	

C → Concentração e V → Volume.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

As nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de reciclagem do ouro foram caracterizadas através das análises de Espectroscopia ultravioleta-visível e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier para avaliar a composição química das soluções coloidais produzidas e verificar a estabilidade das mesmas durante seu armazenamento, cujos detalhes sobre o equipamento e os parâmetros de análise utilizados estão descritos nos itens 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.3 respectivamente.

3.5 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

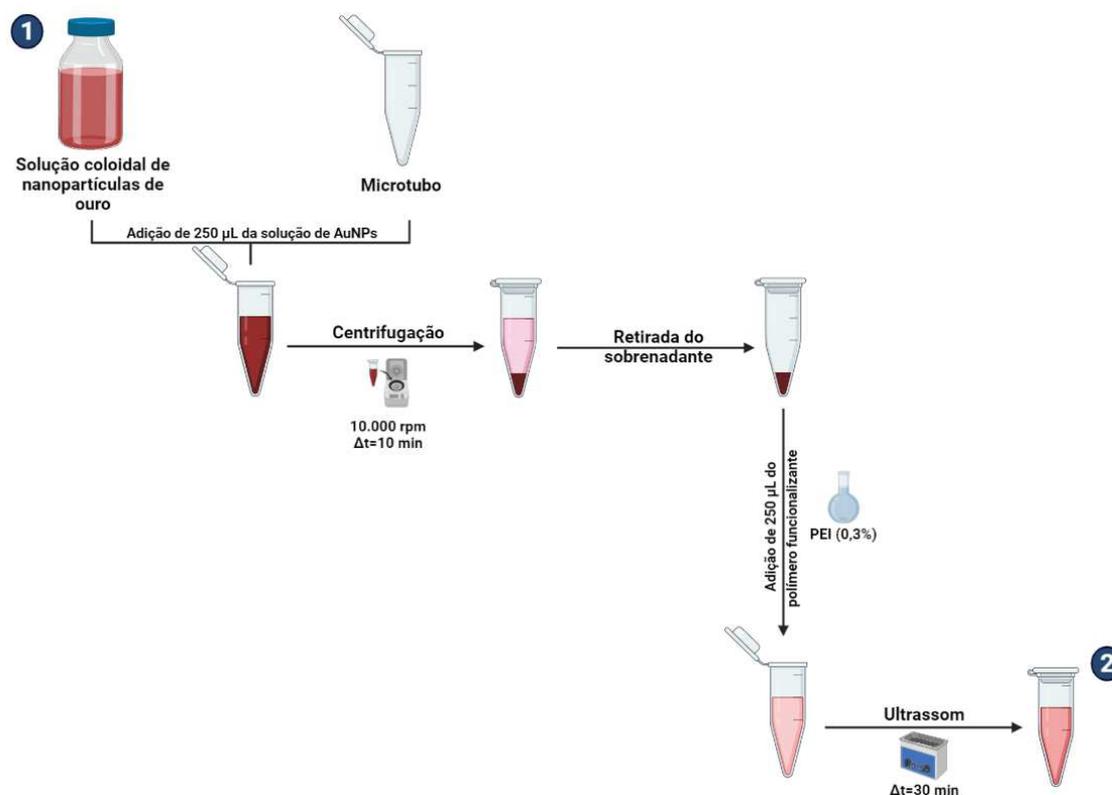
A terceira e última etapa do trabalho trata-se do processo de funcionalização da superfície das nanopartículas de ouro, de modo a ativá-las e possibilitar a ligação com o bioreceptor de interesse.

Com base nos resultados de caracterização que serão apresentados no próximo capítulo, foi selecionada a síntese que apresentou uma combinação de resultados satisfatórios no que diz respeito à dispersão e tamanho das nanopartículas de ouro, e estabilidade da solução coloidal quando conservada por um determinado período de tempo após seu preparo. O processo de funcionalização descrito nessa seção foi baseado no trabalho executado por Ferreira e colaboradores (2017) que realizaram o acoplamento do ligante polietilenoimina (PEI) à superfície de nanobastões de ouro.

Inicialmente, todas as vidrarias utilizadas no preparo das soluções foram lavadas com água-régia, preparada pela adição de 10 mL de Ácido Nítrico (65%) em 40 mL de Ácido Clorídrico (37%). Em microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 250 µL da solução coloidal de nanopartículas de ouro selecionada conforme os critérios mencionados no parágrafo anterior; a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e, na sequência, retirou-se o sobrenadante. Os sólidos oriundos da centrifugação foram ressuspensos em 250 µL de uma solução aquosa de Polietilenoimina (PEI) com concentração igual a 0,3% (em volume, v/v). Os microtubos foram, então, incubados em banho ultrassônico por 30 min a temperatura ambiente.

A Figura 33 apresenta esquematicamente o procedimento de funcionalização das AuNPs descrito anteriormente, com indicação numérica do momento em que foram separadas as alíquotas para posterior caracterização.

Figura 33 – Fluxograma do processo de funcionalização das AuNPs



Alíquota 1 → solução coloidal de AuNPs. Alíquota 2 → solução coloidal de AuNPs funcionalizadas com polietilenoimina.

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A solução coloidal de AuNPs antes e após o processo de funcionalização foi caracterizada através das técnicas de Espectroscopia ultravioleta-visível e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, cujos detalhes sobre o equipamento e os parâmetros de análise utilizados estão descritos nos itens 3.6.1 e 3.6.7 respectivamente.

3.6 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO

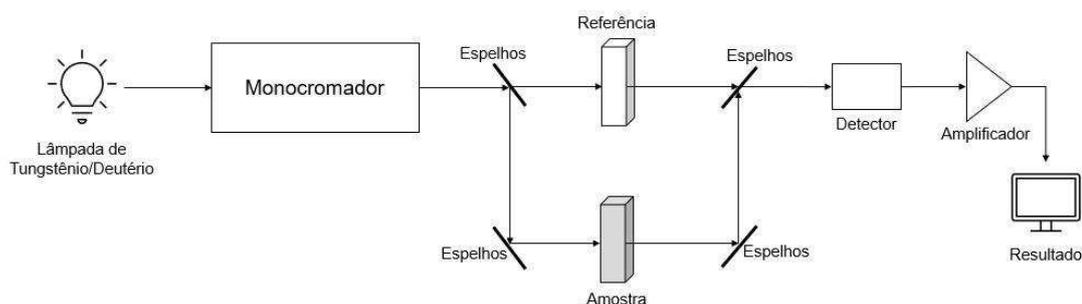
A seguir, são descritas as análises de caracterização realizadas no presente trabalho conforme apresentadas esquematicamente no fluxograma da metodologia (Figura 26).

3.6.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis)

A Espectroscopia (ou Espectrofotometria) ultravioleta-visível (UV-vis) consiste em uma técnica analítica quantitativa fundamentada na absorção da radiação

ultravioleta (comprimentos de onda na faixa entre 180 e 390 nm) e/ou da radiação visível (comprimentos de onda na faixa entre 390 e 780 nm) por espécies químicas em solução (WORSFOLD, 2005). A Figura 34 apresenta a estrutura básica de um espectrofotômetro UV-Vis que é composto por uma lâmpada de Deutério (para os comprimentos de onda ultravioleta) ou de Tungstênio (para os comprimentos de onda da região visível), amostras e feixes de referência, monocromador, detector e amplificador (TITUS *et al.*, 2019).

Figura 34 – Componentes de um espectrofotômetro de UV-vis



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Adaptado de Titus *et al.* (2019, p. 312) e de Worsfold (2005, p. 320).

Nessa análise, a amostra é submetida à passagem de certas frequências de radiação, sendo que parte dessa radiação é absorvida pela amostra e o restante é transmitida através da solução. O detector presente no equipamento capta a razão de luz que foi transmitida para cada comprimento de onda, o que consiste na medida de transmitância. A razão de luz absorvida pela amostra é obtida pelo logaritmo negativo da transmitância, e resultada no espectro de absorbância *versus* comprimento de onda (TITUS *et al.*, 2019).

Os espectros na região do UV-Vis deste trabalho foram realizados em um espectrofotômetro marca Shimadzu e modelo UV-2600 apresentado na Figura 35-A, localizado no Laboratório de Nutracêuticos do Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) da Unisinos, utilizando cubetas de plástico com volume igual a 4 mL. A solução coloidal antes e após o processo de funcionalização das AuNPs, por sua vez, foi caracterizada em um espectrofotômetro SpectraMax M5, marca Molecular Devices, com auxílio do software SoftMax Pro 6.2.1. e as amostras foram acondicionadas em uma microplaca de plástico, conforme apresentado na Figura 35-B.

As leituras de absorvância das soluções foram realizadas entre os comprimentos de onda 400 e 800 nm.

Figura 35 – Espectrofotômetros de UV-vis



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.6.2 Análise de estabilidade

A análise de estabilidade das soluções foi adaptada da avaliação realizada por Da Silva (2016). Para tanto, um certo volume de cada síntese foi reservado e armazenado em geladeira ($\approx 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Então, foram gerados novos espectros na região ultravioleta-visível das amostras armazenadas após 1 dia, 1 semana e 1 mês da data de realização da síntese, utilizando o espectrofotômetro caracterizado anteriormente (Figura 35-A).

3.6.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

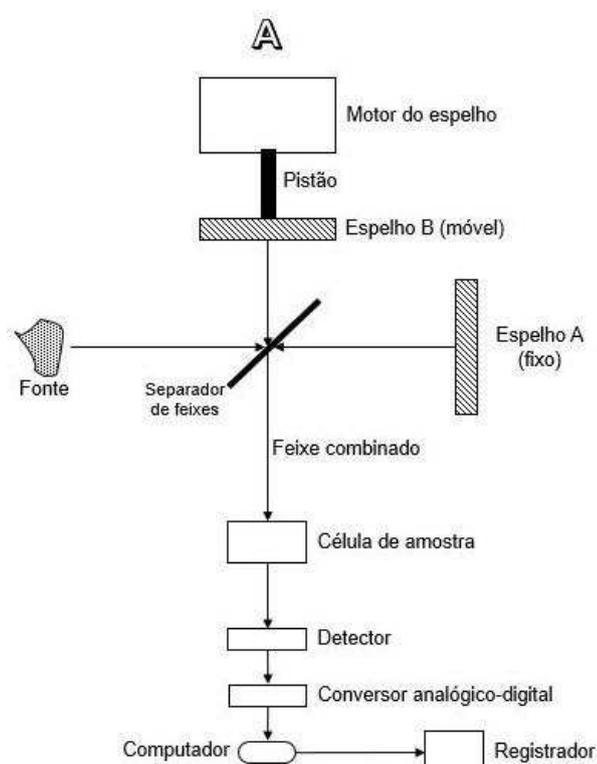
A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica utilizada para a identificação de materiais orgânicos, inorgânicos e poliméricos e fundamenta-se nas mudanças de estados energéticos vibracionais das moléculas presentes no material, quando expostas à radiação infravermelha, caracterizada por comprimentos de onda (λ) entre 730 e 1.000.000 nm (LEITE & PRADO, 2012). O sinal resultante consiste em um espectro de bandas expresso, geralmente, em um intervalo de números de onda ($\tilde{\nu}$, sendo $\tilde{\nu}=1/\lambda$) de 4000 a 400 cm^{-1} , que representa a “impressão digital molecular” das amostras (SILVERSTEIN *et al.*, 2019; TITUS *et al.*, 2019).

Conforme pode-se visualizar na Figura 36-A, apresentada a seguir, o funcionamento de um espectrômetro de FTIR engloba dois tipos de feixes de radiação, um fixo e um móvel, sendo que ao variar as distâncias percorridas por esses dois

feixes tem-se, por consequência, variações na intensidade de radiação recebida pelo detector, produzindo o interferograma da amostra. Este interferograma, que está no domínio do tempo, é convertido para o domínio de frequências, pelas transformadas de Fourier. A passagem da radiação por uma amostra submete-a a uma faixa larga de energias, originando o espectro completo de infravermelho (SILVERSTEIN *et al.*, 2019).

O equipamento apresentado na Figura 36-B, por sua vez, é o espectrômetro utilizado para a análise de FTIR deste trabalho, da marca Agilent Technologies e modelo Cary 630, localizado no Laboratório de Biologia Molecular e Toxicologia da Unisinos. Este equipamento acompanha o acessório de Reflexão Total Atenuada, ou simplesmente ATR, que dispensa a preparação prévia das amostras, uma vez que examina a superfície do material (na profundidade de alguns micrômetros), tornando possível a análise de tipos diferentes de amostras, incluindo soluções aquosas, amostras biológicas, materiais opacos, pós e líquidos (SILVERSTEIN *et al.*, 2019). Os parâmetros de análise utilizados foram: cristal de Selênio e Zinco, 32 varreduras, resolução de 16 cm^{-1} e a faixa de absorção compreendendo a região entre 650 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} .

Figura 36 – Espectrômetro de FTIR: (a) estrutura base e (b) equipamento



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Adaptado de Silverstein *et al.* (2019, p. 76) e Agilent (2021).

3.6.4 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e índice de polidispersão (PDI)

Outra técnica utilizada para caracterizar sistemas coloidais nanoparticulados é a análise de Espalhamento de Luz Dinâmico, ou DLS (sigla do inglês, *Dynamic Light Scattering*), que pode ser usada para estimar o tamanho médio das nanopartículas em solução.

Nesta análise, uma fonte de luz monocromática é incidida sobre a solução e, devido ao tamanho e forma das partículas presentes na mesma, a luz é espalhada em todas as direções com intensidades distintas. O espalhamento de luz pode ser estático ou dinâmico. No primeiro caso, são obtidas informações sobre a massa molecular e o raio de rotação das moléculas. Já no segundo caso, o impacto das moléculas de um solvente com as partículas presentes na solução provoca o movimento aleatório das partículas, denominado de movimento browniano. Assim, através do espalhamento de luz pelas partículas em movimento (espalhamento dinâmico), é possível obter o coeficiente de difusão das partículas que está, por sua vez, relacionado ao seu tamanho hidrodinâmico e à viscosidade do solvente (DA SILVA, 2016; STETEFELD *et al.*, 2016). A Figura 37, a seguir, apresenta uma imagem do equipamento de DLS utilizado para a estimativa do tamanho médio hidrodinâmico das nanopartículas de ouro sintetizadas no presente trabalho que pertence ao Laboratório de Estudos Avançados em Materiais da Universidade Feevale em Novo Hamburgo (RS).

Figura 37 – Equipamento NanoBrook 90Plus PALS para análise de Espalhamento de Luz Dinâmico



Fonte: Brookhaven Instruments (2021).

A análise de DLS foi realizada com ângulo de 90° e sob temperatura ambiente ($\approx 20^{\circ}\text{C}$). As amostras foram acondicionadas em cubetas de plástico com volume igual

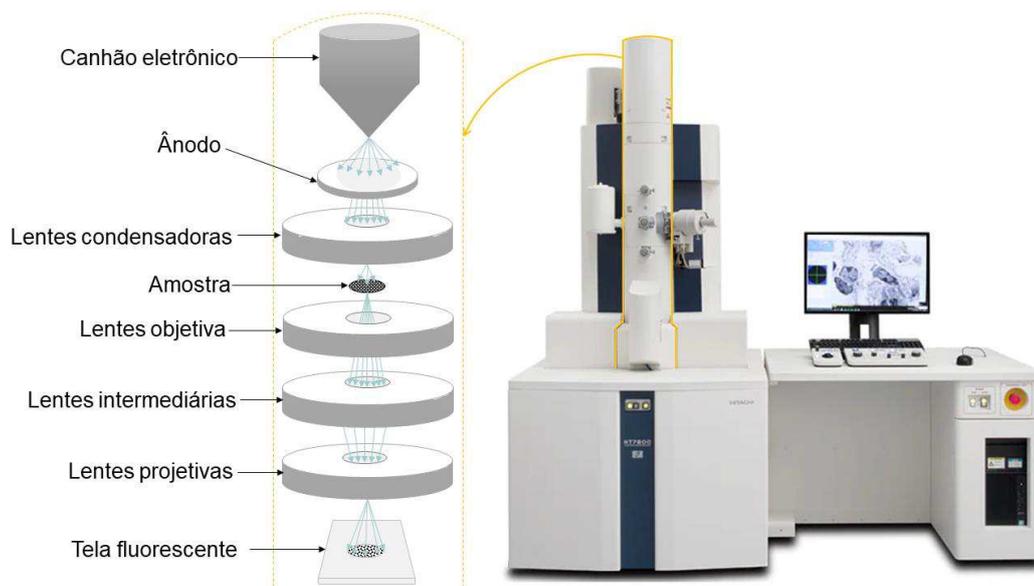
a 4 mL, e para cada amostra, foram realizadas dez leituras de diâmetro médio das nanopartículas em solução e índice de polidispersão. Conforme orientação do método analítico utilizado pelo laboratório, optou-se por excluir os resultados que geraram *baseline* inferior a 5,0. A exceção ocorreu para a Síntese 12, em que foram considerados apenas os resultados cujo *baseline* foi maior que 0.

3.6.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Quando um feixe de elétrons altamente focalizado e com elevada energia (80–200 keV) é incidido sobre uma amostra sólida e fina (espessura compreendendo a faixa entre 100 – 200 nm aproximadamente), o feixe interage com a superfície da amostra e os elétrons sofrem espalhamento ou difração dependendo dos planos cristalinos presentes no material, resultando na projeção superficial da amostra em uma tela fluorescente (EBNESAJJAD, 2006; KERDCHAROEN & WONGCHOOSUK, 2013; TITUS *et al.*, 2019). Essa técnica de caracterização é denominada Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET, ou TEM – *Transmission Electronic Microscopy*) e desempenha papel fundamental na análise e estimativa do tamanho médio de nanopartículas.

O tamanho médio das nanopartículas de ouro produzidas pelas sínteses do estudo principal com o Ácido Cloroáurico comercial foi avaliado em um Microscópio Eletrônico de Transmissão marca Hitachi e modelo HT7800 localizado no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), conforme apresentado pela Figura 38 a seguir. A análise foi conduzida a 100 kV e foi utilizada uma câmera AMT 8K. Posteriormente, as imagens foram tratadas no software ImageJ para estimar o diâmetro das nanopartículas e elaborou-se um histograma com a distribuição de tamanhos médios das AuNPs dividindo-os em classes pré-definidas, são elas: AuNPs com diâmetro >0 e ≤ 5 nm, >5 e ≤ 10 nm, >10 e ≤ 15 nm, >15 e ≤ 20 nm, >20 e ≤ 25 nm, >25 e ≤ 30 nm, e >30 e ≤ 35 nm.

Figura 38 – Microscópio Eletrônico de Transmissão e componentes básicos



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Adaptado de Ford *et al.* (2019), Hitachi (2017) e Titus *et al.* (2019).

3.6.6 Teste de concentração

Para determinar a concentração das soluções coloidais de nanopartículas de ouro produzidas no estudo principal com Ácido Cloroáurico comercial, realizou-se a secagem de uma alíquota das soluções e os sólidos obtidos foram pesados para o cálculo das concentrações em massa e volume.

Para tanto, aproximadamente 10 mL da solução foram secos em estufa a vácuo na temperatura de 70 °C, durante cerca de 3 horas, tempo este suficiente para a evaporação completa do líquido. Vale ressaltar que para cada síntese, realizou-se o teste em triplicata e que, excepcionalmente para a Síntese 15, o procedimento de secagem foi prologado por mais 3 horas, porque observou-se que os sólidos obtidos na primeira etapa de secagem apresentaram uma aparência diferente das outras sínteses e, portanto, decidiu-se secá-los novamente.

As concentrações das soluções foram determinadas de acordo com as Equações 03 e 04 apresentadas a seguir.

$$C = \frac{m_{\text{sólidos}}}{V_{\text{solução}}} = \frac{(m_{\text{sistema após a secagem}} - m_{\text{bêquer vazio}})}{10 \text{ mL}} \quad \text{Eq. 03}$$

$$C_{\text{mássica}} = \frac{m_{\text{sólidos}}}{m_{\text{solução}}} = \frac{(m_{\text{sistema após a secagem}} - m_{\text{bêquer vazio}})}{(m_{\text{sistema antes da secagem}} - m_{\text{bêquer vazio}})} \quad \text{Eq. 04}$$

3.6.7 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS, sigla do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) trata-se de uma análise eletroquímica baseada na reação interfacial que ocorre na superfície de eletrodos (MIURA & ASANO, 2021). Para tanto, um potencial alternado é aplicado sobre o eletrodo de trabalho em um intervalo de frequências, gerando uma corrente alternada decorrente da transferência de cargas de espécies eletroquímicas que estão na superfície do eletrodo, geralmente, utilizam-se espécies com capacidade de oxi-redução como soluções de Ferrocianeto e Ferricianeto de Potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$ e $K_3[Fe(CN)_6]$ respectivamente) (ISLAM & CHANNON, 2020). Conhecendo o potencial aplicado (E medido em Volts – V) e a corrente gerada pelo mesmo (I medida em Ampere – A), calcula-se a impedância do sistema (Z medida em Ohm – Ω) utilizando a Lei de Ohm para corrente alternada (Equação 05).

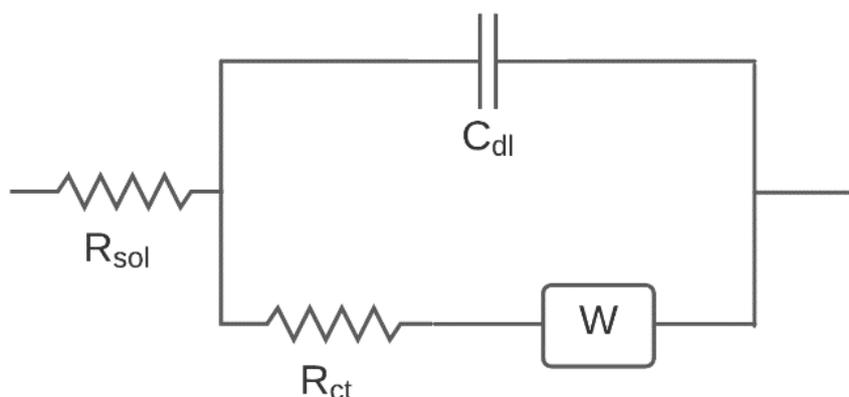
$$E = I \times Z \quad \text{Eq. 05}$$

O valor de impedância obtido é, então, discriminado nas seguintes variáveis (ISLAM & CHANNON, 2020):

- R_{sol} → consiste na resistência da solução e inclui as resistências do material de manufatura do eletrodo, do contato entre os eletrodos e da solução entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência;
- R_{ct} → é definida como a resistência à transferência de cargas do par redox;
- C_{dl} → trata-se da capacitância do *double-layer*;
- W → denominado como elemento de difusividade de Warburg, está relacionado à habilidade do analito em difundir na superfície e à cinética de transferência de cargas, ambos afetados pela modificação do eletrodo através da captura (ou ligação, ou acoplamento) de espécies químicas e/ou biológicas em sua superfície.

Quando combinadas, essas variáveis podem ser descritas em termos de um circuito elétrico equivalente baseado no modelo de circuito elétrico de Randle representado na Figura 39.

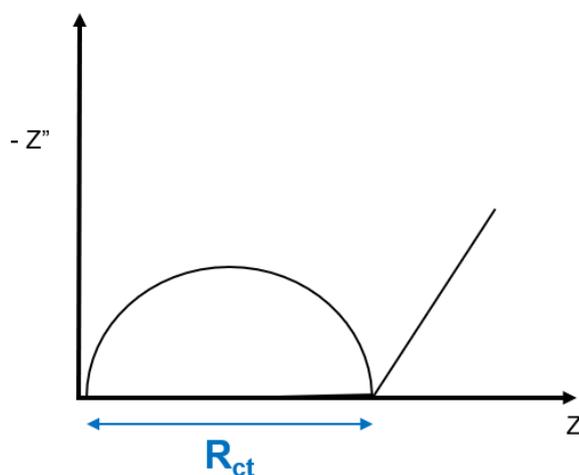
Figura 39 – Exemplo de circuito elétrico equivalente



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Após finalizada a análise de EIS, gera-se um gráfico de Impedância real (Z') versus Impedância imaginária (Z'') que é chamado de Nyquist plot (ou diagrama de Nyquist), a partir desse gráfico é possível determinar o valor de R_{ct} pelo diâmetro do semicírculo formado que, por sua vez, é correlacionado à concentração de certo analito ligado à superfície do eletrodo ou à alguma modificação físico-química do mesmo, conforme apresentado na Figura 40 (ISLAM & CHANNON, 2020).

Figura 40 – Nyquist plot



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

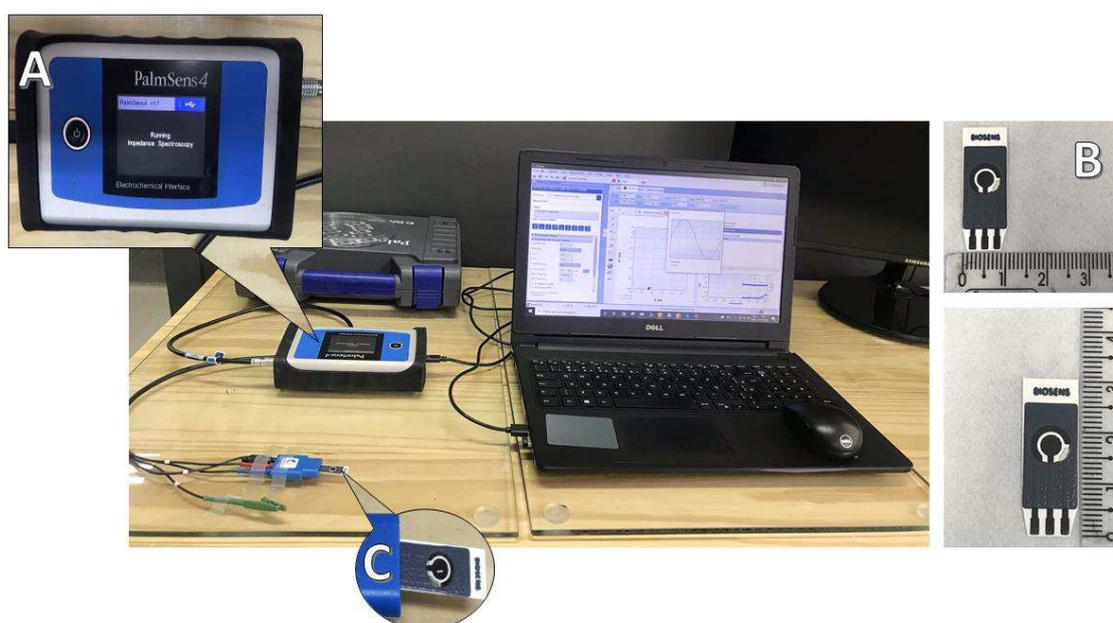
Para a análise de EIS, foram utilizados eletrodos fabricados pela técnica de serigrafia em substrato polimérico (poliéster), sendo o contra-eletrodo e o eletrodo de trabalho produzidos com pasta de Carbono/Grafeno, e o eletrodo de referência produzido com pasta de Ag/AgCl. Esses dispositivos são produzidos pela empresa Biosens Tecnologia em Saúde e foram cedidos para a execução dos testes eletroquímicos no presente trabalho.

Para tanto, sobre o eletrodo de trabalho ($\varnothing=4$ mm), adicionou-se 15 μL da solução coloidal de AuNPs antes e após o processo de funcionalização, e os dispositivos foram mantidos em dessecador durante 3 horas para a formação de um filme de nanopartículas de ouro sobre o eletrodo. Na sequência, os eletrodos foram analisados em um Potenciostato portátil PalmSens4, marca PalmSens Compact Electrochemical Interfaces, utilizando os seguintes parâmetros (ZHENG *et al.*, 2013):

- Potencial em corrente alternada (E_{ac}) = 0,01 V;
- Frequência mínima (f_{min}) = 100 mHz;
- Frequência máxima (f_{max}) = 1 MHz; e
- Tempo de duração do OCP (t) = 1,0 s.

As medidas foram realizadas com 50 μL de uma solução de Ferrocianeto e Ferricianeto de Potássio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) na proporção molar 1:1 e concentração igual a 1 mM, em Cloreto de Potássio como eletrólito suporte (1 M), aplicada sobre a região delimitada pela camada dielétrica que compreende o contra-eletrodo, o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. A Figura 41 apresenta o potenciostato e os eletrodos utilizados para a análise de EIS.

Figura 41 – Registro da análise de EIS e dimensões do eletrodo



a) Potenciostato portátil, b) Eletrodos comerciais de carbono/grafeno e c) Eletrodo conectado ao potenciostato para análise.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo, serão apresentados os resultados obtidos com a síntese de nanopartículas de ouro através das metodologias experimentais descritas anteriormente, sendo dividido também em três seções: estudo preliminar, estudo principal e funcionalização das nanopartículas de ouro.

4.1 ESTUDO PRELIMINAR

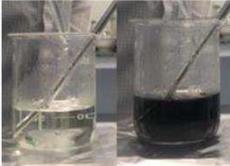
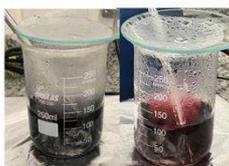
Vale lembrar que no estudo preliminar, a síntese das nanopartículas de ouro foi executada com dois agentes redutores diferentes, o Citrato de Sódio e o Borohidreto de Sódio, no qual avaliou-se a eficácia desses reagentes em formar AuNPs, além das características das soluções obtidas. Assim, os resultados apresentados nesta seção serão divididos em novos subcapítulos para cada agente redutor utilizado.

4.1.1 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio

Conforme exposto na literatura, a síntese de nanopartículas de ouro pelo método de redução química com Citrato de Sódio pode ser confirmada através de mudanças visuais de coloração da solução que inicialmente encontra-se amarela, devido à presença de íons Au^{3+} , torna-se rapidamente incolor na presença do agente redutor e, durante a reação química, muda para um tom de azul muito escuro, passa a roxo até se estabilizar em uma coloração avermelhada, confirmando, assim, a completa redução dos íons de ouro em ouro metálico e a formação das nanopartículas de ouro (GIRI, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2019).

A Figura 42 apresenta um compilado de imagens registradas durante a síntese das nanopartículas de ouro executadas nessa etapa, mostrando as alterações visuais de coloração das soluções ocorridas ao longo do processo para cada uma das amostras sintetizadas.

Figura 42 – Registro da síntese de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar

Síntese	Ácido Cloroáurico + Água ultrapura	Gotejamento do agente reduzidor	Aquecimento e agitação $\Delta t=20$ min	Registro da solução final
1				
2				
3				
4				
5				
6				

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

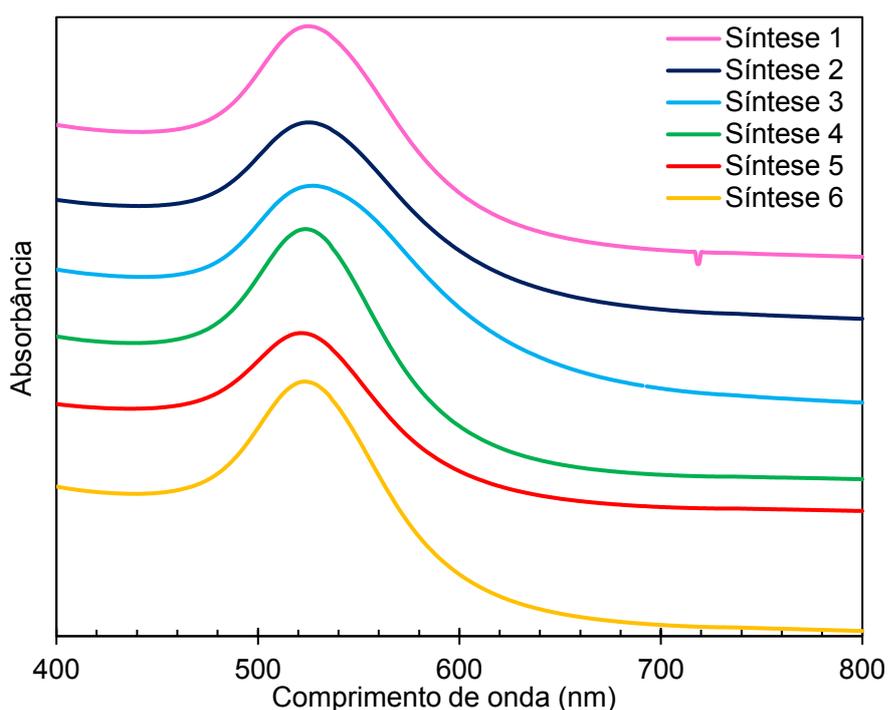
Observando a Figura 42, é possível identificar as alterações de coloração descritas na literatura e a aparência final da solução em todas as sínteses confirmam a formação das nanopartículas de ouro. Dentre os seis experimentos executados, a Síntese 3 foi a única que gerou uma solução com coloração mais próxima do roxo do que do vermelho. Essa evidência não significa que a referida síntese não obteve eficácia na formação das AuNPs, mas revela que as nanopartículas formadas nesta rota experimental possuem características diferentes das demais, em especial, relacionadas ao tamanho e formato das nanopartículas (TOMA & BONIFÁCIO, 2005).

Conforme descrito no capítulo 3.3.1, na síntese preliminar das AuNPs via Citrato de Sódio, determinou-se uma velocidade de gotejamento do agente redutor, utilizando para tanto uma pipeta graduada. No entanto, essa vidraria não é indicada para essa função e, por isso, nos testes definitivos, ocorreram modificações do procedimento experimental, incluindo a aquisição de novos equipamentos. Especificadamente para a Síntese 3, a velocidade de gotejamento foi menor do que as demais, nas quais manteve-se o padrão de 1 gota de citrato a cada segundo. Esses resultados revelam ainda que a velocidade de adição do agente redutor na solução do precursor do ouro influencia nas características das nanopartículas formadas, conforme já previsto na literatura (CAMMAROSANO, 1979).

4.1.1.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis)

A Figura 43 apresenta os espectros na região do UV-visível das amostras preliminares de AuNPs sintetizadas via redução química com Citrato de Sódio. É possível observar que em todos os espectros existe uma banda de máxima absorbância entre 500 e 550 nm, indicando a presença de ouro metálico e confirmando a formação das nanopartículas de ouro.

Figura 43 – Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Da Silva (2016), cujo procedimento experimental foi replicado neste trabalho, encontrou resultados semelhantes ao apresentado na Figura 43, observando uma banda de ressonância plasmônica do ouro em 525 nm. Outros estudos também obtiveram espectros parecidos ao apresentado na Figura 43, com diferentes comprimento de onda de máxima absorbância ($\lambda_{\text{máx.abs.}}$), indicando tamanhos de partículas distintos (\emptyset), respectivamente: $\lambda_{\text{máx.abs.}}=519$ nm e $\emptyset\approx 9,0$ nm (OJEA-JIMÉNEZ *et al.*, 2010), $\lambda_{\text{máx.abs.}}=520 - 524$ nm e $\emptyset\approx 10,0$ nm (HANŽIĆ *et al.*, 2015), e $\lambda_{\text{máx.abs.}}=520$ nm e $\emptyset\approx 13,0$ nm (SHOKOUFI *et al.*, 2019).

O comprimento de onda de máxima absorbância pode ser ainda utilizado como indicativo do tamanho das nanopartículas formadas, uma vez que, segundo Toma & Bonifácio (2005), AuNPs com diâmetros médios iguais a 9, 15, 22, 48 e 99 nm apresentam máximos de absorção em 517, 520, 521, 533 e 575 nm, respectivamente. A Tabela 6, a seguir, traz os comprimentos de onda da banda de ressonância plasmônica identificado para cada uma das amostras.

Tabela 6 – Comprimento de onda da banda de ressonância plasmônica das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar

Identificação da amostra	$\lambda_{\text{máx.abs.}}$ (nm)	Absorbância
Síntese 1	525	1,926
Síntese 2	525	1,649
Síntese 3	527,50	1,838
Síntese 4	523,50	2,038
Síntese 5	521,50	1,448
Síntese 6	523,50	2,056

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A banda de ressonância plasmônica de superfície ou banda de plasmon de superfície é uma banda de absorção que surge quando fótons incidem sobre as nanopartículas em solução provocando uma oscilação coletiva dos elétrons de condução ali presentes, e é influenciada por uma série de parâmetros selecionados durante a formação dessas nanopartículas, como solvente, espécie ligante na superfície das AuNPs, carga do núcleo e temperatura, que, por sua vez, acabam influenciando nas características das nanopartículas formadas, interferindo em sua forma e tamanho (KELLY *et al.*, 2003; LINK & EL-SAYED, 2000; SRIVASTAVA *et al.*, 2005; TEMPLETON *et al.*, 2000). A coloração vermelha escura (“vermelho rubi”,

bordô) característica das nanopartículas de ouro em solução deve-se a sua forte absorção de luz verde em 520 nm aproximadamente. Quando ocorre a agregação das nanopartículas de ouro, evidencia-se uma alteração na banda de ressonância plasmônica de superfície que torna-se mais larga e desloca-se para comprimentos de onda em torno de 700 nm, causado pelo aumento da absorção de luz vermelha (GHOSH & PAL, 2007; SU *et al.*, 2003). Se o processo de aglutinação das AuNPs for controlado, é possível observar uma variação sistemática da coloração da solução, passando de vermelho para roxo, e depois para azul.

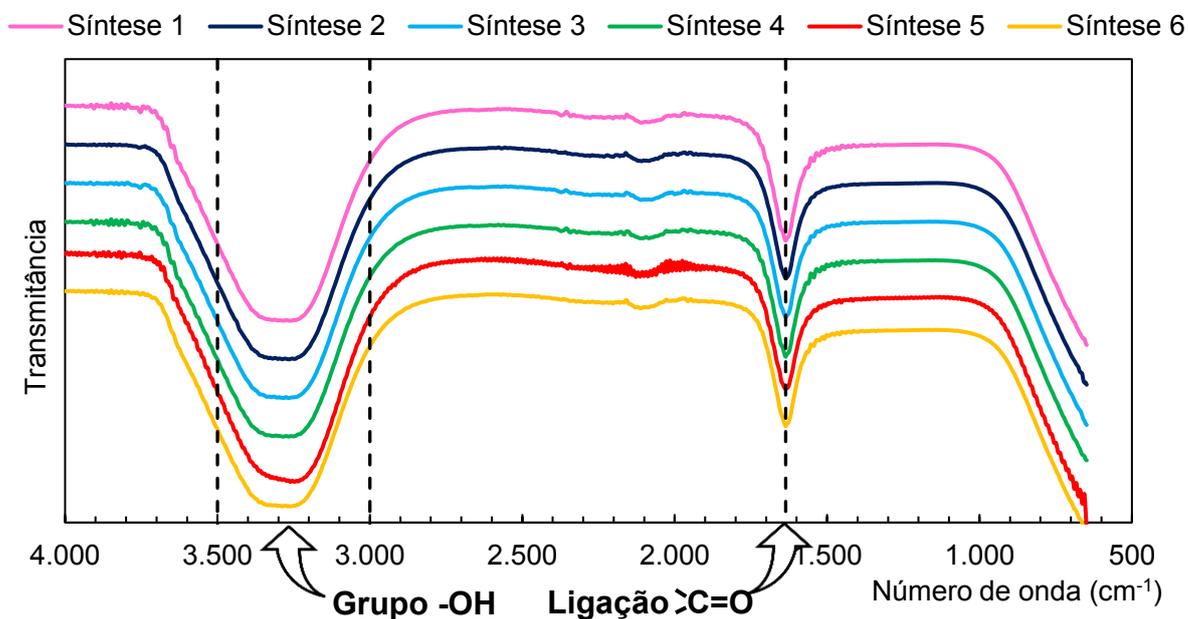
Dessa forma, baseado nos resultados de Bonifácio (2005), Ojea-Jiménez *et al.* (2010), Hanžić *et al.* (2015) e Shokoufi *et al.* (2019), pode-se inferir que as nanopartículas de ouro obtidas nas Sínteses 1, 2, 4, 5 e 6 tem tamanhos da ordem de 10 a 25 nm. A aparência da solução obtida na Síntese 3, como apresentada na Figura 42 e pelo espectro de UV-vis da Figura 43, pode estar relacionada a um início de agregação das nanopartículas de ouro, sendo que em alguns pontos essas nanopartículas podem estar aglomeradas ou, ainda, é um indicativo de que estas AuNPs possuem um tamanho médio de partícula maior do que as demais, na ordem de 25 a 50 nm (BONIFÁCIO, 2005).

4.1.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)

A Figura 44, a seguir, apresenta os espectros de ATR-FTIR das nanopartículas de ouro em solução, produzidas com Citrato de Sódio que compõem o estudo preliminar.

Primeiramente, evidencia-se que todos os seis espectros apresentam comportamento semelhante e as mesmas bandas. A banda larga de absorção identificada entre 3.000 e 3.500 cm^{-1} se refere à presença do grupo funcional hidroxila (-OH) nas soluções, decorrente do solvente utilizado durante a síntese que foi água ultrapura e, também, à estrutura química do Ácido β -cetoglutárico produzido durante a reação química entre o Citrato de Sódio em solução com o Ácido Cloroáurico, conforme apresentado pela Figura 6 no capítulo 2.1.2. Por fim, a banda comum a todas as amostras em 1.636 cm^{-1} aproximadamente é característica da ligação dupla entre carbono e oxigênio, presente nos ácidos carboxílicos, como o Ácido β -cetoglutárico (SILVERSTEIN *et al.*, 2019).

Figura 44 – Espectros de ATR-FTIR das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo preliminar

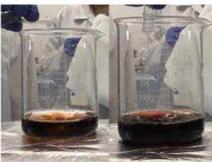


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.1.2 Síntese de AuNPs via redução química com Borohidreto de Sódio

Semelhante ao apresentado no item anterior, sobre o Citrato de Sódio, a Figura 45, a seguir, mostra as fotografias registradas durante a síntese preliminar das nanopartículas de ouro pelo método de redução química com Borohidreto de Sódio, evidenciando as alterações visuais de coloração das soluções ocorridas ao longo do processo.

Figura 45 – Registro da síntese de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar

Síntese	Ácido Cloroáurico + Água ultrapura	Adição do estabilizante	Agitação $\Delta t=30$ min	Adição do agente redutor	Agitação $\Delta t=1$ h	Registro da solução final
7						
8						

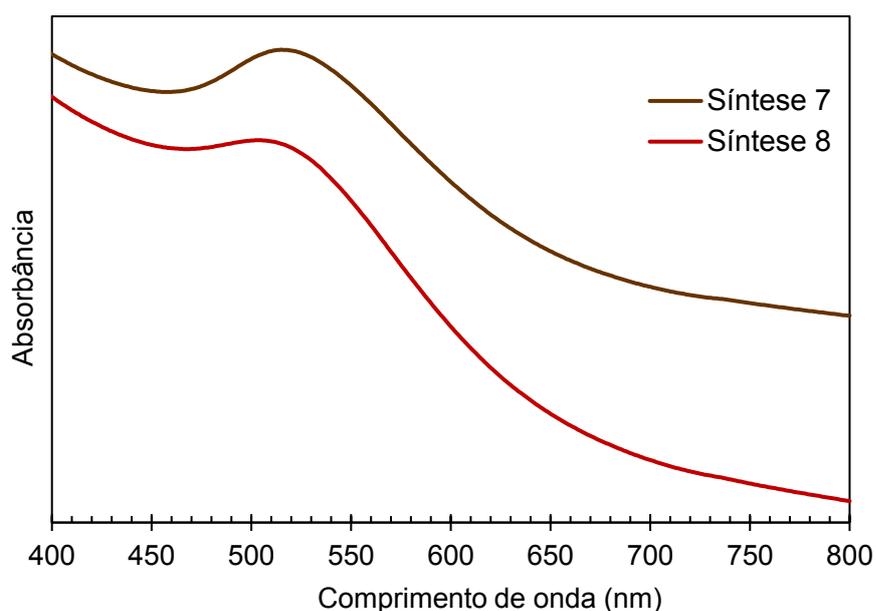
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Brust e colaboradores que em 1994 desenvolveram um método para a síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas com grupos tiol, utilizaram o Borohidreto de Sódio como agente redutor e, após filtragem e secagem, obtiveram nanopartículas de ouro com coloração marrom escura e textura “cerosa”. Lin e co-autores (2013), por sua vez, cuja metodologia foi replicada neste trabalho, identificaram uma mudança instantânea da solução ao adicionar o agente redutor, tornando-se rapidamente vermelho escuro. Com base nesses resultados, pode-se inferir que a reação de redução química dos íons de ouro do Ácido Cloroáurico em ouro metálico aconteceu, uma vez que em ambas as sínteses, evidenciou-se uma mudança instantânea de coloração da solução com a adição do Borohidreto de Sódio. Após finalizada a reação, as soluções mantiveram sua aparência escura, cuja coloração vermelho/marrom só foi possível identificar posicionando as amostras contra a luz. A confirmação se ocorreu ou não a síntese das nanopartículas de ouro é possível com as análises de caracterização apresentadas na sequência.

4.1.2.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis)

A Figura 46 apresenta os espectros na região do UV-visível das amostras preliminares de AuNPs sintetizadas via redução química com Borohidreto de Sódio.

Figura 46 – Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os espectros apresentados na Figura 46 mostram uma banda de absorção entre 500 e 550 nm, indicando a presença de ouro metálico e confirmando a formação das nanopartículas de ouro. No entanto, diferentemente das amostras sintetizadas com Citrato de Sódio, a banda de ressonância plasmônica do ouro nas Sínteses 7 e 8 é menos acentuada do que nas demais. Esse comportamento também foi observado por Casanova (2010), Lin *et al.* (2013) e Deraedt *et al.* (2014) que realizaram a síntese de nanopartículas de ouro com Borohidreto de Sódio como agente redutor e como estabilizante usaram Hidroclorato de polialilamina (PAH) e Ácido 3-mercaptopropiônico (3-AMP), Polivinilpirrolidona (PVP), ou sem estabilizante respectivamente.

A Tabela 7, a seguir, resume os comprimentos de onda da banda de ressonância plasmônica identificados para cada uma das amostras, sugerindo que as AuNPs obtidas usando o Borohidreto de Sódio são menores do que as AuNPs sintetizadas com Citrato de Sódio.

Tabela 7 – Comprimento de onda da banda de ressonância plasmônica das sínteses de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar

Identificação da amostra	$\lambda_{\text{máx.abs.}}$ (nm)	Absorbância
Síntese 7	515	1,688
Síntese 8	504	1,584

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

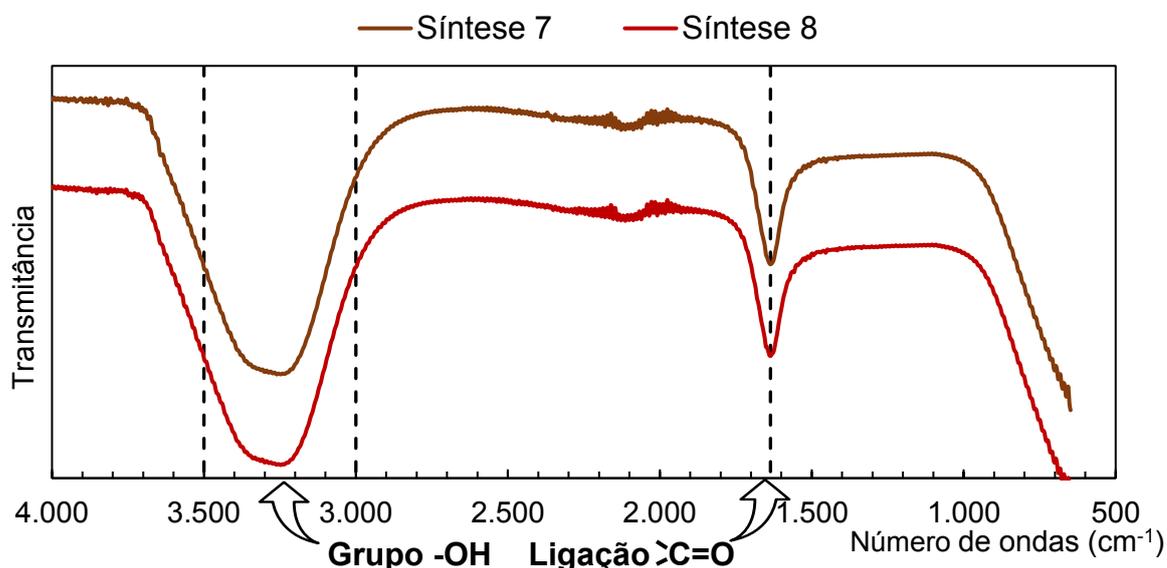
4.1.2.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)

A Figura 47, a seguir, apresenta os espectros de ATR-FTIR das soluções coloidais de nanopartículas de ouro produzidas com Borohidreto de Sódio que compõem também o estudo preliminar.

A banda larga de absorção identificada entre 3.000 e 3.500 cm^{-1} é característica do grupo funcional hidroxila (-OH), decorrente da presença de água ultrapura no meio, utilizada como solvente durante a síntese das nanopartículas de ouro. A banda de absorção em cerca de 1.636 cm^{-1} consiste em uma banda de superposição, uma vez que é gerada pela combinação das contribuições dos estiramentos dos grupos C=O e N-H. A ausência das bandas de absorção em torno de 1285 e 1460 cm^{-1} , atribuídas à ligação C-N e aos grupos CH e CH₂ presentes na estrutura química do PVP, sugere

a quebra do anel de pirrolidona durante a reação (CHOKKI *et al.*, 2019; DE AMORIM, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2019; SUAVE, 2013).

Figura 47 – Espectros ATR-FTIR das sínteses de AuNPs via Borohidreto de Sódio do estudo preliminar



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.1.3 Discussão dos resultados

A partir dos resultados obtidos com o estudo preliminar, elaborou-se o Quadro 1 que apresenta um comparativo entre os agentes redutores avaliados, quanto às características da solução coloidal sintetizada e à natureza e função do reagente.

Quadro 1a – Comparativo entre os agentes redutores Citrato de Sódio e Borohidreto de Sódio para a síntese de nanopartículas de ouro

Característica	Citrato de Sódio	Borohidreto de Sódio
Tamanho das partículas	Nanopartículas com tamanhos variados, entre 4 e 100 nm, gerando soluções coloidais com colorações diferentes (DE SOUZA <i>et al.</i> , 2019; NANODAYS, 2012).	Nanopartículas menores, entre 1 e 30 nm (BRUST <i>et al.</i> , 1994; DE SOUZA <i>et al.</i> , 2019). A maior capacidade de nucleação do borohidreto favorece a formação de muitos núcleos, dificultando o crescimento das nanoestruturas (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2020).

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Quadro 1b – Continuação...Comparativo entre os agentes redutores Citrato de Sódio e Borohidreto de Sódio para a síntese de nanopartículas de ouro

Característica	Citrato de Sódio	Borohidreto de Sódio
<i>Distribuição dos tamanhos de partículas</i>	Os íons de citrato promovem tanto a redução dos íons de ouro quanto a estabilização das AuNPs formadas, levando a um efeito de monodispersão (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2020).	Como o borohidreto é um redutor forte, acaba provocando a formação de muitos núcleos que, por sua vez, desencadeia um crescimento desordenado levando a formação de AuNPs com tamanhos mais diversificados (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2020).
<i>Concentração</i>	Menor concentração.	Maior concentração.
<i>Aparência visual</i>	As soluções coloidais produzidas com citrato apresentam diferentes colorações, mais vívidas e nítidas, que permitem a detecção a olho nu em dispositivos teste rápido, dispensando o uso de equipamentos externos para interpretação (PAROLO <i>et al.</i> , 2020).	As soluções coloidais produzidas com borohidreto apresentaram coloração amarronzada.
<i>Toxicidade</i>	Reagente não-tóxico, sendo até mesmo utilizado como aditivo em alimentos (COURA <i>et al.</i> , 2018).	Possui toxicidade aguda (SIGMA-ALDRICH, 2011).
<i>Função</i>	Atua inicialmente como agente redutor dos íons de Au ⁺³ para Au ⁰ e o reagente remanescente estabiliza as AuNPs (GIRI, 2017).	Necessita a adição de agentes estabilizantes, para impedir a agregação das AuNPs.
<i>Aquecimento</i>	Requer aquecimento.	Não requer aquecimento.
<i>Tempo</i>	Síntese rápida, em torno de 30 min.	Síntese mais demorada, necessitando de no mínimo 1 h e 30 min.
<i>Eficácia da síntese</i>	Identificada através da mudança de coloração da solução de amarelo claro para vermelho.	Identificada na análise de UV-vis, uma vez que a solução obtida não apresentou coloração vermelha intensa.

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Com base nas informações apresentadas no Quadro 1 e nos resultados discutidos anteriormente, optou-se por utilizar o Citrato de Sódio como agente redutor das sínteses realizadas a partir de então, uma vez que a solução coloidal obtida pelo método de Turkevich *et al.* (1951) apresenta uma coloração mais intensa, possibilitando a construção de biossensores tanto eletroquímicos quanto imunocromatográficos (testes rápidos) e o método experimental é mais simples ao utilizar um único reagente como redutor e estabilizante, além de demandar menos tempo de reação, o que influencia nos custos finais de produção.

4.2 ESTUDO PRINCIPAL

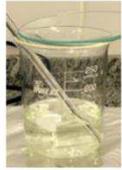
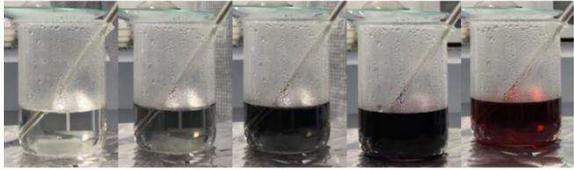
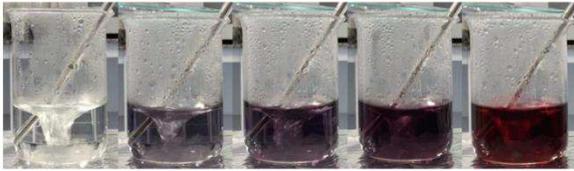
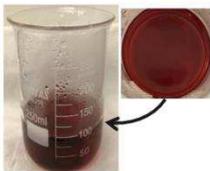
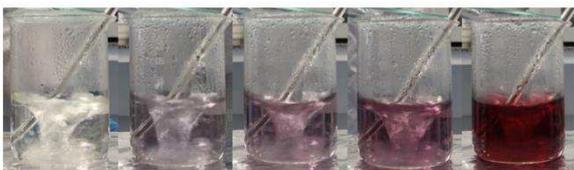
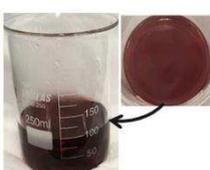
Diante do exposto, no estudo principal, a síntese das nanopartículas de ouro foi conduzida apenas com o Citrato de Sódio, seguindo o método criado em 1951 por Turkevich e colaboradores, e replicado por Da Silva (2016).

4.2.1 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico comercial

Após a escolha do agente redutor, avaliaram-se os seguintes parâmetros da síntese: velocidade de agitação, razão molar entre o Ácido Cloroáurico (precursor do ouro) e o Citrato de Sódio (agente redutor), e a velocidade de adição do agente redutor.

A Figura 48, por sua vez, apresenta um compilado de imagens registradas durante a síntese das nanopartículas de ouro executadas nessa etapa, mostrando as alterações de coloração das soluções ocorridas ao longo do processo.

Figura 48 - Registro das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal

Síntese	Ácido Cloroáurico + Água ultrapura	Adição do agente redutor + Aquecimento e agitação ($\Delta t=20$ min)	Registro da solução final
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observando as imagens presentes na Figura 48, é possível identificar que a aparência das soluções coloidais obtidas ao final do processo é semelhante à aparência das soluções produzidas no estudo preliminar com Citrato de Sódio (Figura 42), sendo estas avermelhadas ou roxas. No entanto, vale destacar que as imagens do estudo principal revelam um processo de mudança de cor das soluções mais claro

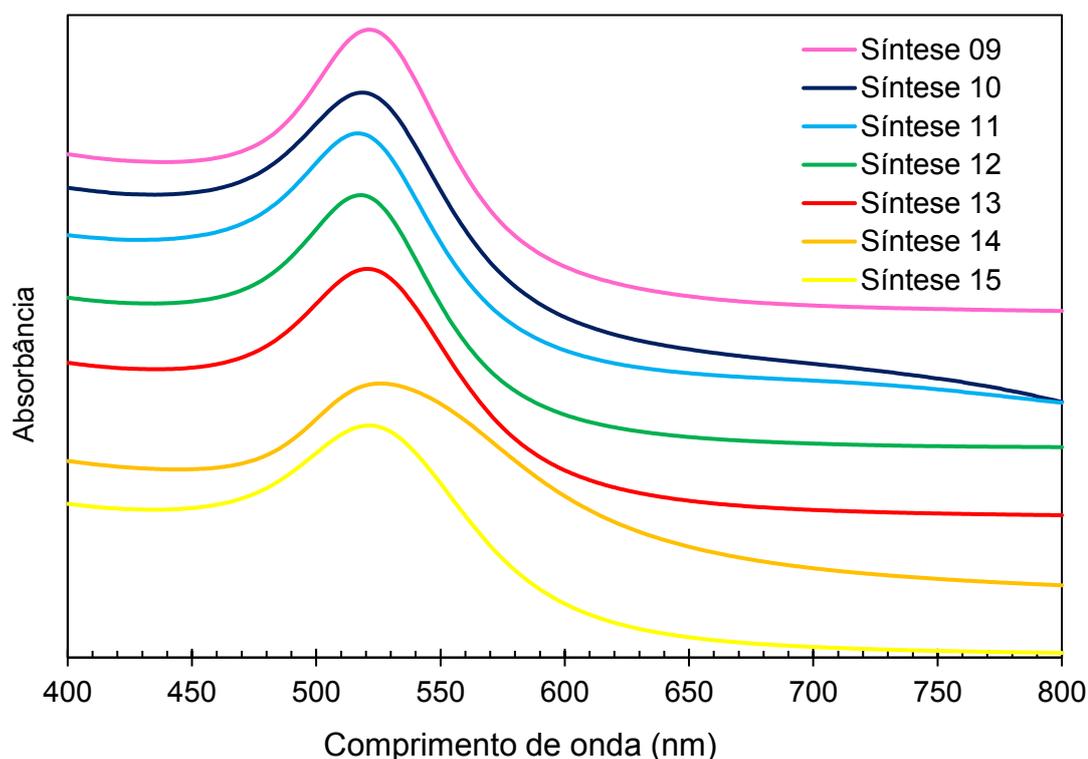
e gradativo do que no estudo preliminar, uma vez que no estudo principal foram avaliados outros parâmetros do processo que influenciam mais nas características das nanopartículas do que somente a velocidade de agitação que foi o único parâmetro avaliado no estudo preliminar.

Observando somente as imagens, pode-se inferir que a Síntese 14 produziu uma solução coloidal com nanopartículas de ouro maiores do que as demais, devido à coloração roxa da solução. As análises de caracterização apresentadas na sequência contribuem para a análise dos resultados, principalmente no que diz respeito ao tamanho das partículas e a sua relação com os parâmetros do processo analisados nesse estudo.

4.2.1.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis)

A Figura 49 apresenta os espectros na região do UV-visível das soluções coloidais de AuNPs sintetizadas com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico comercial que compõem o estudo principal, e na Tabela 8 são apresentados os comprimentos de onda da banda de ressonância plasmônica identificados para cada uma das amostras.

Figura 49 – Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 8 – Comprimento de onda da banda de ressonância plasmônica das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal

Identificação da amostra	$\lambda_{\text{máx.abs.}}$ (nm)	Absorbância
Síntese 09	521	1,665
Síntese 10	518,50	2,297
Síntese 11	517	2,059
Síntese 12	517,50	1,499
Síntese 13	520,50	1,468
Síntese 14	524,50	1,329
Síntese 15	521	1,354

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observando a Figura 49, identifica-se a presença de uma banda máxima de absorção entre 500 e 550 nm em todas as sínteses realizadas, comprovando a redução dos íons de ouro Au^{3+} em ouro metálico Au^0 e a consequente formação das nanopartículas de ouro (DA SILVA, 2016). Conforme discutido no estudo preliminar, as diferentes bandas de ressonância plasmônica das soluções coloidais de ouro podem ser relacionadas ao tamanho médio das nanopartículas (TOMA & BONIFÁCIO, 2005; KELLY et al., 2003; LINK & EL-SAYED, 2000; SRIVASTAVA *et al.*, 2005; TEMPLETON *et al.*, 2000). Assim, os experimentos realizados nessa etapa foram acompanhados de alterações nos parâmetros da síntese, como a velocidade de agitação, a relação molar entre os agentes precursor e redutor adicionada à síntese, e a velocidade de adição do agente redutor durante a reação, a fim de estimar a relação existente entre esses parâmetros com o tamanho médio das nanopartículas de ouro produzidas.

Considerando apenas os dados apresentados na Tabela 8, pode-se inferir que o aumento na velocidade de agitação entre as Sínteses 09 (250 rpm), 10 (750 rpm) e 11 (1500 rpm) reduziu o tamanho das nanopartículas produzidas, verificado por uma diminuição dos comprimentos de onda da banda de ressonância plasmônica de superfície identificados na Figura 49. Grasseschi (2015) concluiu que a velocidade de agitação influencia na velocidade de difusão das espécies químicas em solução, afetando, assim, a taxa de crescimento das nanopartículas de ouro. O efeito da velocidade de agitação durante a síntese de AuNPs se mostra mais pronunciado em

condições de maiores temperaturas e menores concentrações de citrato, sendo que ao aumentar a velocidade de agitação da solução, o tamanho médio das partículas pode reduzir em até 30%; isto se dá, devido à maior velocidade com que as reações superficiais ocorrem, sendo a taxa dessas reações controlada pela difusão das espécies químicas no meio reacional que aumenta com o aumento da agitação (GRASSESCI, 2015). Em temperaturas mais baixas, por sua vez, a influência da velocidade de agitação no tamanho das AuNPs é menos significativa, mas continua reduzindo o tamanho das mesmas, só que em um percentual menor, em torno de 6% apenas (GRASSESCI, 2015).

Em relação à razão molar entre o Ácido Cloroáurico e o Citrato de Sódio adicionada à síntese, consta na literatura que um aumento na concentração de citrato no meio reacional reduz o tamanho das nanopartículas, além de torná-las mais monodispersas; por outro lado, quanto menor a concentração de citrato na solução, o tamanho das partículas e o número de aglomerados aumentam (FRENS, 1973; GIRI, 2017; GRASSESCI, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2020). No entanto, observando os comprimentos de onda de máxima absorbância das Sínteses 11 (1:5), 12 (1:10) e 13 (1:20), presentes na Tabela 8, é possível identificar um aumento dos comprimentos de onda que podem ser relacionados a um aumento no tamanho médio das nanopartículas e à presença de aglomerados na solução coloidal, com aumento da relação molar Ácido Cloroáurico:Citrato de Sódio. Assim, os resultados obtidos nessa etapa do estudo não condizem com o exposto na literatura. A hipótese levantada para justificar a incoerência encontrada é a de que as concentrações do precursor e do redutor utilizada como primeiro experimento (Síntese 11 – 1:5) foram as já consolidadas em estudos anteriores, desde 1951, sugerindo que concentrações maiores do que a proposta por Turkevich *et al.* (1951) não reduziriam o tamanho das nanopartículas como esperado. A alternativa seria avaliar concentrações menores do que a utilizada no estudo citado e, assim, tornar possível a visualização de uma redução no tamanho das nanopartículas (e conseqüentemente redução no comprimento de onda de máxima absorbância identificado na análise de UV-vis) com o aumento da concentração de citrato de sódio em relação à concentração de ácido cloroáurico até atingir a relação de 1:5 proposta por Turkevich e colaboradores (1951).

Por fim, o último parâmetro avaliado foi a velocidade de adição do agente redutor (Citrato de Sódio) no meio reacional contendo água e o precursor do ouro (Ácido Cloroáurico comercial), caracterizada pelas Sínteses 14 (1 mL/min) e 15 (5

mL/min). A velocidade de adição do agente redutor durante a síntese foi monitorada por uma bomba de seringa que possibilitou o controle da velocidade em volume/tempo. Pelos resultados apresentados na Figura 49 e na Tabela 8, pode-se inferir que uma adição mais lenta ocasiona a produção de nanopartículas maiores e com possíveis aglomerados (Síntese 14). Cammarosano (1979) observou um comportamento semelhante ao encontrado neste trabalho, identificando uma tendência em aumentar o diâmetro médio das nanopartículas de ouro à medida que a vazão de gotejamento diminui, mas a autora utilizou como agente redutor uma mistura composta por glicose, gelatina, água e hidróxido de sódio, e nesse processo, a solução a ser gotejada foi a solução precursora do ouro sobre a solução redutora (contrário do que foi executado no presente trabalho). Cammarosano (1979) explica que esse comportamento ocorre devido à possibilidade dos núcleos de crescimento formados no início da reação em crescerem por um tempo maior quando a adição dos agentes químicos é mais lenta. Além disso, a autora acrescenta a hipótese de que o aumento na vazão de gotejamento contribui para a formação de um maior número de núcleos que crescerão menos do que se a velocidade de gotejamento fosse maior.

4.2.1.2 Análise de estabilidade

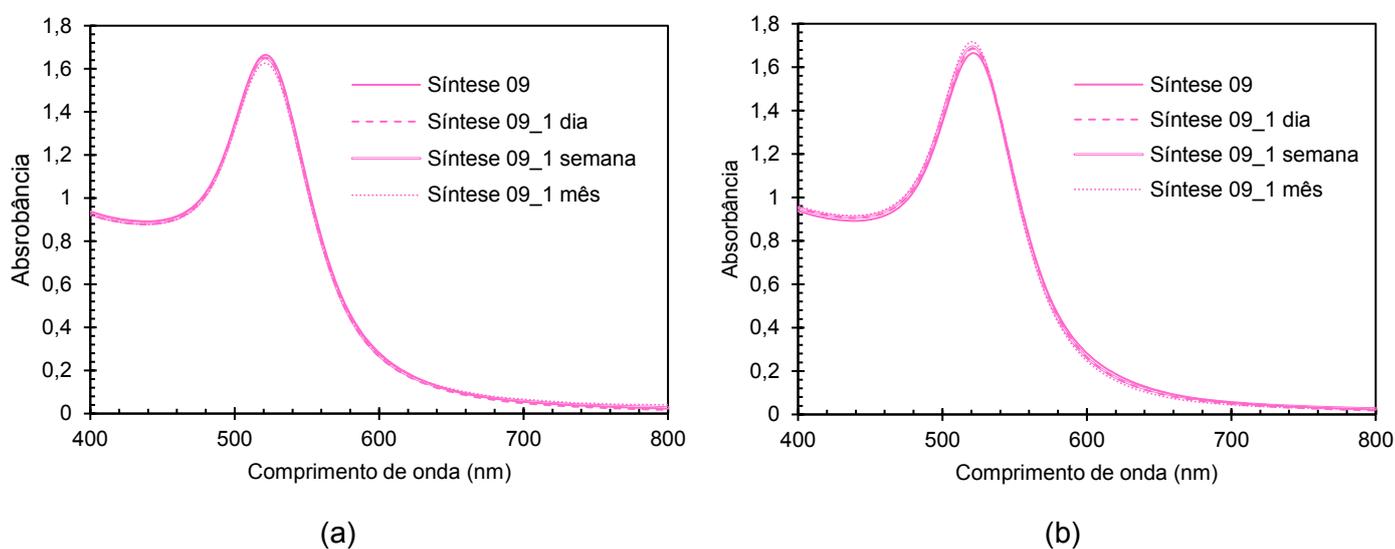
A maioria dos procedimentos experimentais publicados na literatura para a síntese de nanopartículas de ouro indicam que as soluções coloidais de AuNPs devem ser armazenadas em geladeira, a uma temperatura igual a aproximadamente 4 °C, a fim de evitar a sua degradação, mantendo-as conservadas por mais tempo (DA SILVA, 2016; COURA *et al.*, 2018; SHOKOUFI *et al.*, 2019). A estabilidade das soluções coloidais de AuNPs pode ser explicada através de dois mecanismos: a estabilização eletrostática e a estabilização estérica, ambas dependentes do meio no qual as nanopartículas estão inseridas.

No primeiro mecanismo, a estabilização das nanopartículas ocorre a partir de interações iônicas provocadas pela presença de moléculas carregadas na superfície das AuNPs que, por sua vez, causam a repulsão entre as partículas. No segundo mecanismo, em contrapartida, as interações são covalentes, devido à adsorção de reagentes poliméricos na superfície das nanopartículas (BIANCO, 2019). Na síntese das nanopartículas de ouro produzidas e estudadas nesse trabalho não foi adicionado aditivos poliméricos para a sua estabilização, uma vez que o método escolhido –

redução química com Citrato de Sódio – garantia a formação e estabilidade das AuNPs apenas com um reagente; assim, pode-se inferir que as interações entre as partículas presentes nas soluções coloidais 09 a 15 são puramente eletrostáticas.

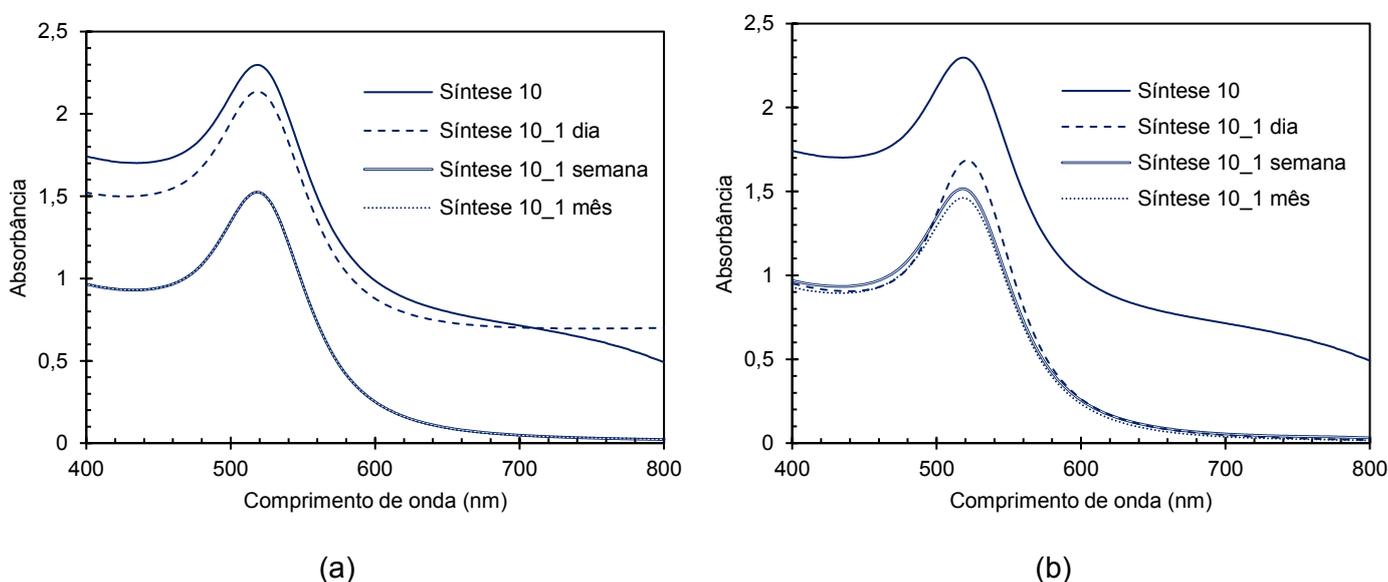
Avaliou-se nessa etapa do trabalho a estabilidade das soluções coloidais de AuNPs quando conservadas em geladeira e em temperatura ambiente, através da técnica de caracterização de Espectroscopia UV-visível, cujos espectros podem ser visualizados nas Figuras 50 a 56.

Figura 50 – Espectros de UV-visível da Síntese 09 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



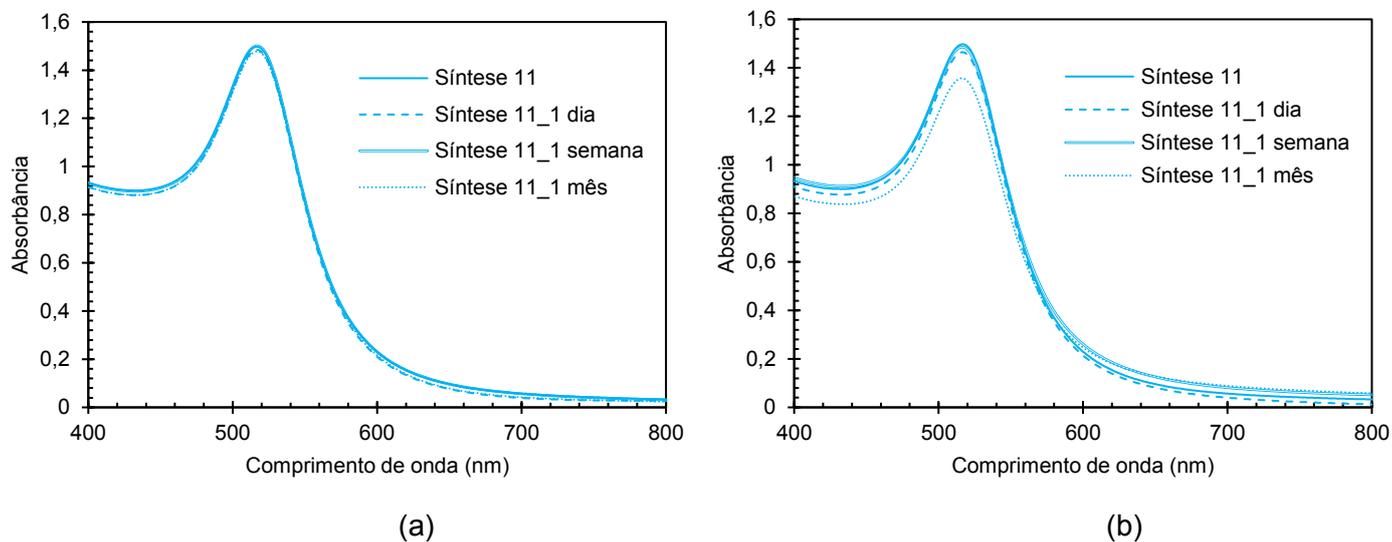
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 51 – Espectros de UV-visível da Síntese 10 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



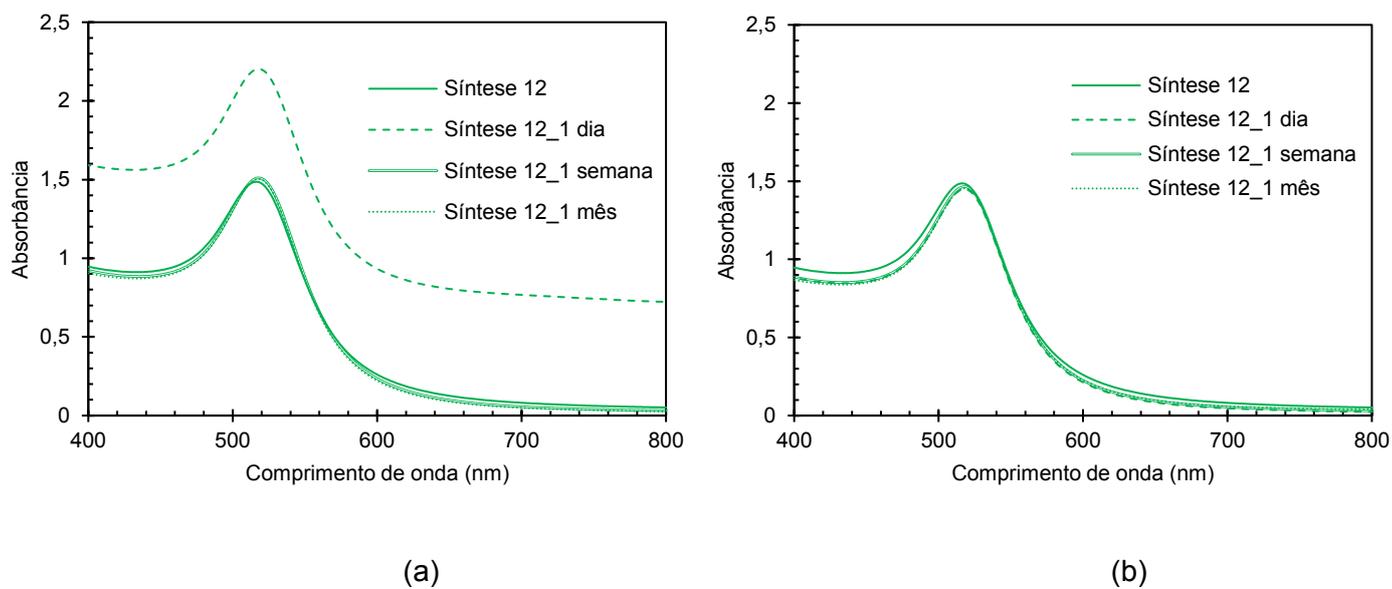
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 52 – Espectros de UV-visível da Síntese 11 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



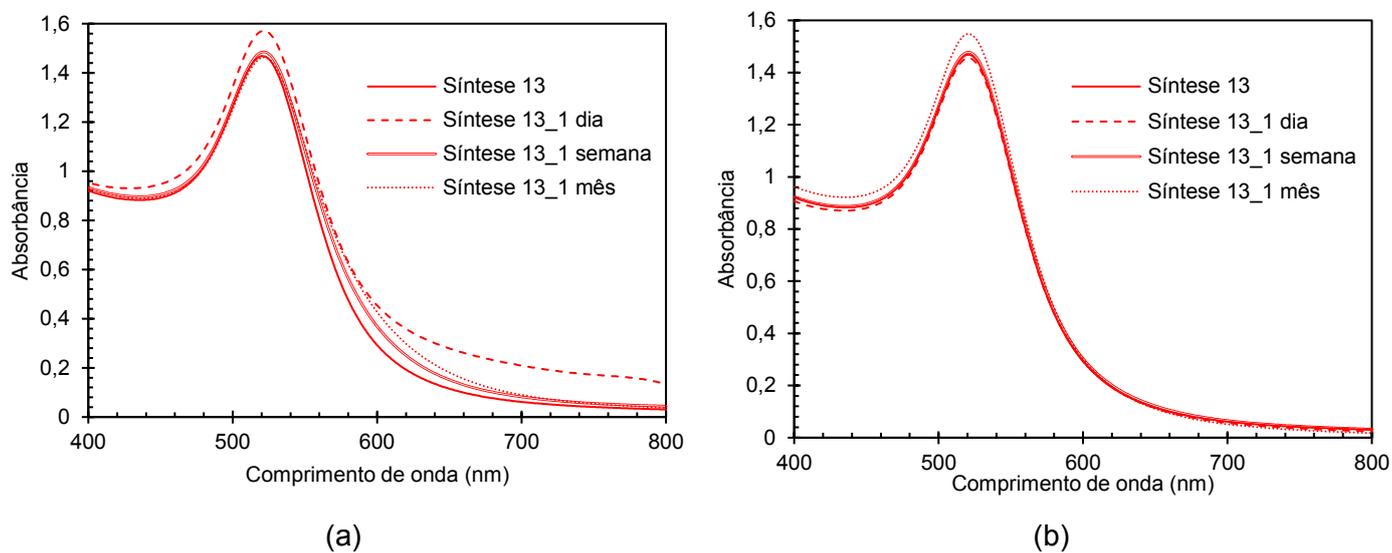
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 53 – Espectros de UV-visível da Síntese 12 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



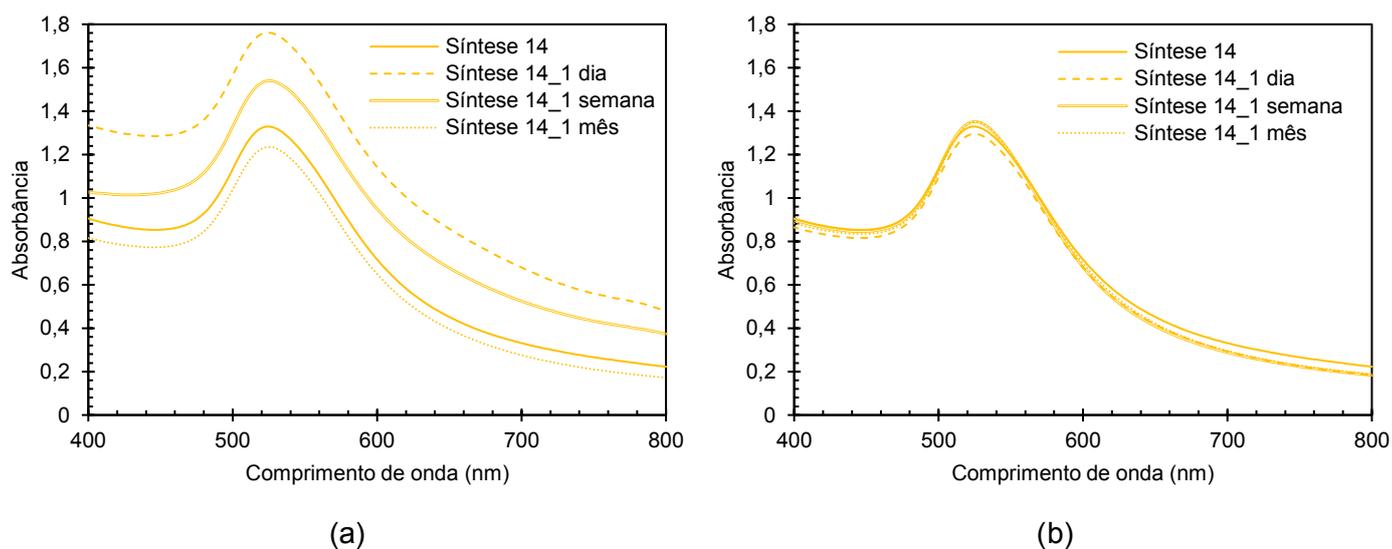
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 54 – Espectros de UV-visível da Síntese 13 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



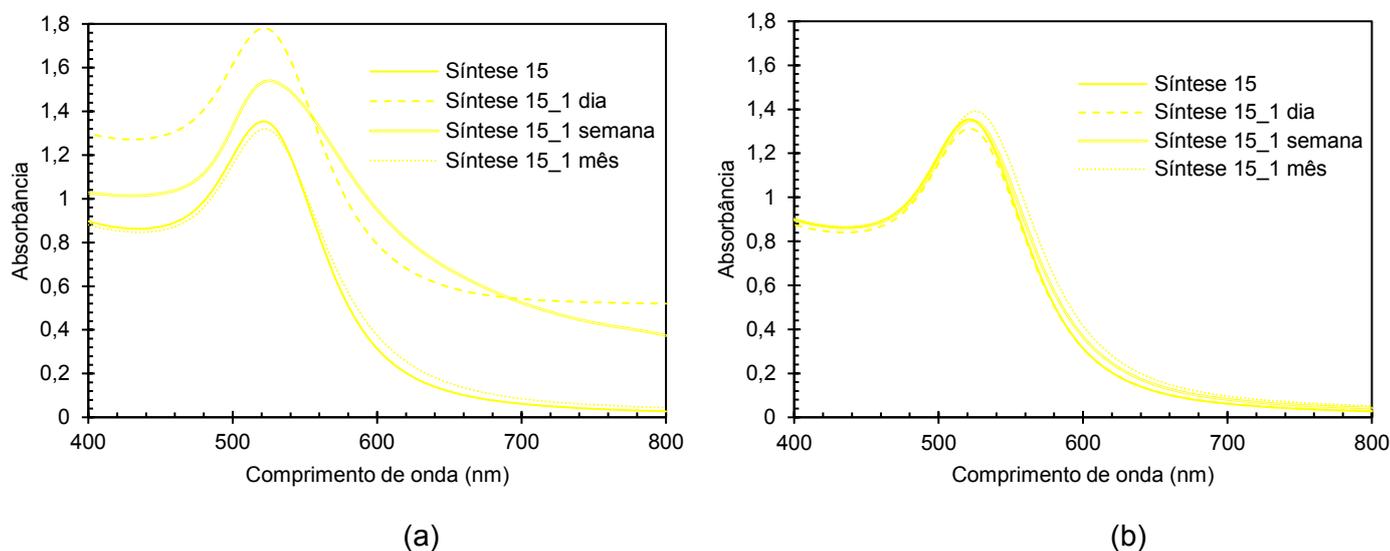
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 55 – Espectros de UV-visível da Síntese 14 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 56 – Espectros de UV-visível da Síntese 15 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



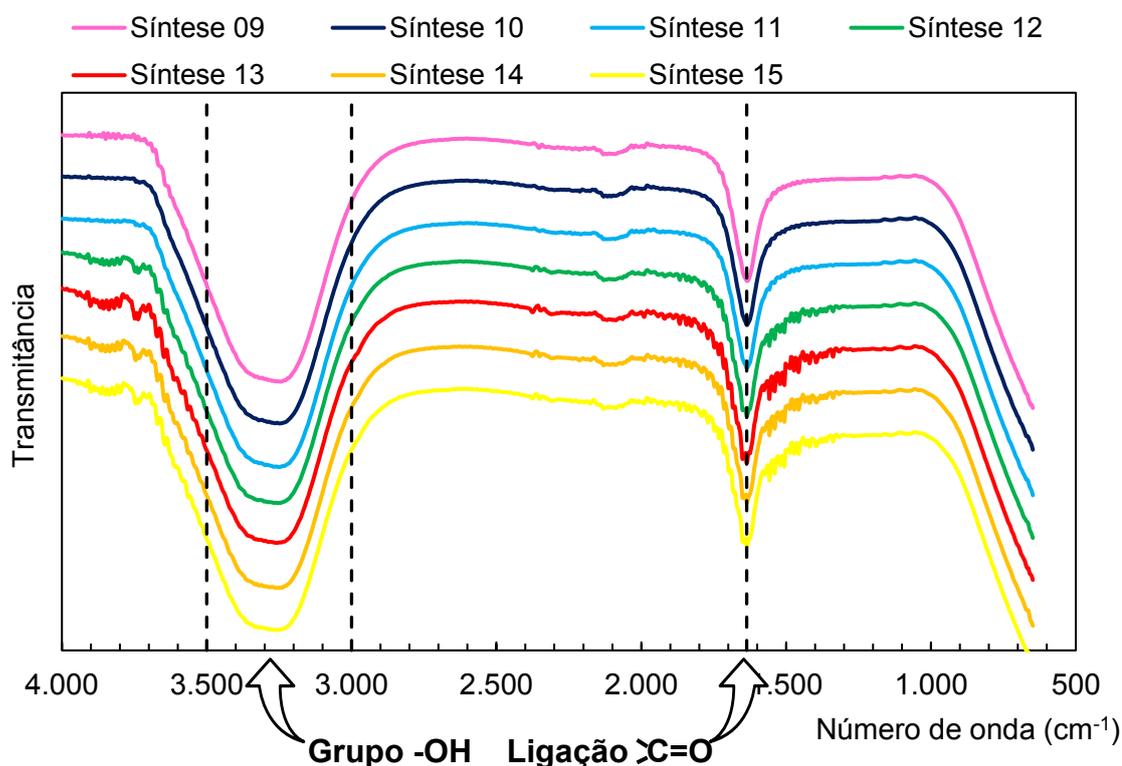
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

É possível identificar alterações nos espectros durante o período de armazenamento das soluções apenas nas Figuras 51 (Síntese 10), 53-a (Síntese 12), 55-a (Síntese 14) e 56-a (Síntese 15). Nos demais espectros, pode-se inferir que as soluções mantiveram a suas características (como nível de dispersão, número de nanopartículas formadas e tamanho) durante o período estudado. A redução na intensidade da banda de absorbância nos espectros (a) e (b) da Figura 51 está relacionado à formação de agregados que se depositaram ao fundo do recipiente onde a solução estava armazenada, reduzindo a concentração de nanopartículas em suspensão e, conseqüentemente, a intensidade da banda de absorção (FERREIRA, 2011). Nas Figuras 53-a, 55-a e 56-a, identifica-se um aumento na intensidade da banda de absorção apenas após 1 semana, para as amostras conservadas em geladeira, devido a uma possível continuidade da síntese nesse período, mas após 1 mês de conservação, as intensidades da banda de ressonância plasmônica de ambas as amostras (conservadas em geladeira e em temperatura ambiente) se aproximaram da intensidade medida logo após a síntese. Apesar dos resultados obtidos, decidiu-se manter as amostras armazenadas na geladeira, conforme indicação da literatura.

4.2.1.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)

A Figura 57 apresenta os espectros de ATR-FTIR das nanopartículas de ouro em solução, produzidas com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico comercial que compõem o estudo principal.

Figura 57 – Espectros de ATR-FTIR das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

É possível observar que os sete espectros apresentados na Figura 57 são semelhantes entre si, mostrando que não houve a formação de compostos diferentes entre uma síntese e outra, mesmo com a alteração dos parâmetros da reação (velocidade de agitação, velocidade de gotejamento e razão molar entre os reagentes). Além disso, identifica-se que os espectros possuem as mesmas bandas apresentadas anteriormente na Figura 44 (do capítulo 4.1.1.2 e que compõe o estudo preliminar). Essas bandas se referem à presença do grupo funcional hidroxila (-OH, banda entre 3.000 e 3.500 cm⁻¹) e da dupla ligação entre carbono e oxigênio (C=O, banda em 1.636 cm⁻¹) que podem ser encontradas na estrutura química do Ácido β-

cetoglutárico que é formado durante a reação de redução dos íons de Au³⁺ presentes no Ácido Cloroáurico em ouro metálico Au⁰ (SILVERSTEIN *et al.*, 2019).

4.2.1.4 Espelhamento de Luz Dinâmico (DLS) e índice de polidispersão (PDI)

A Tabela 9 apresenta a média dos diâmetros hidrodinâmicos obtidos pela análise de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), assim como os seus respectivos desvios padrões e o índice de Polidispersão (PDI) das soluções coloidais de nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico comercial.

Tabela 9 – Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão
Síntese 09	21,31 ± 0,52	0,35 ± 0,03
Síntese 10	76,46 ± 2,65	0,32 ± 0,02
Síntese 11	34,97 ± 1,48	0,25 ± 0,03
Síntese 12	78,72 ± 7,96	0,26 ± 0,06
Síntese 13	63,11 ± 1,33	0,34 ± 0,02
Síntese 14	38,16 ± 1,29	0,34 ± 0,03
Síntese 15	81,42 ± 1,67	0,29 ± 0,01

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A análise de Espectroscopia ultravioleta-visível revelou que as sínteses produzidas no estudo principal com Ácido Cloroáurico comercial como agente precursor do ouro e Citrato de Sódio como agente redutor geraram nanopartículas com tamanhos diferentes, uma vez que alguns parâmetros da síntese foram alterados. Entretanto, o comportamento evidenciado na análise de UV-vis foi diferente do comportamento observado pela análise de DLS, conforme os resultados presentes na Tabela 9. De acordo com os resultados da análise de DLS, dentre todas as sínteses produzidas, a Síntese 09 (1:5, 250 rpm) obteve o menor diâmetro hidrodinâmico, enquanto que pelos espectros da Figura 49 seria a Síntese 11 (1:5, 1500 rpm) (menor comprimento de onda). A técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico mede o diâmetro hidrodinâmico das partículas, isto é, o diâmetro de um núcleo inorgânico recoberto por

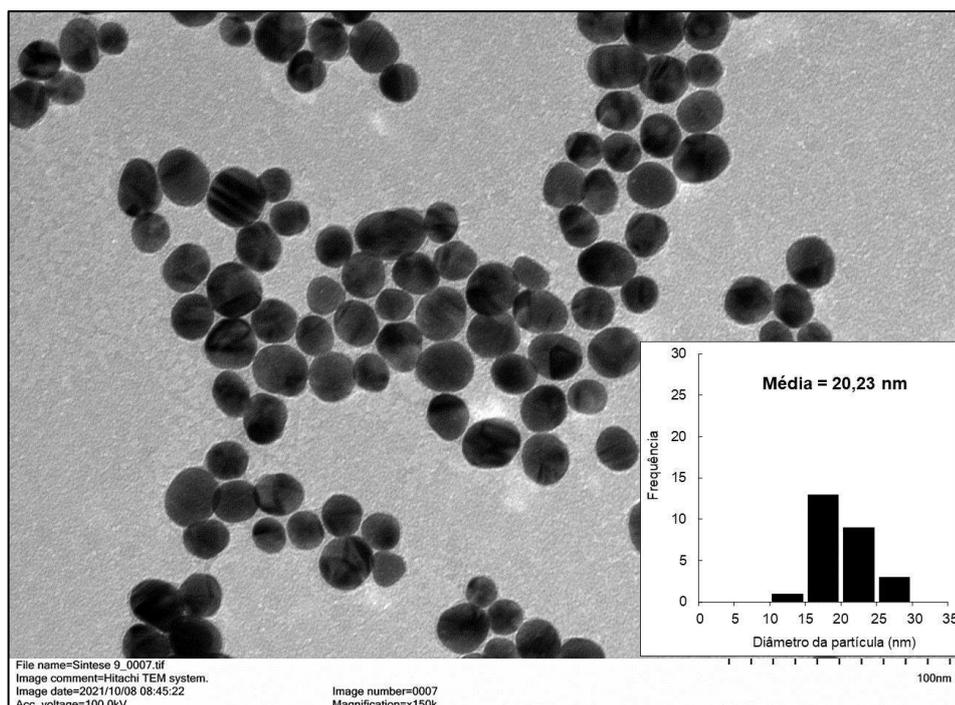
moléculas de revestimento e/ou camadas de solvente que estão ligadas às partículas, já que estas se encontram em um meio líquido. Em contrapartida, a análise de Espectroscopia ultravioleta-visível nos permite inferir sobre o tamanho das partículas “secas” que foram mensurados através da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (item 4.2.1.5).

Hackley & Clogston (2011) sugerem que o diâmetro hidrodinâmico derivado da técnica de DLS depende da concentração de sal no meio líquido em que as partículas estão dispersas. Segundo os autores, em meios líquidos com concentrações salinas muito baixas (por exemplo, em água deionizada ou ultrapura), a dupla camada elétrica que envolve as partículas causa uma diminuição no coeficiente de difusão e um aumento aparente no tamanho das partículas. Assim, mesmo que os resultados gerados pela referida análise não revelem o diâmetro somente da nanopartícula (partícula seca), é possível inferir que todas as sínteses produziram partículas com tamanho inferior a 100 nm, comprovando a obtenção de nanopartículas e a formação de uma solução coloidal. Além disso, os índices de polidispersão encontrados para todas as amostras são considerados aceitáveis e compreendem a faixa de polidispersividade média ($0,08 < PDI \leq 0,70$) conforme enquadramento proposto por Da Costa (2012).

4.2.1.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

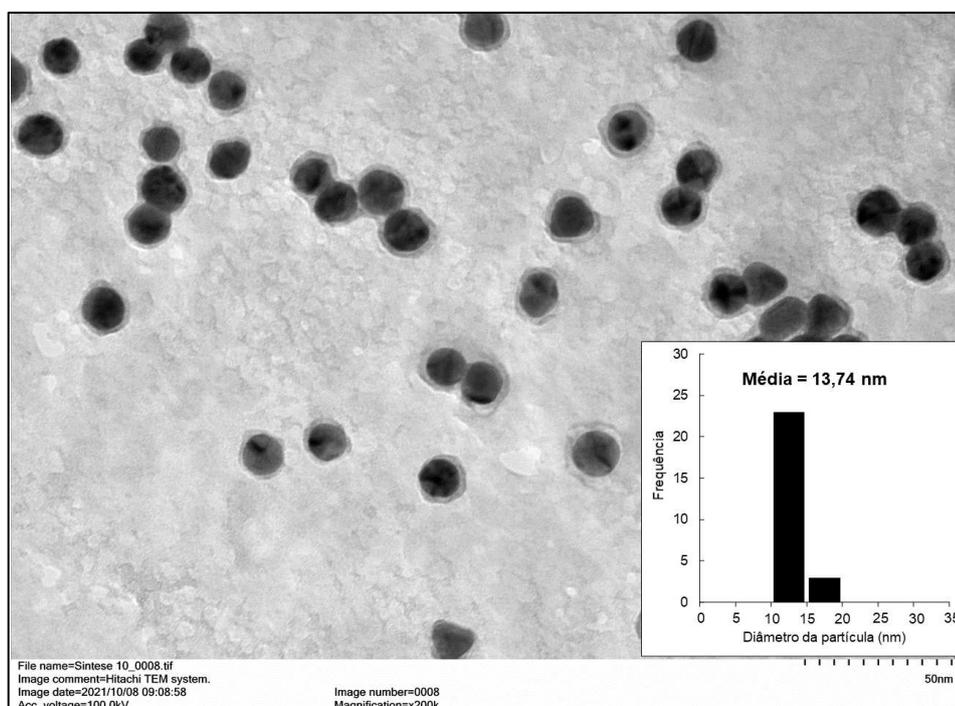
As Figuras 58 a 64 apresentam imagens da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão de cada síntese com ampliação original de 120 a 200k, e um histograma com a distribuição média de tamanhos das nanopartículas de ouro dispersas contabilizadas na imagem (a estimativa do tamanho médio de cada nanopartícula foi realizada com auxílio do software ImageJ).

Figura 58 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 09



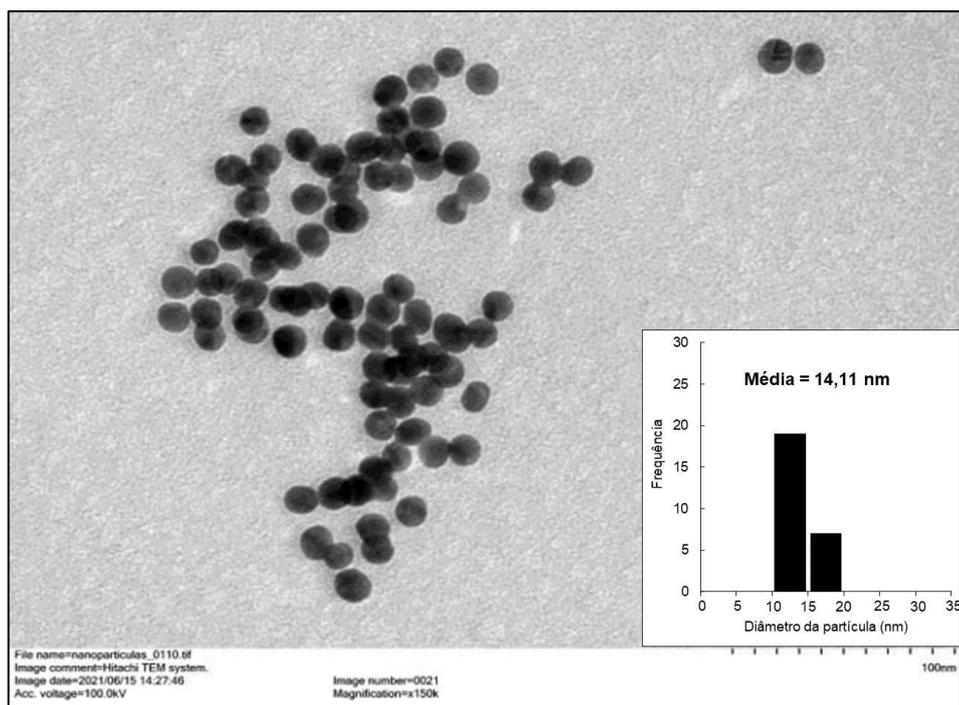
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 59 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 10



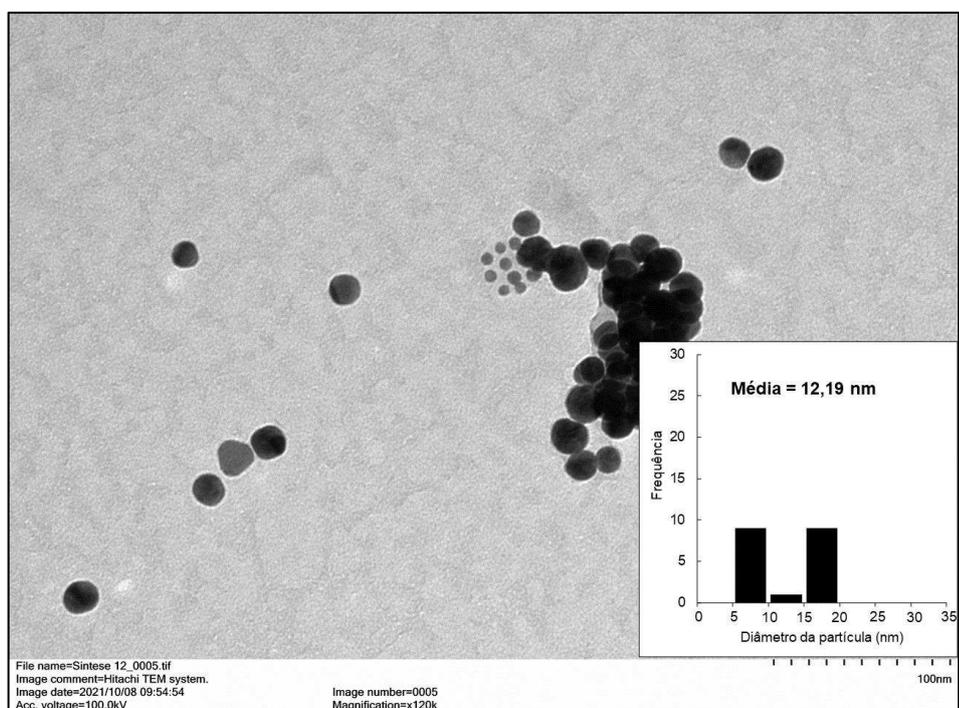
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 60 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 11



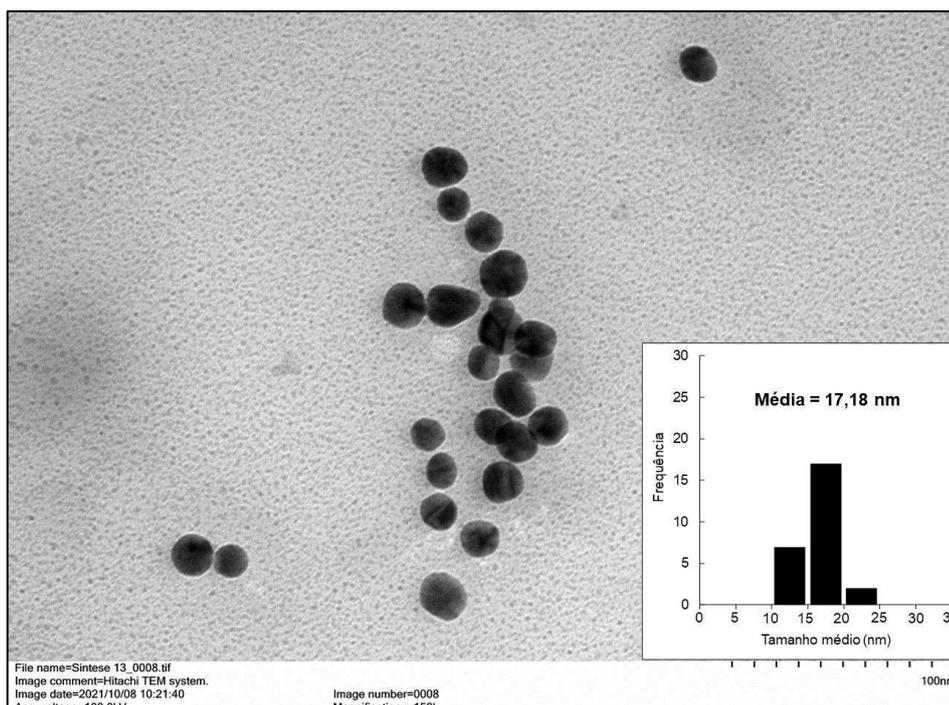
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 61 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 12



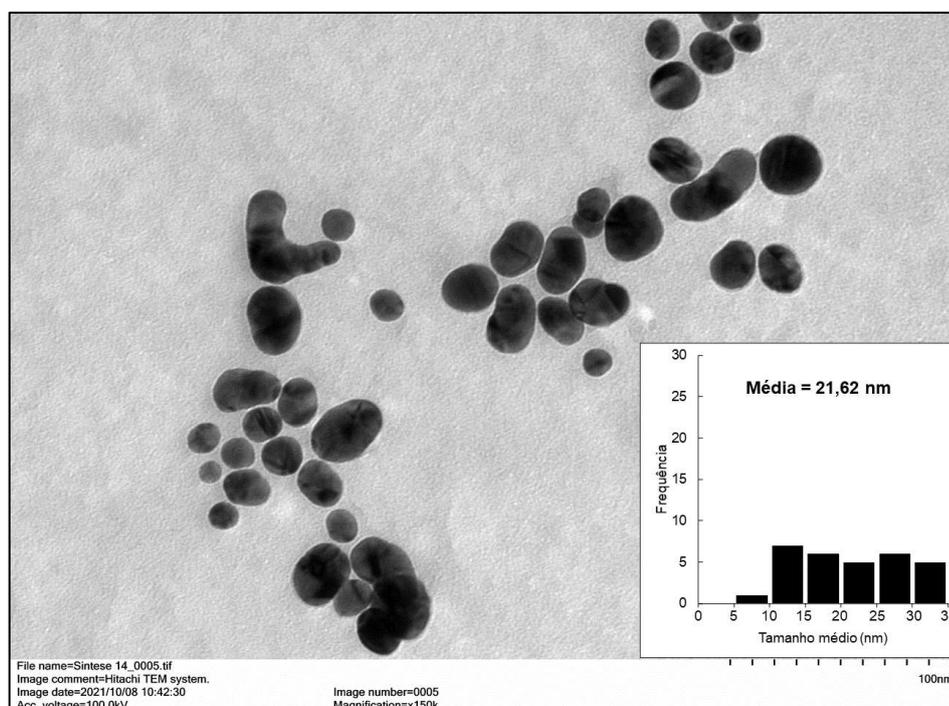
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 62 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 13



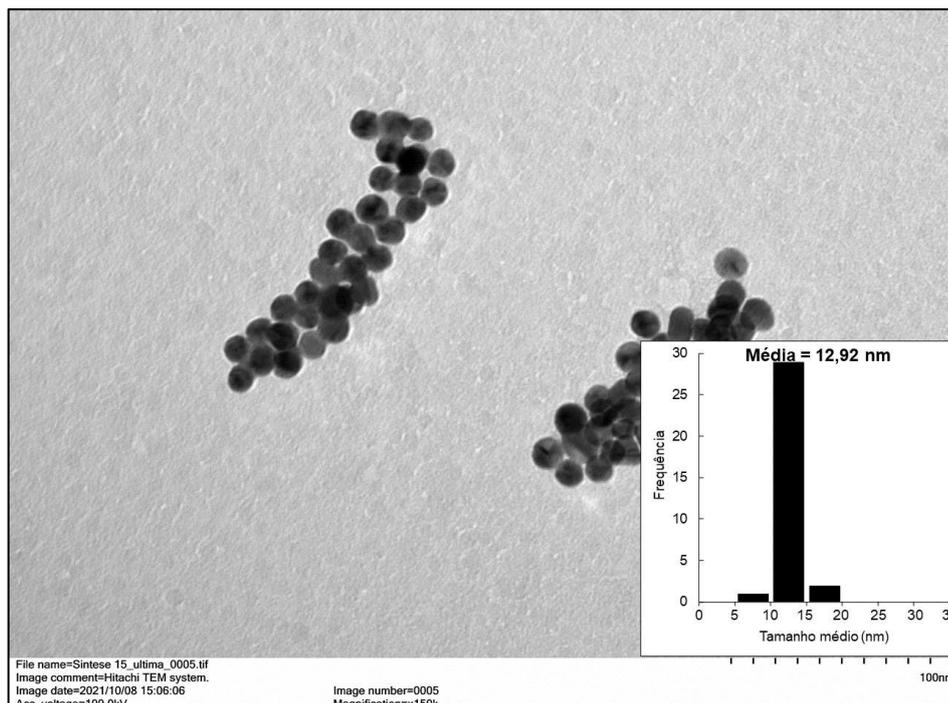
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 63 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 14



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 64 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Síntese 15



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observando as imagens, é possível inferir que as nanopartículas de ouro produzidas apresentam forma majoritariamente esférica, mas com algumas exceções no que diz respeito às Sínteses 09, 10, 13, 14 e 15, nas quais é possível identificar formas triangulares e bastonetes. Em especial, a Síntese 14 foi a que apresentou maior variabilidade de tamanho e formato das nanopartículas de ouro, que pode estar associado à velocidade de gotejamento do reagente redutor durante a síntese (1 mL/min), uma vez que esta foi a menor velocidade de adição do Citrato de Sódio dentre as formulações estudadas. A imagem de MET da Síntese 14 corrobora com os resultados discutidos anteriormente de que quanto menor a velocidade de adição do agente redutor sobre a solução precursora, menor será o número de núcleos de crescimento formados no início da reação que, por esse motivo, têm mais espaço para crescerem por um maior intervalo de tempo, além de que ao longo do tempo de adição do reagente redutor, são formados novos núcleos que crescerão menos, contribuindo para a variabilidade de tamanhos evidenciada.

A Síntese 11, por sua vez, foi a síntese que apresentou a maior homogeneidade no formato e tamanho das nanopartículas de ouro, assim como apresentou as AuNPs mais dispersas no meio, ao contrário da Síntese 12, por exemplo. Pode-se inferir que o tamanho médio das nanopartículas de ouro nesta amostra encontra-se na faixa de

12 a 18 nm, próximo do tamanho médio obtido pelas nanopartículas sintetizadas por Turkevich e colaboradores com os mesmos parâmetros experimentais de relação molar entre reagentes e velocidade de adição do agente redutor (DE SOUZA *et al.*, 2019; TURKEVICH *et al.*, 1951), além de condizer com as hipóteses criadas após a interpretação dos espectros de UV-visível.

4.2.1.6 Teste de concentração

A concentração das soluções coloidais de nanopartículas de ouro sintetizadas no estudo principal, através da redução química do Ácido Cloroáurico comercial com Citrato de Sódio, foi determinada a partir de um teste criado neste trabalho e descrito previamente no capítulo 3.6.6. Os resultados obtidos pelo teste realizado estão resumidos na Tabela 10 apresentada a seguir.

Tabela 10 – Teste de concentração das sínteses de AuNPs via Citrato de Sódio do estudo principal

Amostra	C (mg/mL)	$C_{mássica}$ (mg/mg)
Síntese 09	0,347±0,021	0,00035±2,04E-05
Síntese 10	0,867±0,065	0,00087±7,61E-05
Síntese 11	0,827±0,096	0,00084±1,09E-04
Síntese 12	1,510±0,046	0,00150±5,61E-05
Síntese 13	2,867±0,042	0,00288±3,68E-05
Síntese 14	2,897±0,015	0,00293±2,16E-05
Síntese 15	2,640±0,079	0,00263±7,50E-05

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

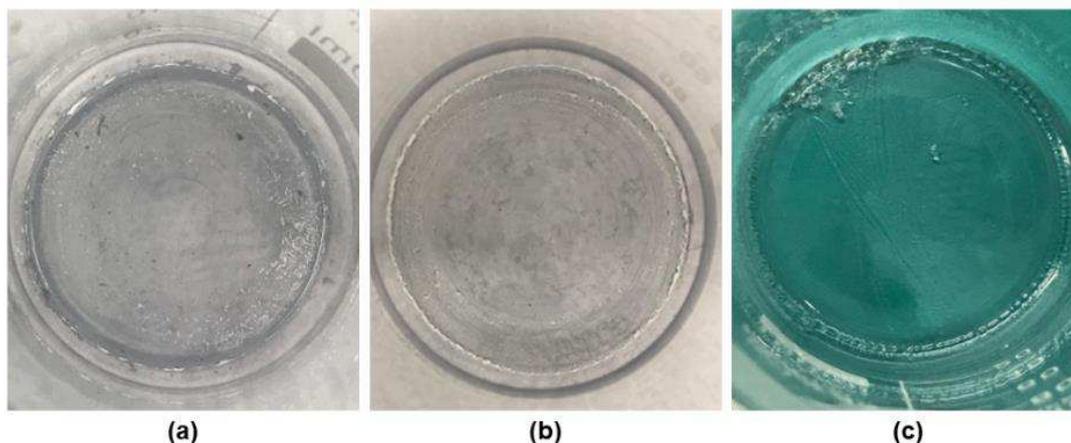
Primeiramente, evidencia-se um comportamento esperado entre as sínteses 09, 10 e 11, nas quais a redução do tamanho das nanopartículas gerou uma solução coloidal mais concentrada.

Em contrapartida, a partir as amostras 12, 13, 14 e 15, que de acordo com os espectros de UV-vis (Figura 49) revelaram nanopartículas maiores, resultaram em soluções coloidais mais concentradas do que as amostras 09, 10 e 11. O

comportamento obtido nessas sínteses deve-se à possível aglomeração das nanopartículas presentes na solução, principalmente na Síntese 14 (que apresentou maior concentração em volume e massa), cuja forma larga e o deslocamento para a direita da banda de ressonância plasmônica comprova a presença de nanopartículas aglomeradas (GHOSH & PAL, 2007) e, portanto, gera uma solução com uma massa de sólidos para um mesmo volume maior do que as soluções coloidais com as nanopartículas totalmente dispersas.

Excepcionalmente, a Síntese 15 passou por duas etapas de secagem durante a realização desse teste, uma vez que após a primeira etapa (3 horas em estufa à vácuo, a 70 °C), observou-se pontos luminosos no fundo do béquer que poderiam ser resquícios de solvente. Logo, optou-se por secar a amostra por mais 3 horas e o resultado obtido ainda apresentava alguns pontos luminosos. Mediante análise visual e a pesagem da amostra em ambas as etapas de secagem, verificou-se que a mesma estava completamente seca e que, na verdade, havia se formado um filme (película) de nanopartículas no fundo do béquer. Vale lembrar que na Síntese 15 foi adicionada uma maior quantidade de Citrato de Sódio no meio reacional, em uma proporção molar 1:20 em relação ao Ácido Cloroáurico, contribuindo para a formação de um filme fino e transparente no fundo da vidraria, conforme evidenciado na Figura 65.

Figura 65 – Registro do filme formado após secagem em estufa a 70 °C sob vácuo da Síntese 15 durante 3 horas (a) e 6 horas (b), e da solução de Citrato de Sódio (c)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

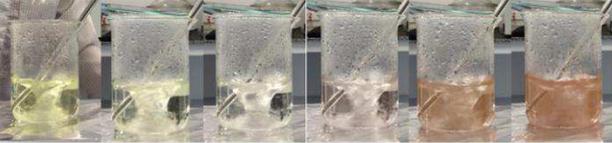
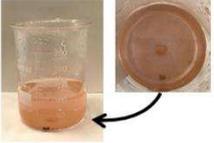
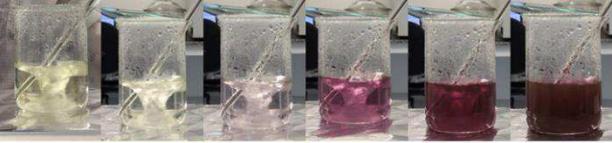
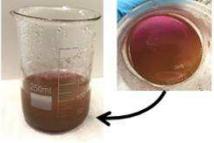
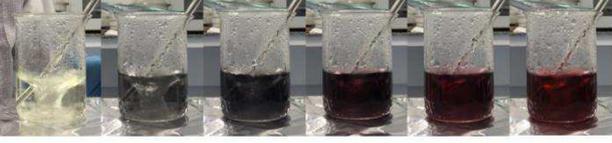
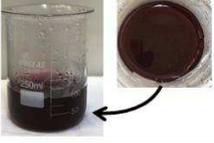
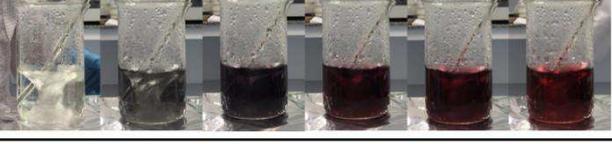
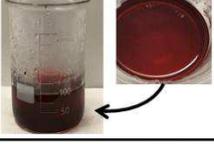
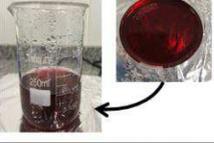
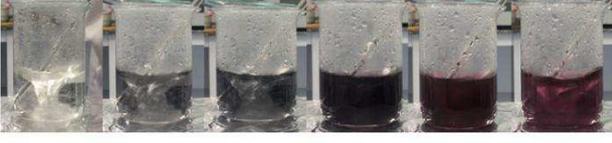
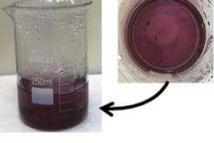
4.2.2 Síntese de AuNPs via redução química com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico produzido a partir de ouro metálico

Com base nos resultados apresentados anteriormente, foi possível avaliar a influência de alguns parâmetros, como velocidade de agitação e velocidade de adição do agente redutor, na estabilidade, tamanho, formato e distribuição das nanopartículas de ouro sintetizadas. Dessa forma, evidenciou-se que a síntese de AuNPs conduzida com 1500 rpm de agitação e sem gotejamento do reagente redutor sobre a solução precursora promoveu a formação de nanopartículas com homogeneidade de tamanhos, na faixa de 12 – 18 nm, com formato majoritariamente esférico e com adequada dispersão (ausência de aglomerados) (referência à Síntese 11).

Assim, partindo dos parâmetros consolidados no estudo anterior e referidos acima, decidiu-se estudar o processo de síntese de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro, no qual utiliza-se ouro metálico como precursor em substituição ao reagente comercial, o Ácido Cloroáurico, com o objetivo de reduzir o custo total da síntese e de utilizar amostras de ouro que não poderiam ser comercializadas, uma vez que com 140 mg de ouro metálico é possível produzir 2 L de solução coloidal de nanopartículas de ouro (dado extraído do rendimento da síntese realizada neste trabalho).

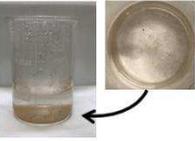
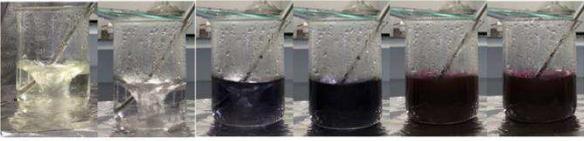
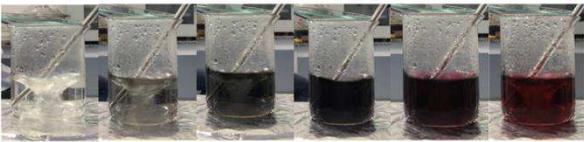
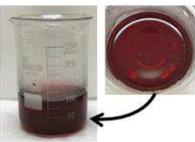
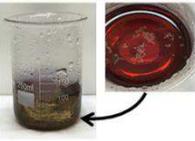
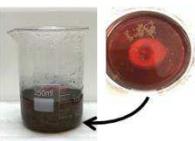
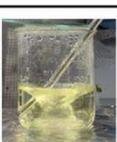
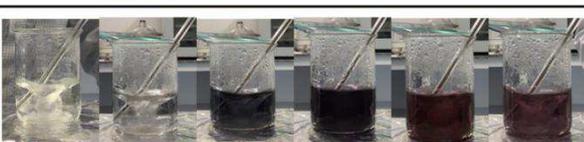
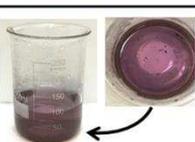
As Figuras 66 e 67 apresentam um compilado de imagens registradas durante a síntese das nanopartículas de ouro executadas nessa etapa, mostrando as alterações de coloração das soluções ocorridas ao longo do processo.

Figura 66 – Registro da síntese de AuNPs pelo método de reciclagem de ouro
(amostra de ouro do itt Chip)

Síntese	Ácido Cloroáurico + Água ultrapura	Adição do agente redutor + Aquecimento e agitação ($\Delta t=20$ min)	Registro da solução final
16			
17			
18			
19			
20			
21			

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 67 – Registro da síntese de AuNPs pelo método de reciclagem de ouro (amostra de ouro da Feevale)

Síntese	Ácido Cloroáurico + Água ultrapura	Adição do agente redutor + Aquecimento e agitação ($\Delta t=20$ min)	Registro da solução final
22			
23			
24			
25			
26			
27			

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Conforme apresentado nas Figura 66 e 67, é possível identificar que a relação molar 1:5, definida como a relação ideal em muitos trabalhos científicos (TURKEVICH *et al.*, 1951; DA SILVA, 2016), gerou uma solução coloidal de coloração alaranjada que instantaneamente após o término da síntese, teve suas partículas decantadas e o líquido perdeu a coloração. Esse comportamento é descrito na literatura como característico de soluções coloidais com AuNPs de tamanho médio superior a 80 nm. Ao aumentar a relação molar entre os reagentes para 1:10, 1:20 e 1:40, observa-se uma alteração na coloração das soluções que passam a rosa/roxo e vermelho, respectivamente.

Segundo o exposto na literatura, o tamanho das nanopartículas e o número de aglomerados diminuem quanto maior for a concentração de Citrato de Sódio na

solução em relação à concentração dos íons de Au^{3+} provenientes do agente precursor (FRENS, 1973; GIRI, 2017; GRASSESCHI, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Logo, pode-se inferir que o comportamento obtido entre as Sínteses 16 (1:5), 17 (1:10), 18 (1:20), 19 (1:40) e 20 (1:60) produzidas com a amostra de ouro do itt Chip e entre as sínteses 22 (1:5), 23 (1:10), 24 (1:20), 25 (1:40) e 26 (1:60) produzidas com a amostra de ouro da Feevale está ao encontro com o comportamento reportado nas referências citadas.

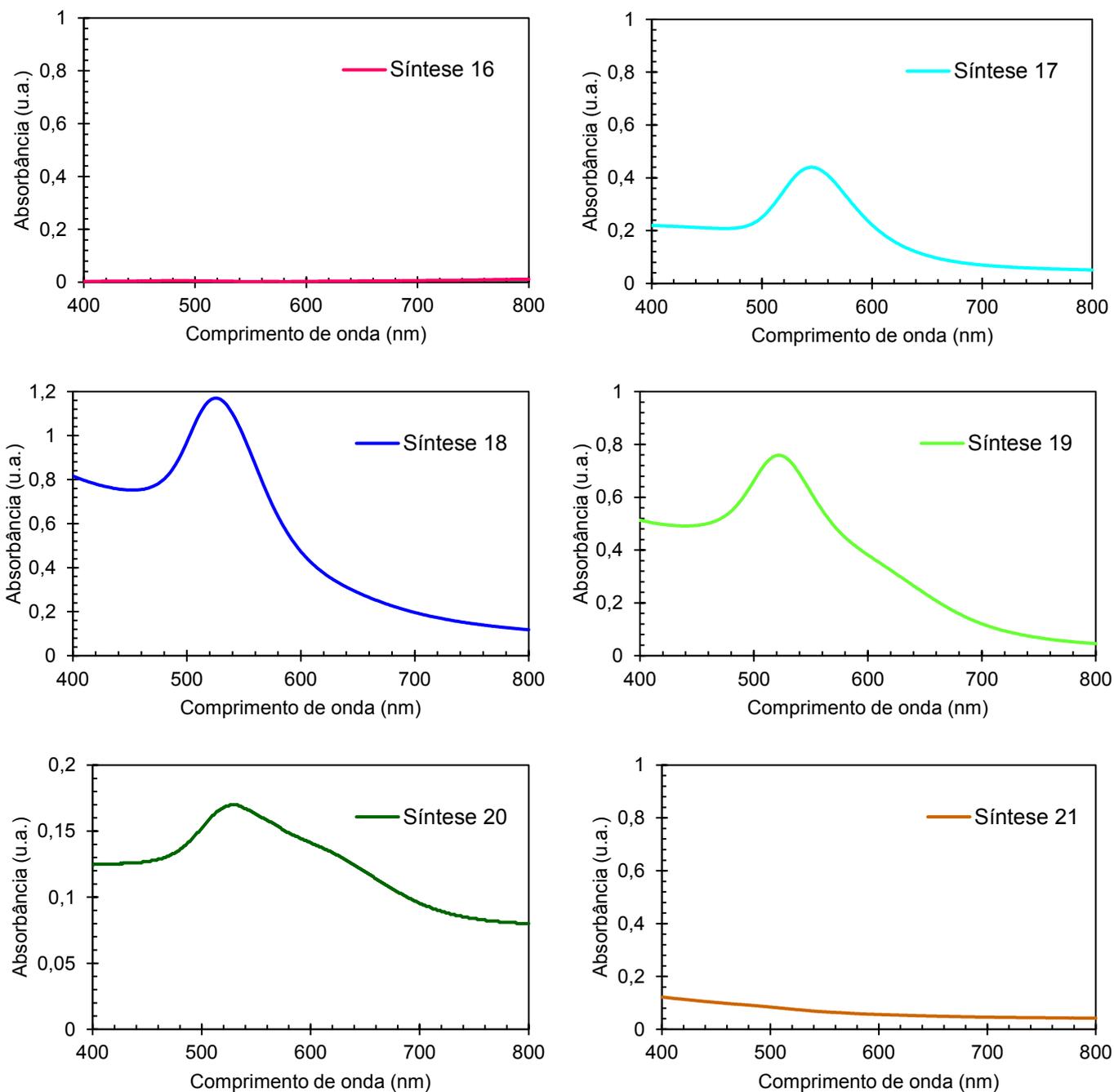
No entanto, entre as Sínteses 20 (1:60) e 21 (1:80), e as Sínteses 26 (1:60) e 27 (1:80) observa-se que o aumento da concentração de Citrato de Sódio (agente redutor) em relação ao Ácido Cloroáurico (agente precursor) produziu soluções coloidais com tamanhos de partículas maiores, visualmente caracterizadas por uma solução com coloração roxa e presença de aglomerados.

Assim, pode-se concluir que existe uma relação molar ideal entre os reagentes e que maiores ou menores concentrações do agente redutor na solução contribui para um aumento no tamanho das nanopartículas de ouro que, por sua vez, reduz a estabilidade da solução coloidal e aumenta a geração de aglomerados. Ainda, a relação molar definida como ideal depende do agente precursor dos íons de Au^{3+} utilizado na síntese das AuNPs, sendo 1:5 a relação molar ideal quando é utilizado o reagente comercial e 1:20 quando são utilizadas amostras de ouro metálico para a produção do Ácido Cloroáurico *in situ* durante o processo.

4.2.2.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis)

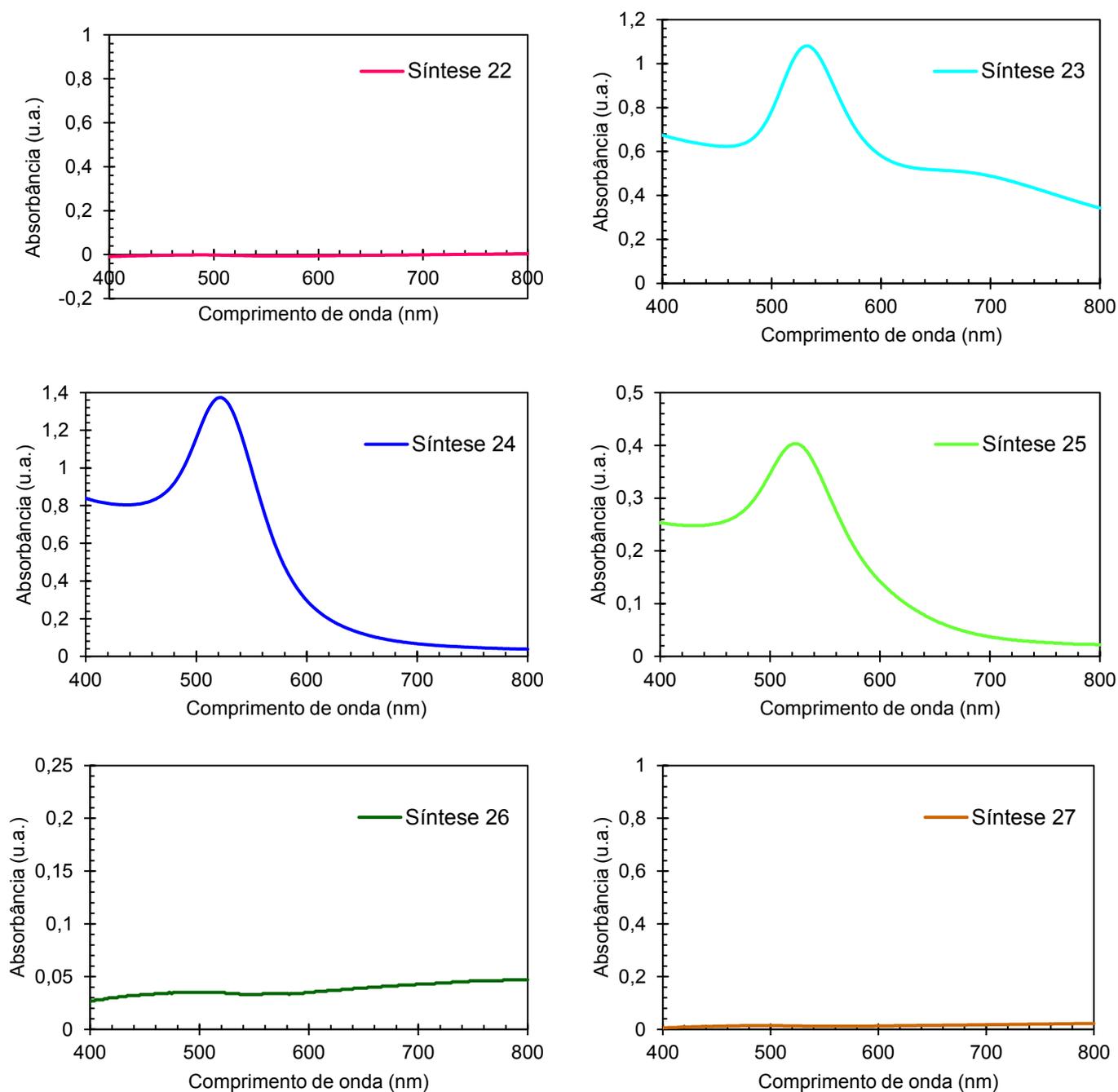
As Figuras 68 e 69 apresentam os espectros na região do UV-visível das soluções coloidais de AuNPs sintetizadas pelo método de reciclagem do ouro e na Tabela 11 são apresentados os comprimentos de onda da banda de ressonância plasmônica identificados para cada uma das amostras.

Figura 68 - Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro do itt Chip)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 69 - Espectros de UV-visível das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro da Feevale)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 11 - Comprimento de onda da banda de ressonância plasmônica das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro

Identificação da amostra	$\lambda_{\text{máx.abs.}}$ (nm)	Absorbância
Síntese 16	-	-
Síntese 17	545,00	0,440
Síntese 18	525,50	1,170
Síntese 19	522,00	0,759
Síntese 20	528,00	0,170
Síntese 21	-	-
Síntese 22	-	-
Síntese 23	532,50	1,080
Síntese 24	522,00	1,374
Síntese 25	523,00	0,403
Síntese 26	-	-
Síntese 27	-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observando as Figuras 68 e 69, e a Tabela 11, identifica-se a presença de uma banda máxima de absorção entre 500 e 550 nm somente nas Sínteses 17 (1:10), 18 (1:20), 19 (1:40) e 20 (1:60) produzidas com amostra de ouro do itt Chip e nas Sínteses 23 (1:10), 24 (1:20) e 25 (1:40) com amostra de ouro da Feevale, comprovando a redução dos íons de ouro Au^{3+} em ouro metálico Au^0 e a consequente formação das nanopartículas de ouro para as referidas sínteses (DA SILVA, 2016). Além disso, pode-se verificar que ao aumentar a concentração de Citrato de Sódio no meio reacional, o comprimento de onda de máxima absorvância entre as Sínteses 17, 18 e 19, e entre as Sínteses 23 e 24 diminuiu, podendo ser relacionado à redução do tamanho médio das nanopartículas (TOMA & BONIFÁCIO, 2005; KELLY *et al.*, 2003; LINK & EL-SAYED, 2000; SRIVASTAVA *et al.*, 2005; TEMPLETON *et al.*, 2000), comprovando o exposto na literatura (FRENS, 1973; GIRI, 2017; GRASSESCHI, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Por outro lado, o aumento na concentração de Citrato de Sódio no meio reacional das Sínteses 20 e 25 geraram comprimentos de onda de máxima absorvância maiores do que em relação às sínteses anteriores (19 e 24 respectivamente), retomando o comportamento obtido no estudo principal com a

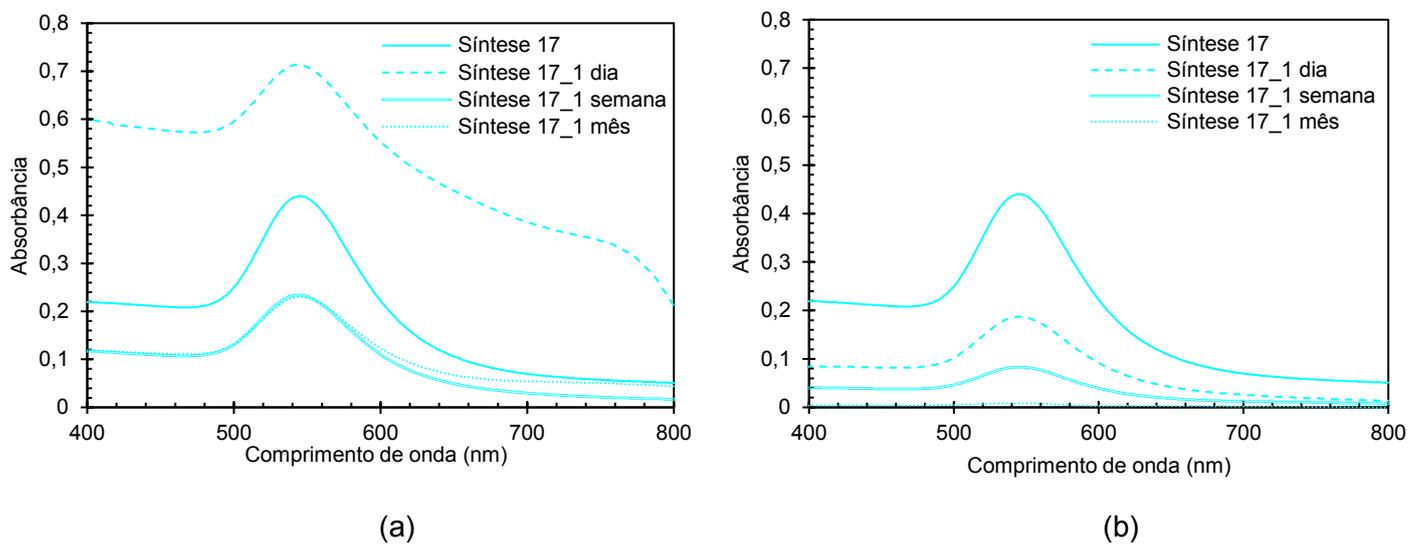
síntese de AuNPs utilizando Ácido Cloroáurico comercial. Portanto, com base no resultado obtido pela caracterização pode-se confirmar a hipótese levantada na análise visual das soluções quanto à existência de uma relação molar ideal entre o Ácido Cloroáurico (precursor) e o Citrato de Sódio (agente redutor) a ser utilizada durante a síntese, sendo que o aumento ou, também, a redução da concentração do agente redutor na solução contribui para um aumento no tamanho médio das nanopartículas de ouro.

Ao analisar as Sínteses 16 (itt Chip, 1:5), 21 (itt Chip, 1:80), 22 (Feevale, 1:5), 26 (Feevale, 1:60) e 27 (Feevale, 1:80), por sua vez, observou-se que as soluções haviam perdido a sua coloração e as nanopartículas sintetizadas aglomeraram e decantaram para o fundo do frasco onde as soluções foram condicionadas. Assim, para estas sínteses, não foi obtida a banda de máxima absorbância entre 500 e 550 nm, característica do ouro metálico.

4.2.2.2 Análise de estabilidade

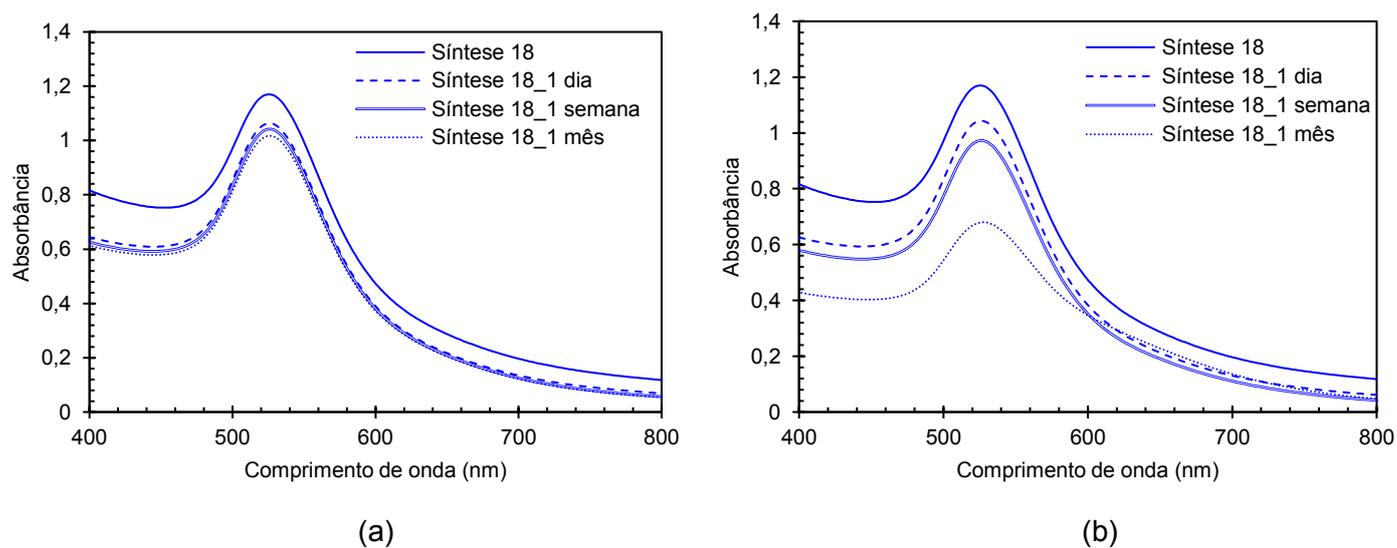
Avaliou-se a estabilidade das soluções coloidais de AuNPs produzidas com ouro metálico quando conservadas em geladeira e em temperatura ambiente, através da técnica de Espectroscopia UV-visível, cujos espectros podem ser visualizados nas Figuras 70 a 76. Foram analisadas as sínteses que apresentaram a banda de máxima absorbância entre 500 e 550 nm na análise de UV-visível discutida na seção anterior, com objetivo de avaliar a redução ou aumento dessa banda em tempos determinados (1 dia, 1 semana e 1 mês) após ocorrida a preparação da síntese.

Figura 70 – Espectros de UV-visível da Síntese 17 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



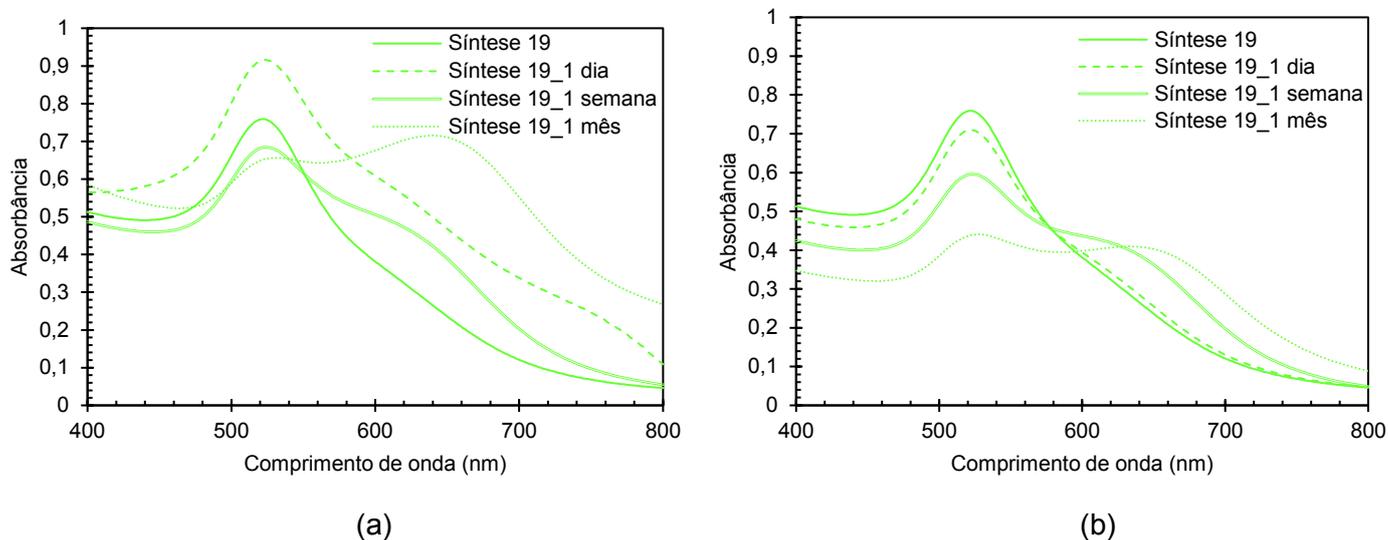
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 71 – Espectros de UV-visível da Síntese 18 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



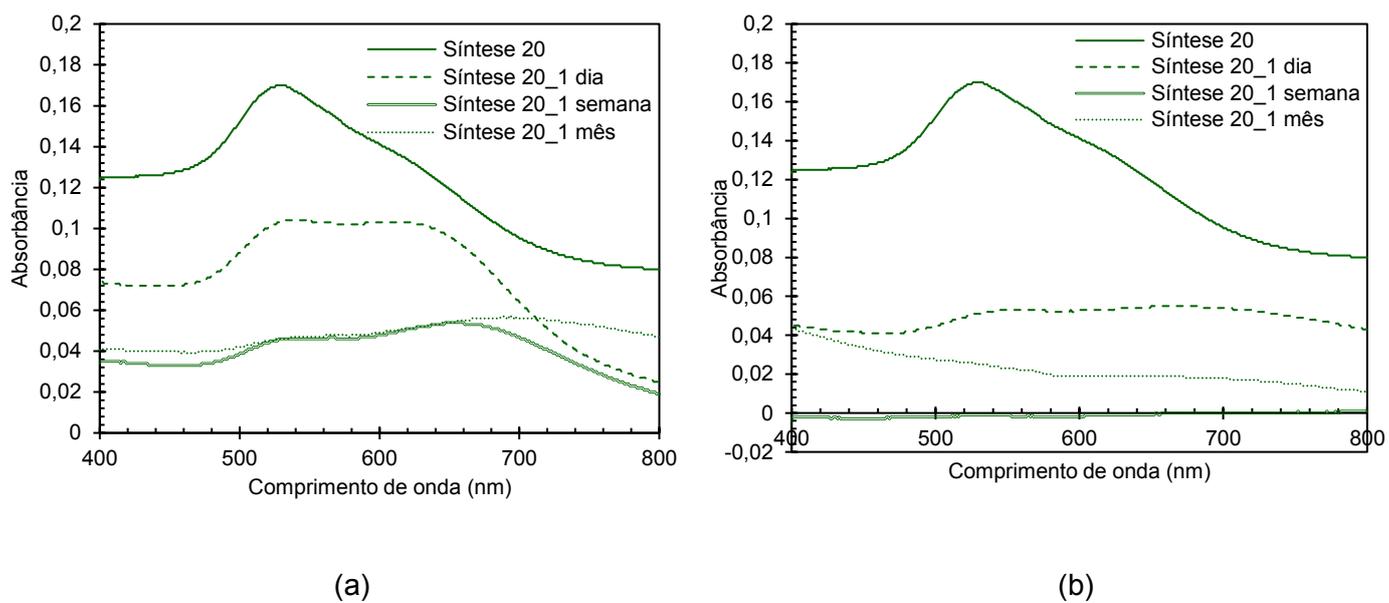
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 72 – Espectros de UV-visível da Síntese 19 conservada em: (a) geladeira e
(b) temperatura ambiente



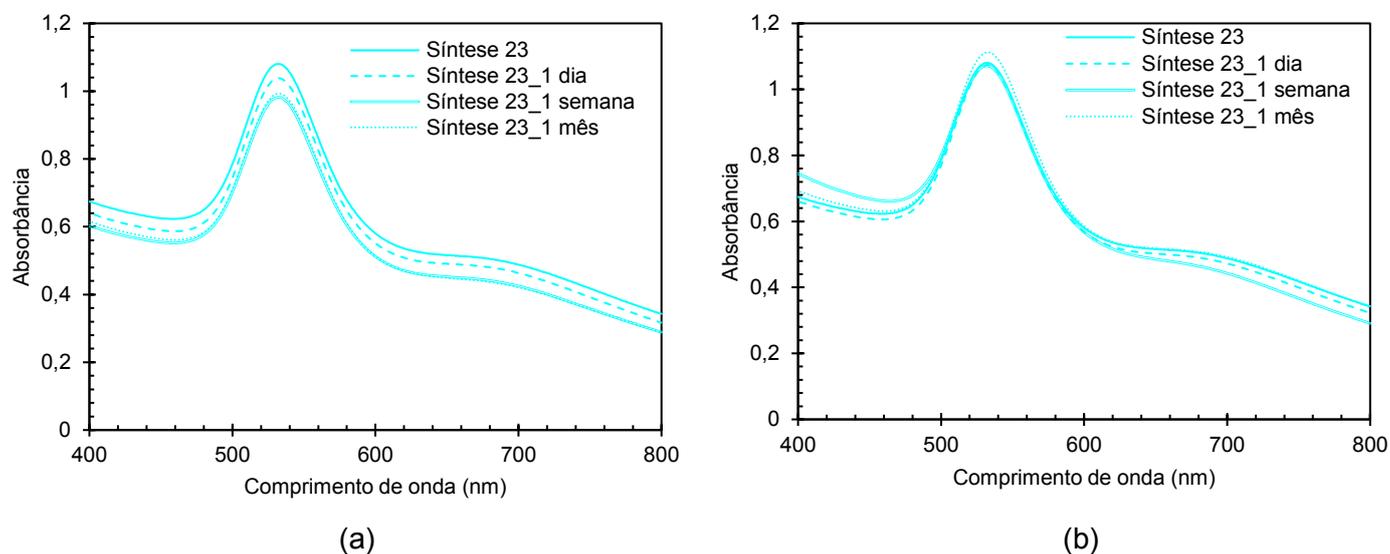
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 73 – Espectros de UV-visível da Síntese 20 conservada em: (a) geladeira e
(b) temperatura ambiente



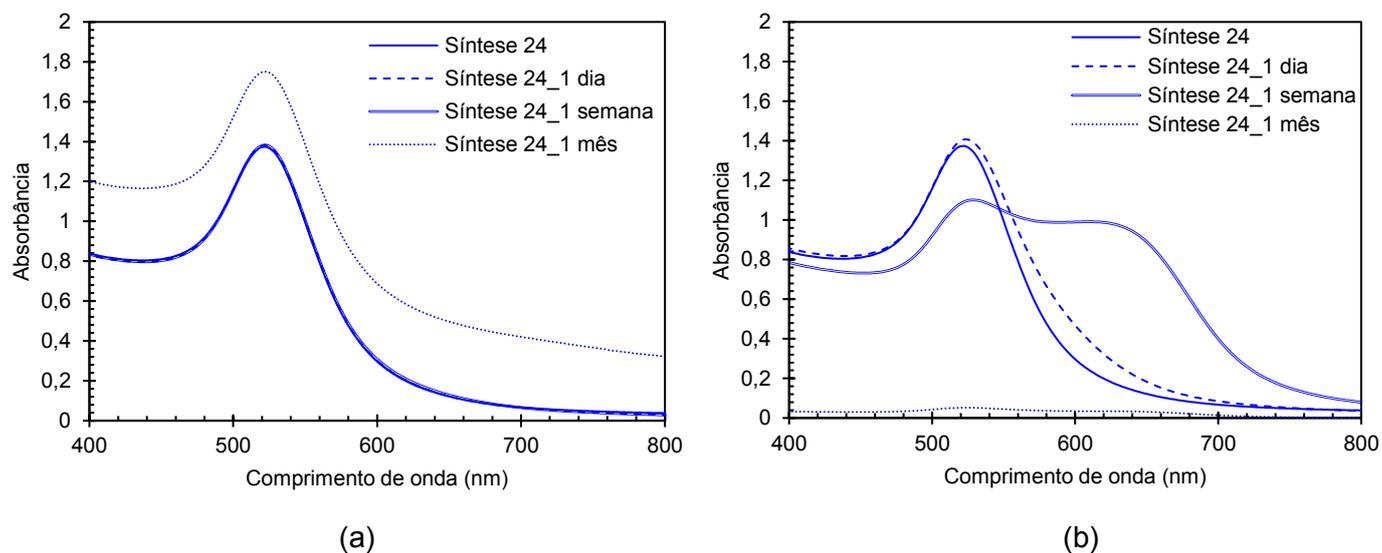
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 74 – Espectros de UV-visível da Síntese 23 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



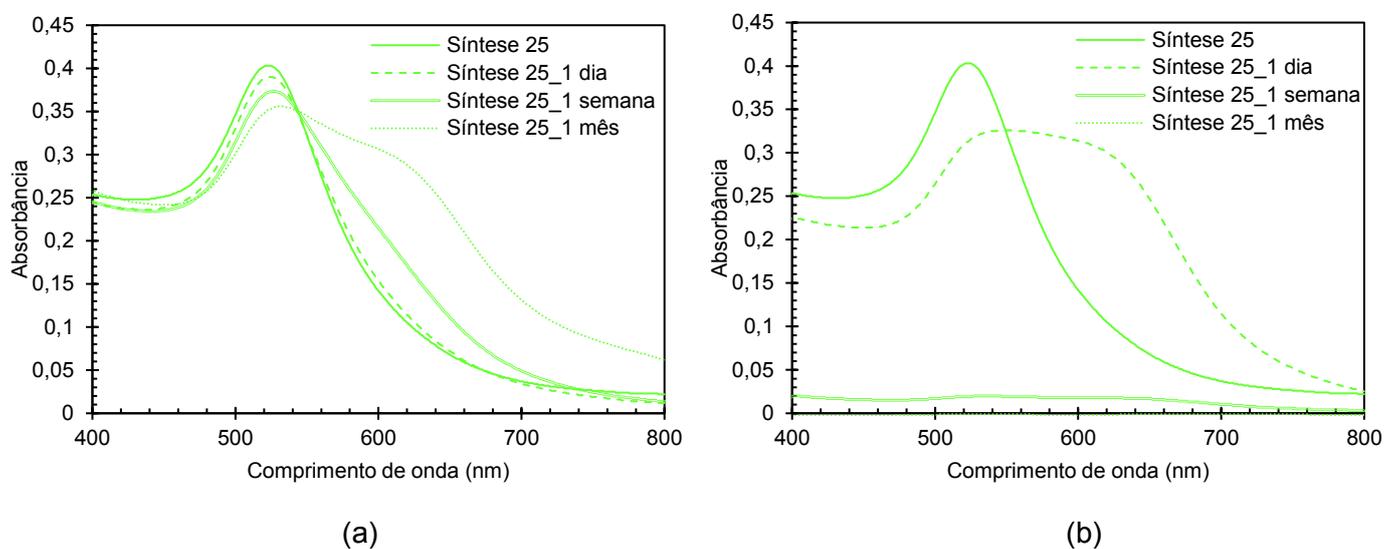
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 75 – Espectros de UV-visível da Síntese 24 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

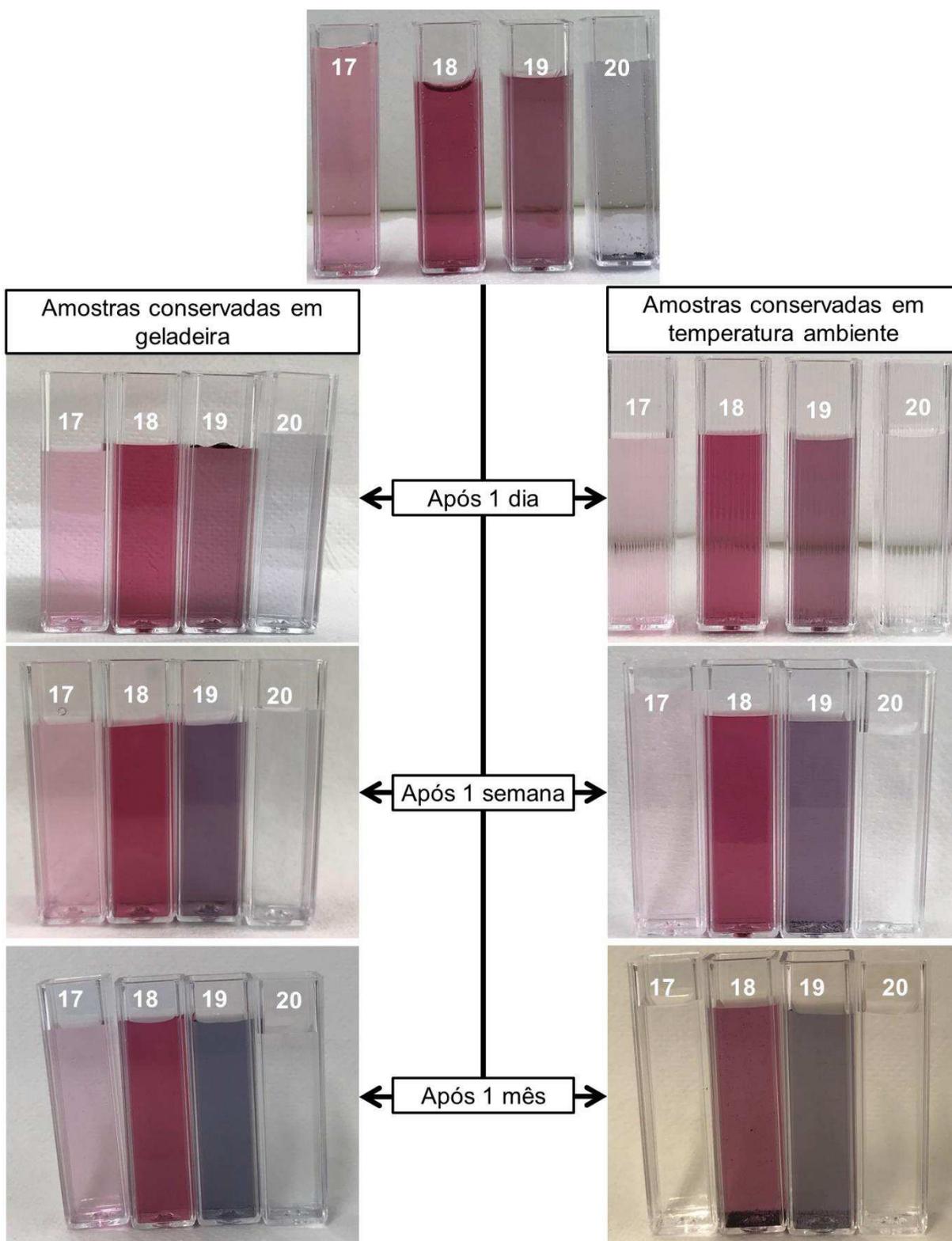
Figura 76 – Espectros de UV-visível da Síntese 25 conservada em: (a) geladeira e (b) temperatura ambiente



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

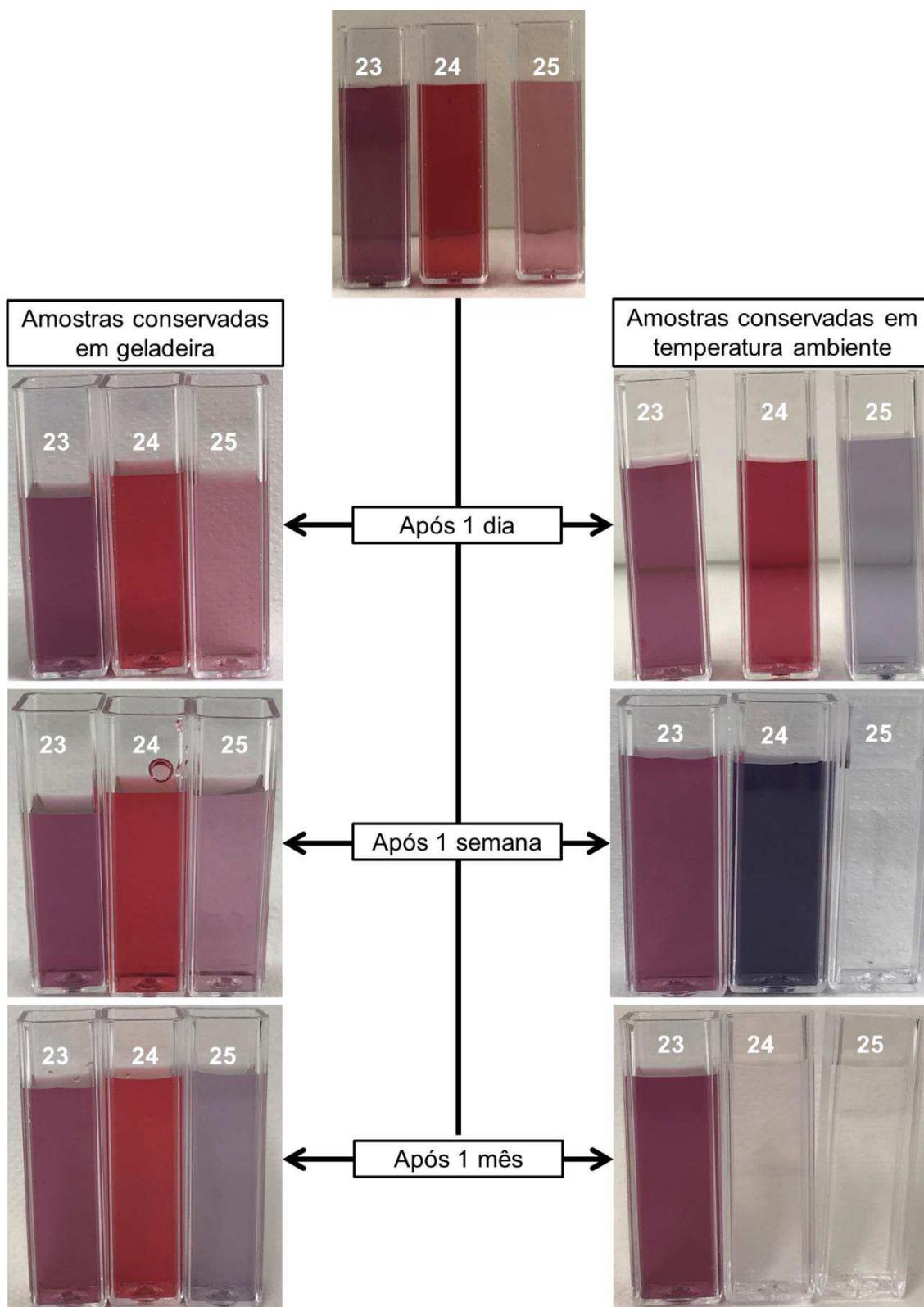
É possível observar que na maioria das sínteses avaliadas, o valor da máxima absorbância medida diminuiu ao longo do tempo, de forma mais acentuada nas amostras conservadas em temperatura ambiente, comprovando o indicado na literatura que sugere a armazenagem das soluções coloidais em geladeira, a uma temperatura igual a aproximadamente 4 °C, a fim de evitar a sua degradação, mantendo-as conservadas por mais tempo (DA SILVA, 2016; COURA *et al.*, 2018; SHOKOUFI *et al.*, 2019). A redução no valor da absorbância na banda de ressonância plasmônica das soluções pode ser comparada ainda visualmente pela mudança de coloração das soluções que tornam-se gradativamente incolores ou mudam de tons avermelhados para azulados indicando a agregação das AuNPs (Figuras 77 e 78).

Figura 77 – Análise visual da estabilidade das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro do itt Chip)



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Figura 78 – Análise visual da estabilidade das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro da Feevale)



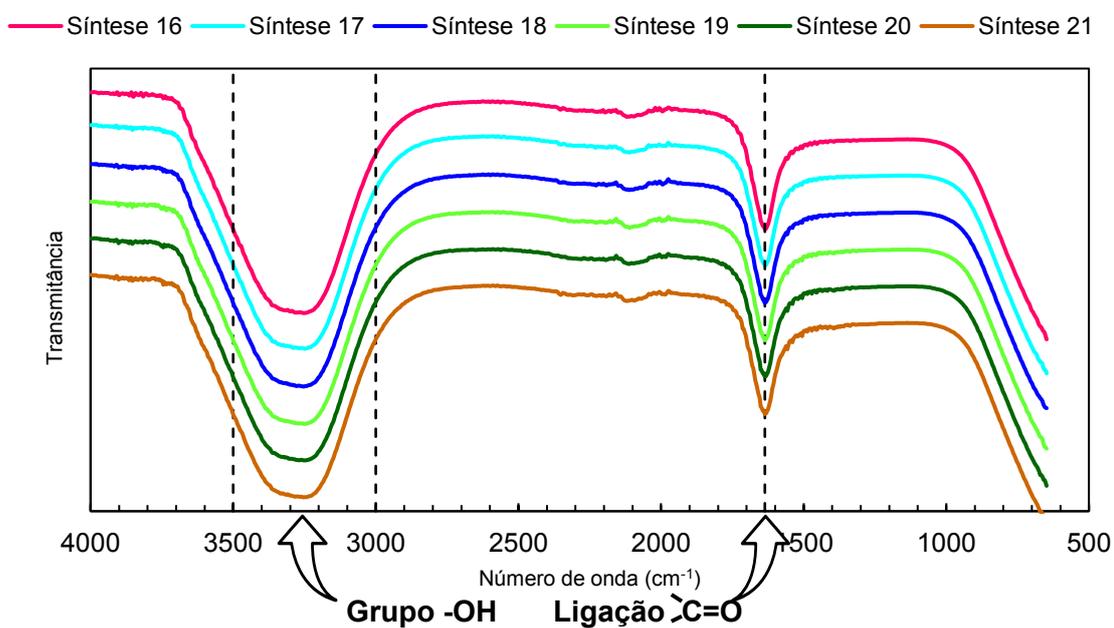
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Por fim, é possível verificar que as soluções coloidais de AuNPs produzidas pelo método de reciclagem do ouro apresentaram estabilidade inferior às soluções produzidas pelo método tradicional com Citrato de Sódio e Ácido Cloroáurico comercial, uma vez que este apresenta um nível de pureza superior, contribuindo para a síntese de nanopartículas mais estáveis, homogêneas e sem aglomerados.

4.2.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)

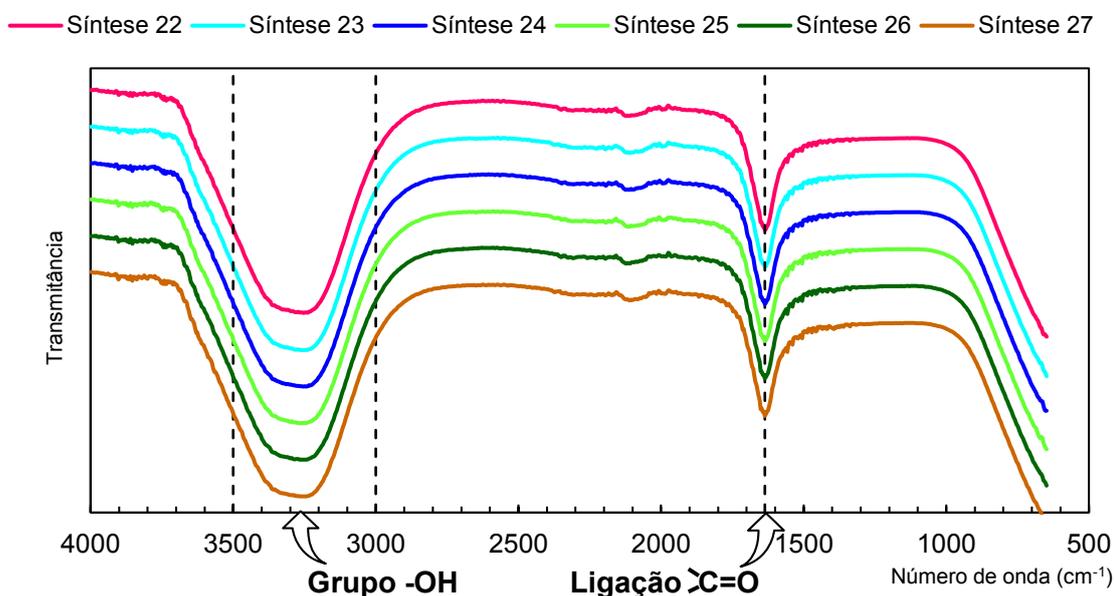
As Figuras 79 e 80 apresentam os espectros de ATR-FTIR das nanopartículas de ouro em solução, produzidas com Citrato de Sódio e utilizando ouro metálico como agente precursor.

Figura 79 – Espectros de ATR-FTIR das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro do itt Chip)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 80 – Espectros de ATR-FTIR das sínteses de AuNPs pelo método de reciclagem do ouro (amostra de ouro da Feevale)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

É possível observar que os espectros apresentados nas Figuras 79 e 80 são semelhantes entre si, mostrando que não houve a formação de compostos diferentes entre uma síntese e outra, mesmo com a alteração da razão molar entre os reagentes e da amostra de ouro metálico utilizada na produção do Ácido Cloroáurico. Além disso, identifica-se que os espectros possuem as mesmas bandas apresentadas anteriormente nas Figuras 44 (do capítulo 4.1.1.2 e que compõe o estudo preliminar) e 57 (do capítulo 4.2.1.3 e que compõe o estudo principal). Essas bandas se referem à presença do grupo funcional hidroxila (-OH, banda entre 3.000 e 3.500 cm⁻¹) e da dupla ligação entre carbono e oxigênio (C=O, banda em 1.636 cm⁻¹) que podem ser encontradas na estrutura química do Ácido β-cetoglutarico formado durante a reação de redução dos íons de Au³⁺ presentes no Ácido Cloroáurico em ouro metálico Au⁰ (SILVERSTEIN *et al.*, 2019).

4.2.3 Discussão dos resultados

A partir dos resultados obtidos com o estudo principal, foi possível avaliar melhor os parâmetros adequados para a síntese de nanopartículas de ouro via redução química com Citrato de Sódio. Entre os dois métodos estudados, o uso do Ácido Cloroáurico comercial contribuiu para a obtenção de soluções coloidais de

nanopartículas de ouro mais estáveis, devido possivelmente à pureza encontrada nesse reagente. Ao mesmo tempo, a instabilidade observada nas soluções coloidais produzidas através do método de reciclagem do ouro não descarta essa rota alternativa para estudos futuros, uma vez que abre espaço para muitas pesquisas e projetos com o objetivo de aperfeiçoar o método, aumentar a estabilidade das soluções e, também, substituir o agente redutor por um agente natural, por exemplo.

Assim, para a terceira e última etapa do trabalho, decidiu-se utilizar a síntese de AuNPs realizada com o reagente comercial, descartando possíveis variações decorrentes da instabilidade apresentada no outro método. Dentre as sete formulações realizadas, a Síntese 11 foi a que apresentou o conjunto de resultados mais promissor, em termos de tamanho de partícula (12 a 18 nm, semelhante ao tamanho de nanopartículas de ouro apresentadas em artigos científicos), estabilidade química (a banda de máxima absorvância identificada na análise de UV-vis manteve-se durante o período de 1 mês quando conservada em temperatura ambiente e em resfriamento), composição química da solução (grupos funcionais de acordo com a literatura, conforme análise de ATR-FTIR) e grau de dispersão das partículas em solução (diâmetro hidrodinâmico igual $(34,97 \pm 1,48)$ nm e PDI igual a $0,25 \pm 0,03$).

4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Conforme discutido anteriormente, utilizou-se a Síntese 11 para o estudo de funcionalização da superfície das nanopartículas de ouro, possibilitando a sua aplicação na construção de biossensores. O registro do processo de funcionalização das nanopartículas de ouro realizado é apresentado na Figura 81.

Figura 81 – Funcionalização das AuNPs com PEI



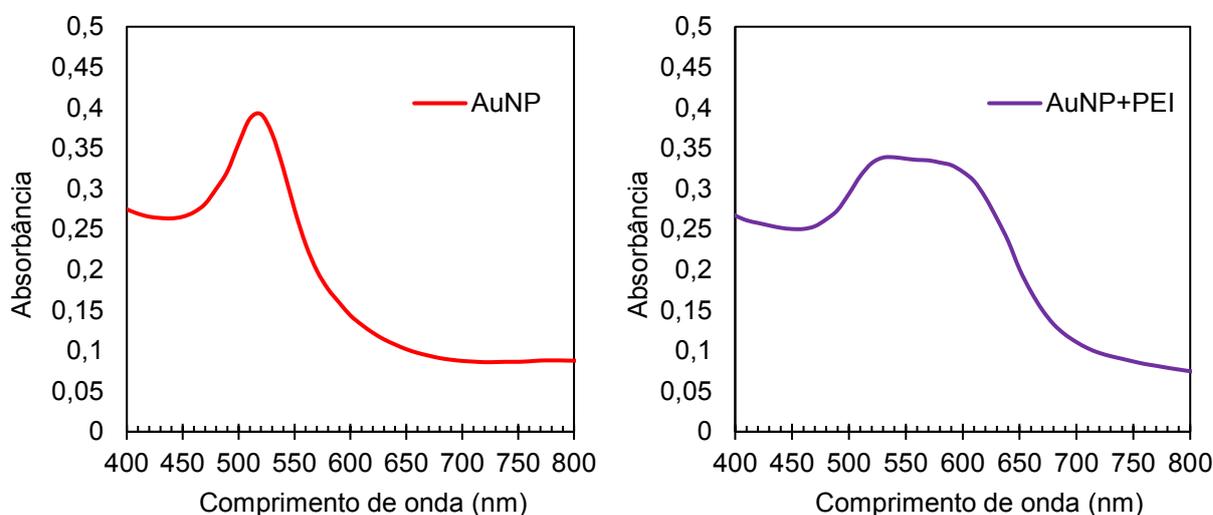
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

É possível verificar na Figura 81, que após a centrifugação da amostra de AuNP, a retirada do sobrenadante e a ressuspensão com a solução de Polietilenoimina (0,3%), a solução obtida apresentou coloração arroxeada que indica a substituição dos íons de citrato em volta das nanopartículas de ouro pelas moléculas de PEI que, conforme resultado, possui menor potencial de estabilizar as AuNPs do que os íons de citrato, devido à alteração na coloração da solução. A ativação da superfície das nanopartículas de ouro com o polímero Polietilenoimina é de suma importância para estabilizar as AuNPs e, ao mesmo tempo, disponibiliza o grupo funcional amina (-NH₂) que fica exposto para se ligar ao bioreceptor desejado. A caracterização eletroquímica do processo é apresentada abaixo.

4.3.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis)

A análise de UV-vis é utilizada para caracterizar as soluções durante o processo de funcionalização das nanopartículas de ouro, uma vez que a ligação de moléculas na superfície das nanopartículas de ouro altera o ambiente circundante e causa um deslocamento na banda de ressonância plasmônica característica das AuNPs não funcionalizadas (em torno de 520 nm) em 8 nm aproximadamente caracterizada por uma alteração visual na coloração das soluções que passam de vermelho para roxo ou azul (DANIEL & ASTRUC, 2004). A Figura 82 apresenta os espectros de UV-visível da solução coloidal de AuNPs antes e após o processo de funcionalização.

Figura 82 – Espectros de UV-visível da funcionalização das nanopartículas de ouro



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

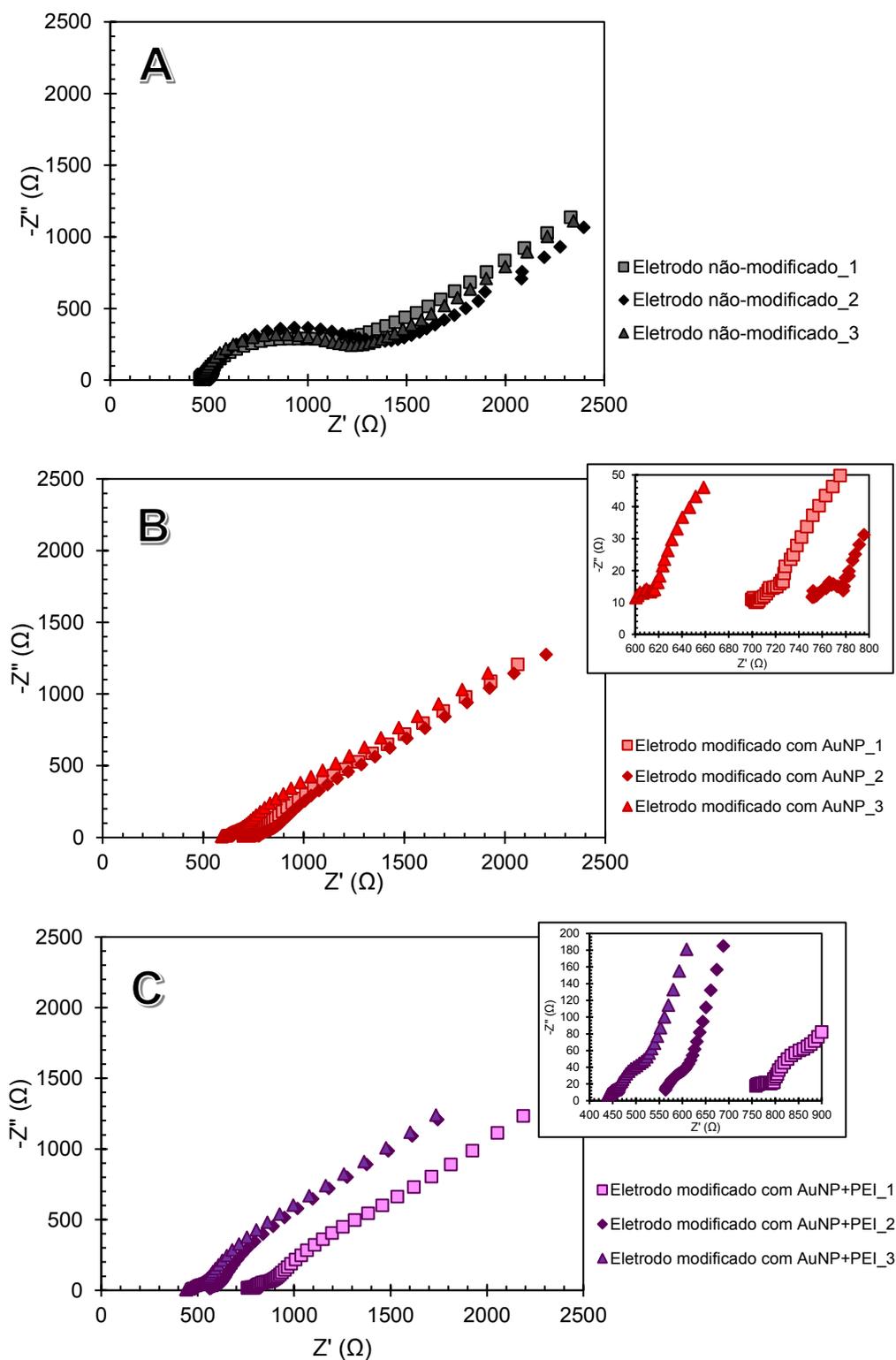
Conforme pode-se observar nos espectros da Figura 82, após a substituição dos íons de citrato pelas moléculas de polietilenoimina em torno da superfície das AuNPs, evidencia-se um deslocamento da banda de máxima absorvância de 520 nm para 540 nm. Além disso, a banda resultante é mais alargada o que está de acordo com a mudança de coloração da solução apresentada anteriormente pela Figura 81, que mudou de vermelho para roxo. Esse deslocamento para a direita do espectro é indicada por Ferreira e co-autores (2017) como um “red-shift” que indica o aumento da constante dielétrica e do índice de refração do meio circundante, devido ao acoplamento de moléculas na superfície da nanopartícula. Dessa forma, é possível inferir que durante o processo de funcionalização, a estabilidade das nanopartículas mudou de eletrostática (AuNPs estabilizadas pela interação com íons citrato) para estabilização estérica (adsorção de reagentes poliméricos na superfície das nanopartículas) (BIANCO, 2019).

4.3.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica é uma das técnicas eletroquímicas mais populares e utilizadas para caracterizar e avaliar a qualidade do filme de moléculas (monolayer) formado sobre eletrodos e que pode ser relacionado ao processo de funcionalização das nanopartículas de ouro. Utilizando soluções com potencial oxi-redução, como o par redox Ferrocianeto e Ferricianeto de Potássio, é possível monitorar o comportamento da reação sobre os eletrodos quando não modificados e quando modificados com nanopartículas de ouro funcionalizadas. A partir da análise de EIS, é possível extrair o valor de R_{ct} que consiste na resistência à transferência de cargas e que fornece a resistência oferecida pelo filme de AuNP funcionalizada immobilizado sobre o eletrodo de trabalho do sensor (GANESH & MUTHURASU, 2012).

A Figura 83 apresenta os diagramas de Nyquist obtidos por EIS do eletrodo sem modificação (como produzido), do eletrodo modificado com a solução de nanopartículas de ouro (AuNPs da Síntese 11) e do eletrodo modificado com a solução de nanopartículas de ouro funcionalizadas com Polietilenoimina (AuNP + PEI). Vale destacar que a análise foi realizada em triplicata.

Figura 83 – Nyquist plot da análise de EIS



Parâmetros: $E_{ac}=0,01$ V; $f_{min}=100$ mHz; $f_{max}=1$ MHz; $t_{OCP}=1,0$ s; $V_{solução}=50$ μ L de $[Fe(CN)_6]^{3-/4}$ (1:1, 1 mM) em KCl (1 M).

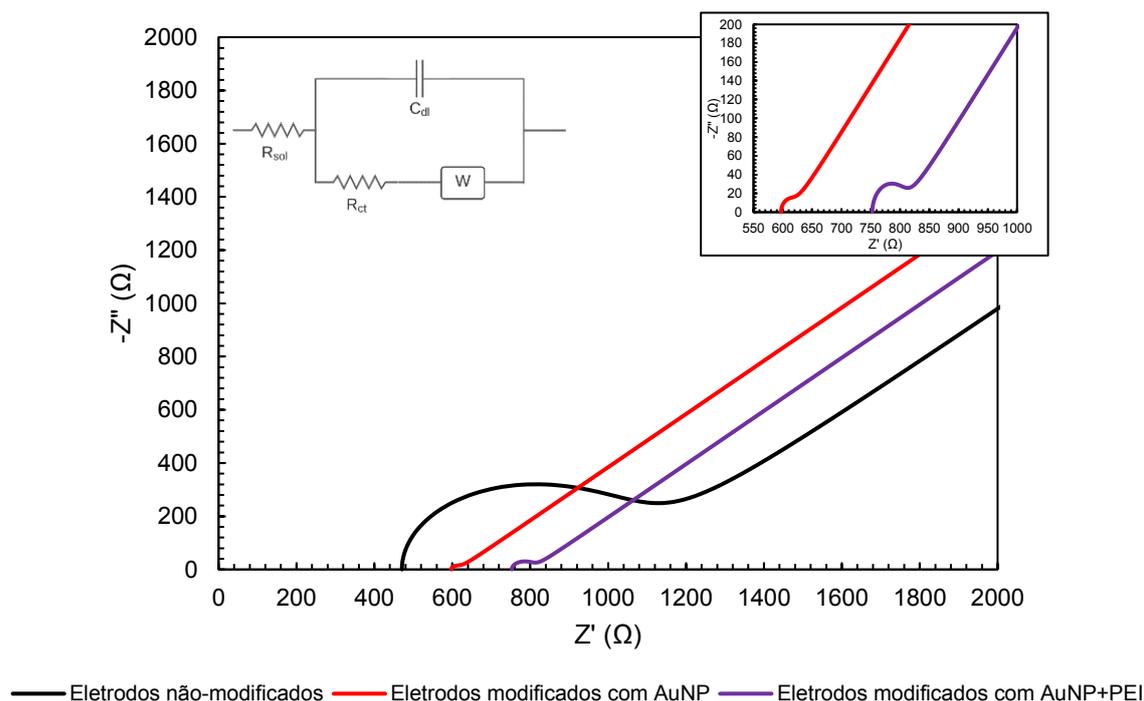
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O Nyquist plot apresentado na Figura 83-A é representativo dos sensores logo após sua fabricação, sem nenhuma modificação. O valor do parâmetro R_{ct} médio

obtido pelo *fitting* de circuito¹ do gráfico é igual a $(657,97 \pm 86,77) \Omega$. Ao adicionar uma camada de nanopartículas de ouro sobre a área do eletrodo de trabalho, imagina-se que a resistência do sensor diminuirá, visto que a camada construída possui maior condutividade do que o próprio material de origem da fabricação dos eletrodos (carbono/grafeno). Essa hipótese é confirmada pela redução no valor de R_{ct} para $(22,00 \pm 1,02) \Omega$, que indica um processo de transferência de carga rápido (Figura 83-B) (ZHENG *et al.*, 2013). A Figura 83-C, por sua vez, apresenta o Nyquist plot dos eletrodos modificados com as nanopartículas de ouro funcionalizadas com polietilenoimina (AuNP+PEI), no qual é possível identificar um aumento no valor de R_{ct} para $53,12 \Omega$, em decorrência do acoplamento de moléculas isolantes (Polietilenoimina) na superfície das nanopartículas de ouro. Além disso, pode-se inferir a ocorrência de uma atração eletrostática entre os íons de Ferro e Ferricianeto (carregados negativamente) e os grupos aminas presentes na Polietilenoimina (carregados positivamente, devido ao caráter catiônico do polímero) que acabam “aprisionando” o par redox e dificultando que a reação aconteça. Entretanto, vale destacar que para a análise de EIS dos eletrodos modificados com AuNP+PEI não foi possível utilizar os resultados da triplicata para o cálculo do R_{ct} médio, uma vez que em somente um dos três eletrodos analisados foi obtido o diagrama de Nyquist.

A Figura 84, a seguir, apresenta o compilado da média dos *fittings* de circuito obtidos para cada etapa (com exceção dos eletrodos modificados com AuNP+PEI em que utilizou-se apenas o primeiro diagrama da triplicata), confirmando as variações no valor de R_{ct} pelo comprimento do semicírculo formado no Nyquist plot.

¹ Circuito elétrico equivalente representado anteriormente na Figura 39.

Figura 84 – Compilado com os *fittings* das curvas

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.3.3 Discussão dos resultados

O processo de funcionalização de nanopartículas de ouro é o primeiro passo para a aplicação desses nanomateriais na construção de dispositivos para o diagnóstico de doenças, os biossensores, uma vez que esse procedimento ativa a superfície das AuNPs e possibilita o acoplamento de biomoléculas, como antígenos, anticorpos, proteínas, enzimas, entre outros.

Diante dos resultados apresentados anteriormente, é possível inferir que a Polietilenoimina pode ser usada para a funcionalização de nanopartículas de ouro e que a metodologia escolhida no trabalho resultou na substituição dos íons de citrato, que estabilizam as AuNPs logo após a síntese, pelas moléculas do polímero. No entanto, evidencia-se que as moléculas de PEI interagem com as AuNPs através de interações intermoleculares, mais especificadamente, por forças de Van der Waals. Por esse motivo, a solução coloidal obtida ao final do processo de funcionalização apresenta-se com coloração roxa que indica a presença de nanopartículas aglomeradas. Uma alternativa para evitar a presença de aglomerados seria a utilização de Polietilenoglicol com grupo tiol em substituição à Polietilenoimina, porque

o enxofre presente no grupo tiol do PEG é capaz de se ligar covalentemente às nanopartículas de ouro e assim evitar a sua agregação. No entanto, esse polímero é mais caro do que a Polietilenoimina e, por esse motivo, para os testes realizados nesse trabalho, decidiu-se iniciar com o PEI.

A caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados com as nanopartículas de ouro funcionalizadas revelou uma redução significativa na resistência à transferência de cargas quando comparado com o dispositivo não modificado, o que pode estar diretamente ligado à capacidade condutiva das nanopartículas de ouro. Essa redução na resistência à transferência de cargas beneficia o desempenho do dispositivo, uma vez que contribui para o aumento na sensibilidade do mesmo em detectar reações químicas e/ou biológicas.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho objetivou o estudo da síntese de nanopartículas de ouro e a possibilidade de aplicá-las na construção de dispositivos para o diagnóstico de doenças. Com base nos resultados apresentados e discutidos no capítulo anterior, é possível inferir que os objetivos do presente trabalho foram atendidos.

A partir da revisão teórica realizada acerca das metodologias de síntese de nanopartículas de ouro reportadas na literatura, foi possível evidenciar que a produção de nanopartículas pela abordagem *bottom-up* é mais vantajosa em detrimento da abordagem *top-down*, uma vez que possibilita a formação de nanopartículas com formato e tamanho mais homogêneos, e altamente controlados. Os procedimentos experimentais da técnica *bottom-up* baseiam-se na redução química dos íons de Au^{3+} , presentes em precursores como o Ácido Cloroáurico, em ouro metálico. Para essa reação é necessária a inclusão de um agente redutor, como o Citrato de Sódio e o Borohidreto de Sódio.

Dentre as condições de síntese avaliadas, observou-se que as soluções coloidais produzidas com Citrato de Sódio como agente redutor apresentaram ao final da reação uma coloração mais intensa (vermelho escuro), possibilitando a construção de biossensores tanto eletroquímicos quanto imunocromatográficos (testes rápidos) e o método experimental é mais simples ao utilizar um único reagente como redutor e estabilizante, além de demandar menos tempo de reação, o que influencia nos custos finais de produção. Estabilizando o agente redutor e avaliando outros parâmetros da síntese, como velocidade de agitação, velocidade de adição do agente redutor e relação molar entre os reagentes precursor e redutor, foi possível obter soluções coloidais de nanopartículas de ouro com diferentes formatos, tamanho, níveis de dispersão que, por sua vez, geraram soluções com colorações diferentes, desde laranja, rosa, roxo a vermelho. Com base nas análises de caracterização realizadas, cujos resultados foram apresentados no capítulo anterior, identificaram-se os seguintes parâmetros como mais adequados para a síntese de nanopartículas de ouro (Síntese 11):

- Velocidade de agitação: 1500 rpm;
- Temperatura: 90 °C;
- Velocidade de adição do agente redutor: instantânea (sem gotejamento);
- Concentração da solução “mãe” de Ácido Cloroáurico: 3 mg/mL;

- Volume da solução “mãe” de Ácido Cloroáurico adicionada na reação: 5 mL;
- Concentração da solução de Citrato de Sódio: 10 mg/mL;
- Volume da solução de Citrato de Sódio adicionada na reação: 5 mL;
- Volume de água ultrapura adicionada na reação: 90 mL;
- Tempo estimado para a reação: 20 minutos.

Outro método de síntese estudado foi o processo de reciclagem do ouro, no qual utilizaram-se amostras de ouro metálico para a produção do Ácido Cloroáurico e, assim, utilizá-lo como agente precursor dos íons de ouro na reação. Os resultados de caracterização demonstraram instabilidade das soluções coloidais quando armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente durante 1 mês. Apesar do resultado encontrado, o referido método pode ser usado como rota alternativa para estudos futuros, uma vez que abre espaço para muitas pesquisas e projetos com o objetivo de aperfeiçoar o método, aumentar a estabilidade das soluções e, também, substituir o agente redutor por um agente natural, por exemplo.

A fim de avaliar a possibilidade de aplicar as nanopartículas de ouro na construção de biossensores, a síntese escolhida dentre as formulações produzidas (Síntese 11) passou pelo processo de funcionalização. Essa etapa é necessária para a ativar a superfície das AuNPs e possibilitar o acoplamento de bioreceptores (como, por exemplo, antígenos, anticorpos, proteínas, enzimas, entre outros). Foi possível concluir que a Polietilenoimina pode ser usada para a funcionalização de nanopartículas de ouro e que a metodologia escolhida no trabalho resultou na substituição dos íons de citrato, que estabilizam as AuNPs logo após a síntese, pelas moléculas do polímero, que passam a interagir com as nanopartículas de ouro através de interações intermoleculares, mais especificadamente, por forças de Van der Waals.

A caracterização eletroquímica dos eletrodos comerciais modificados com as nanopartículas de ouro funcionalizadas produzidas neste trabalho revelou um aumento na condutividade elétrica do dispositivo quando modificado, devido à inclusão de um material condutivo (as nanopartículas de ouro) evidenciado pela redução significativa na resistência à transferência de cargas quando comparado com o dispositivo não modificado. Através desse resultado, conclui-se que é possível aplicar a solução de nanopartículas de ouro funcionalizadas produzidas neste trabalho na construção de biossensores e que o próximo passo do estudo deve focar no

acoplamento do bioreceptor que dependerá, por sua vez, do biomarcador alvo do diagnóstico.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, propõe-se o seguimento das caracterizações eletroquímicas da solução coloidal de nanopartículas de ouro funcionalizadas através da técnica de Voltametria Cíclica, cujos resultados contribuirão para corroborar os obtidos com a análise de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. Além disso, pretende-se realizar o acoplamento de um bioreceptor nas nanopartículas de ouro previamente funcionalizadas, avaliar a eficácia da ligação do bioreceptor através das mesmas técnicas eletroquímicas utilizadas na caracterização do processo de funcionalização, e, por fim, avaliar a eficácia dos eletrodos comerciais modificados com as nanopartículas de ouro funcionalizadas e contendo o bioreceptor na detecção do biomarcador alvo através de medidas elétricas de Cronoamperometria ou Impedância *versus* tempo.

Outro estudo que pode ser iniciado após esse trabalho consiste na funcionalização das nanopartículas de ouro com Polietilenoglicol heterobifuncional que é o agente funcionalizante mais reportado na literatura e, assim, comparar esse processo com os resultados encontrados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABDULBARI, Hayder A.; BASHEER, Esmail A. M. Electrochemical Biosensors: Electrode Development, Materials, Design, and Fabrication. **ChemBioEng Rev**, v. 4, n. 2, p. 92-105, 2017.
- ALVES, Oswaldo Luiz. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 23-40, 2004.
- AMINA, Sundus Jabeen; GUO, Bin. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 9823-9857, 2020.
- ANSYS GRANTA EDUPACK. Gold. Disponível em: <https://www.ansys.com/products/materials/granta-edupack>. Acesso em: 06 mai. 2021.
- ASLAN, Kadir; PÉREZ-LUNA, Víctor H. Surface Modification of Colloidal Gold by Chemisorption of Alkanethiols in the Presence of a Nonionic Surfactant. **Langmuir**, v. 18, p. 6059-6065, 2002.
- AVGOUSTAKIS, Konstantinos. Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery. **Current Drug Delivery**, v. 1, p. 321-333, 2004.
- AYDOGAN, Bulent; LI, Ji; RAJH, Tijana; CHAUDHARY, Ahmed; CHMURA, Steven J.; PELIZZARI, Charles; WIETHOLT, Christian; KURTOGLU, Metin; REDMOND, Peter. AuNP-DG: Deoxyglucose-Labeled Gold Nanoparticles as X-ray Computed Tomography Contrast Agents for Cancer Imaging. **Molecular Imaging and Biology**, v. 12, p. 463-467, 2010.
- BALASOORIYA, Eranga Roshan; JAYASINGHE, Chanika Dilumi; JAYAWARDENA, Uthpala Apekshani; RUWANTHIKA, Ranasinghe Weerakkodige Dulashani; DE SILVA, Rohini Mendis; UDAGAMA, Preethi Vidya. Honey Mediated Green Synthesis of Nanoparticles: New Era of Safe Nanotechnology. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, p. 1-10, 2017.
- BELLUZO, María Soledad; RIBONE, Maria Élica; LAGIER, Claudia Marina. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. **Sensors**, v. 8, p. 1366-1399, 2008.

BHAGYARAJ, Sneha Mohan; OLUWAFEMI, Oluwatobi Samuel. Nanotechnology: The Science of the Invisible. *In*: BHAGYARAJ, Sneha Mohan; OLUWAFEMI, Oluwatobi Samuel; KALARIKKAL, Nandakumar; THOMAS, Sabu (ed.). **Synthesis of Inorganic Nanomaterials: Advances and Key Technologies**. Woodhead Publishing - Elsevier, 2018. p. 1-18.

BHALLA, Nikhil; PAN, Yuwei; YANG, Zhugen; PAYAM, Farokh. Opportunities and Challenges for Biosensors and Nanoscale Analytical Tools for Pandemics: COVID-19. **ACS Nano**, v. 14, p. 7783-7807, 2020.

BIANCO, Cristina Chies. **Desenvolvimento de estratégias de funcionalização em nanopartículas de ouro para aumentar a sensibilidade de testes para diagnósticos virais**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2019.

BRUST, Mathias; WALKER, Meryll; BETHELL, Donald; SCHIFFRIN, David J.; WHYMAN, Robin. Synthesis of Thiol-derivated Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. **Journal of the Chemical Society**, Chemical Communications, n. 7, p. 801-802, 1994.

CAMMAROSANO, Sônia Aparecida. **Preparação de ouro coloidal radioativo – ^{198}Au : Estudo dos parâmetros que afetam o tamanho das partículas**. 1979. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Energia Atômica, São Paulo, 1979.

CARY 630 FTIR Spectrometer. *In*: AGILENT. Santa Clara (Califórnia – EUA), 2021. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/ftir-spectroscopy/ftir-benchtop-systems/cary-630-ftir-spectrometer>. Acesso em: 09 jul. 2021.

CASANOVA, Monise Cristina Ribeiro. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CHEN, Chunlai; WANG, Wenjuan; GE, Jing; ZHAO, Xin Sheng. Kinetics and thermodynamics of DNA hybridization on gold nanoparticles. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 11, p. 3756-3765, 2009.

CHEVAL, Nicolas; GINDY, Nabil; FLOWKES, Clifford; FAHMI, Amir. Polyamide 66 microspheres metallised with *in situ* synthesised gold nanoparticles for a catalytic application. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 182, p. 1-9, 2012.

CHOKKI, J.; DARRACQ, G.; POELT, P.; BARON, J.; GALLARD, H.; JOYEUX, M.; TEYCHENÉ, B. Investigation of Poly(ethersulfone)/Polyvinylpyrrolidone ultrafiltration membrane degradation by contact with sodium hypochlorite through FTIR mapping and two-dimensional correlation spectroscopy. *Polymer Degradation and Stability*, v. 161, p. 131-138, 2019.

COURA, Mariana F.; ARROYOS, Guilherme; CORREIA, Lilian Cherubin; FREM, Regina C. G. Como obter nanopartículas de ouro usando suco de limão? **Química Nova**, v. 41, n. 5, p. 533-539, 2018.

COUTINHO, Catarina; SOMOZA, Álvaro. MicroRNA sensors based on gold nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 1807-1824, 2019.

DA COSTA, Priscila Rodrigues. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro como ferramenta terapêutica e diagnóstica**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2012.

DA SILVA, Andressa Alves. **Síntese e estabilização e nanopartículas de ouro para fins biotecnológicos e cosméticos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

DA SILVA, Renan Gonçalves Leonel. Desenvolvimento tecnológico em saúde na pandemia da covid-19. *In: JORNAL da USP*. São Paulo, 22 abr. 2020. Disponível em: <https://jornal.usp.br/artigos/desenvolvimento-tecnologico-em-saude-na-pandemia-da-covid-19/>. Acesso em: 02 jul. 2021.

DANIEL, Marie-Christine; ASTRUC, Didier. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 293-346, 2004.

DAS, Sumistha; MITRA, Shouvik; KHURANA, S. M. Paul; DEBNATH, Nitai. Nanomaterials for biomedical applications. **Frontiers in Life Science**, v. 7, n. 3-4, p. 90-98, 2013.

DE AMORIM, Alexandra Mara. **Estudo das propriedades térmicas, espectroscópicas e eletroquímicas de complexos formados entre o polímero polivinilpirrolidona (PVP) e sais de cobre (II)**. 2010. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DE SOUZA, Carla Daruich; NOGUEIRA, Beatriz Ribeiro; ROSTELATO, Maria Elisa C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 798, p. 714-740, 2019.

DERAEDT, Christophe; SALMON, Lionel; GATARD, Sylvain; CIGANDA, Roberto; HERNANDEZ, Ricardo; RUIZ, Jaime; ASTRUC, Didier. Sodium Borohydride Stabilizes Very Active Gold Nanoparticle Catalyst. **Chemical Communications**, v. 50, p. 14194-14196, 2014.

DIETZEN, Dennis J. Amino Acids, Peptides, and Proteins. *In*: RIFAI, Nader; HORVATH, Andrea Rita; WITTEWER, Carl T. (ed.). **Principles and Applications of Molecular Diagnostics**. Elsevier, 2018. p. 345-380.

DOAN, Van-Dat; HUYNH, Bao-Na; NGUYEN, Than-Danh; CAO, Xuan-Thang; NGUYEN, Van-Cuong; NGUYEN, Thi Lan-Huong; NGUYEN, Hoai Thuong; LE, Van Thuan. Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Codonopsis pilosula* Roots for Antibacterial and Catalytic Applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2020, 1-18, 2020.

DREADEN, Erik C.; ALKILANY, Alaaldin M.; HUANG, Xiaohua; MURPHY, Catherine J.; EL-SAYED, Mostafa. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2740-2779, 2012.

EBNESAJJAD, Sina. Surface and Material Characterization Techniques. *In*: EBNESAJJAD, Sina (ed.). **Surface Treatment of Materials for Adhesion Bonding**. William Andrew, 2006. p. 43-75.

EUSTIS, Susie; EL-SAYED, Mostafa 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, p. 209-217, 2006.

FERRACIN, Manuela; VERONESE, Angelo; NEGRINI, Massimo. Micromarkers: miRNAs in câncer diagnosis and prognosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 3, p. 297-308, 2010.

FERREIRA, Virgínia Clara Teixeira. **Polímeros Condutores e Monocamadas Auto-montadas na Conceção de Novas Arquitecturas contendo Nanopartículas Metálicas: Preparação, Caracterização e Desempenho para Electrocatálise e Biosensores**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

FERREIRA, Cyntia Silva; LADEIRA, Luiz Orlando; LEITE, Cristiano Fantini; DA FONSECA, Flávio Guimarães; RIBEIRO, Erica Milena de Castro; VERSIANI, Alice Freitas; SILVA, Jorge Fernando de Souza; MAGALHÃES, Cíntia Lopes de Brito; SILVA, Breno de Mello. Uso de nanobastões de ouro para o desenvolvimento de aulas práticas de nanotecnologia. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 594-601, 2017.

FORD, Brian J.; JOY, David C.; BRADBURY, Savile. Transmission electron microscope. *In*: ENCYCLOPEDIA Britannica. [S. l.], 23 set. 2019. Disponível em: <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>. Acesso em: 12 jul. 2021.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, p. 20-22, 1973.

GANESH, V.; MUTHURASU, A. Strategies for an enzyme immobilization on electrodes: Structural and electrochemical characterizations. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 358, n. 012003, p. 1-9, 2012.

GAO, Xuefei; XU, Hui; BALODA, Meenu; GURUNG, Anant S.; XU, Li-Ping; WANG, Tao; ZHANG, Xueji; LIU, Guodong. Visual detection of microRNA with lateral flow nucleic acid biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 578-584, 2014.

GEERTS, Nienke; EISER, Erika. DNA-functionalized colloids: Physical properties and applications. **Soft Matter**, v. 6, p. 4647-4660, 2010.

GHOSH, Sujit Kumar; PAL, Tarasankar. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 4797-4862, 2007.

GILJOHANN, David A.; SEFEROS, Dwight S.; DANIEL, Weston L.; MASSICH, Matthew D.; PATEL, Pinal C.; MIRKIN, Chad A. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 3280-3294, 2010.

GIRI, Basant. Synthesis of Gold Nanoparticles on Microchip. *In*: GIRI, Basant (org.). **Laboratory Methods in Microfluidics**. Elsevier, 2017. p. 103-107.

GRASSESCHI, Daniel. **Uma Abordagem Fundamental sobre Nanopartículas de Ouro**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GRIFFIN, Jelani; SINGH, Anant Kumar; SENAPATI, Dulal; RHODES, Patsy; MITCHELL, Kanieshia; ROBINSON, Brianica; YU, Eugene; RAY, Paresh Chandra. Size- and Distance-Dependent Nanoparticle Surface-Energy Transfer (NSET) Method for Selective Sensing of Hepatitis C Virus RNA. **Chemistry a European Journal**, v. 15, p. 342-351, 2009.

HACKLEY, Vicent A.; CLOGSTON, Jeffrey F. Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. *In*: McNEIL, S. (ed.). **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. Humana Press, vol 697, 2011. p. 35-52.

HANŽIĆ, Nikolina; JURKIN, Tanja; MAKSIMOVIĆ, Aleksandar; GOTIĆ, Marijan. The synthesis of gold nanoparticles by a Citrate-radiolytical method. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 106, p. 77-82, 2015.

HARRISON, Benjamin S.; ATALA, Anthony. Carbon nanotube applications for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, p. 344-353, 2007.

HASSAN, Syeda Sara; CARLSON, Krista; MOHANTY, Swomitra Kumar; SIRAJUDDIN; CANLIER, Ali. Ultra-rapid catalytic degradation of 4-nitrophenol with ionic liquid recoverable and reusable ibuprofen derived silver nanoparticles. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 731-739, 2017.

HELMENSTINE, Anne Marie. How to Make Aqua Regia Acid Solution. *In*: THOUGHTCO. 2020. Disponível em: <https://www.thoughtco.com/making-aqua-regia-acid-solution-603641>. Acesso em: 28 jan. 2022.

HEUER-JUNGEMANN, Amelie; HARIMECH, Pascal K.; BROWN, Tom; KANARAS, Antonios G. Gold nanoparticles and fluorescently-labelled DNA as a platform for biological sensing. **Nanoscale**, v. 5, n. 20, p. 9503-9510, 2013.

HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES. **The HT7800 Series of Transmission Electron Microscopes, volume 8**. 2017. Disponível em: https://www.hitachi-hightech.com/file/global/pdf/sinews/new_products/080501.pdf. Acesso em: 13 jul. 2021.

HOSTETLER, Michael J.; TEMPLETON, Allen C.; MURRAY, Royce W. Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules. **Langmuir**, v. 15, p. 3782-3789, 1999.

HUANG, Xiaohua; KANG, Bin; CHEN, Po C.; EL-SAYED, Ivan H.; EL-SAYED, Mostafa A. Comparative study of photothermalolysis of cancer cells with nuclear-targeted or cytoplasm-targeted gold nanospheres: continuous wave or pulsed lasers. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 5, p. 1-7, 2010.

ISLAM, Md. Nazmul; CHANNON, Robert B. Electrochemical sensors. *In*: LADAME, Sylvain; CHANG, Jason Y. H. (ed). **Bioengineering Innovative Solutions for Cancer**. Elsevier, 2020. p. 47-71.

JAIN, Prashant K.; LEE, Kyeong Seok; EL-SAYED, Ivan H.; EL-SAYED, Mostafa A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 7238-7248, 2006.

JAPOLLA, Greice; ALMEIDA, Greyciele Rodrigues; CUNHA JUNIOR, Jair Pereira; BATAUS, Luiz Artur Mendes; SOUZA, Guilherme Rocha Lino. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 2635-2649, 2015.

JAVIER, David J.; NITIN, Nitin; LEVY, Matthew; ELLINGTON, Andrew; RICHARDS-KORTUM, Rebecca. Aptamer-Targeted Gold Nanoparticles As Molecular-Specific Contrast Agents for Reflectance Imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, p. 1309-1312, 2008.

JIANG, Ying; ZHAO, Hong; LIN, Yuqing; ZHU, Ningning; MA, Yurong; MAO, Lanqun. Colorimetric Detection of Glucose in Rat Brain Using Gold Nanoparticles. **Angewandte Chemie (International ed.)**, v. 49, p. 4800-4804, 2010.

JIANG, Yueping; LIU, Yufeng; GUO, Qinglan; JIANG, Zhibo; XU, Chengbo; ZHU, Chenggen; YANG, Yongchun; LIN, Sheng; SHI, Jianguo. Acetylenes and fatty acids from *Codonopsis pilosula*. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 3, p. 215-222, 2015.

KELLY, K. Lance; CORONADO, Eduardo; ZHAO, Lin Lin; SCHATZ, George C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668-677, 2003.

KENNEDY, Laura C.; BEAR, Adham S.; YOUNG, Joseph K.; LEWINSKI, Nastassja A.; KIM, Jean; FOSTER, Aaron E.; DREZEK, Rebekah A. T cells enhance gold nanoparticle delivery to tumors *in vivo*. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, n. 283, p. 1-11, 2011.

KERDCHAROEN, T.; WONGCHOOSUK, C. Carbon nanotube and metal oxide hybrid materials for gas sensing. *In: JAANISO, Raivo; TAN, Ooi Kiang (ed.). Semiconductor Gas Sensors*. Woodhead Publishing, 2013. p. 386-407.

KEREN, S.; ZAVALETA, C.; CHENG, Z.; DE LA ZERDA, A.; GHEYSENS, O.; GAMBHLER, S. S. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 15, p. 5844-5849, 2008.

KIM, Chang Soo; WILDER-SMITH, Petra; CHEN, Zhongping; KWON, Young Jik. Enhanced detection of early-stage oral cancer *in vivo* by optical coherence tomography using multimodal delivery of gold nanoparticles. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 3, p. 1-8, 2009.

KING, Shirin R.; MASSICOT, Juliette; McDONAGH, Andrew M. A Straightforward Route to Tetrachloroauric Acid from Gold Metal and Molecular Chlorine for Nanoparticle Synthesis. **Metals**, v. 5, p. 1454-1461, 2015.

KNOP, Katrin; HOOGENBOOM, Richard; FISCHER, Dagmar; SCHUBERT, Ulrich S. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 6288-6308, 2010.

KRAMER, Soren; GAGOZ, Fabien. From gold in nature to gold catalysts. *In: TOSTE, E. Dean; MICHELET, Véronique (ed.). Gold Catalysis An Homogeneous Approach*. Catalytic Science Series, v. 13, 2014. p. 1-49.

LEE, Soo Hyeon; BAE, Ki Hyun; KIM, Sun Hwa; LEE, Kyu Ri; PARK, Tae Gwan. Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 94-101, 2008.

LEITE, Diego de Oliveira; PRADO, Rogério Junqueira. **Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio**. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 2, p. 2504, 2012.

LIN, Shu-Yi; TSAI, Yi-Ting; CHEN, Chien-Chih; LIN, Chia-Mei; CHEN, Chun-hsien. Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, p. 2134-2139, 2004.

LIN, Chao; TAO, Kai; HUA, Dayin; MA, Zhen; ZHOU, Shenghu. Size Effect of Gold Nanoparticles in Catalytic Reduction of *p*-Nitrophenol with NaBH₄. **Molecules**, v. 18, p. 12609-12620, 2013.

LINK, Stephan; EL-SAYED, Mostafa A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, p. 4212-4217, 1999.

LINK, Stephan; EL-SAYED, Mostafa A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. **International Reviews in Physical Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 409-453, 2000.

LIU, Tao; TANG, Ji'an; JIANG, Long. The enhancement effect of gold nanoparticles as a surface modifier on DNA sensor sensitivity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 3-7, 2004.

LIU, Licheng; WEI, Ting; GUAN, Xiao; ZI, Xuehong; HE, Hong; DAI, Hongxing. Size and Morphology Adjustment of PVP-Stabilized Silver and Gold Nanocrystals Synthesized by Hydrodynamic Assisted Self-Assembly. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 113, n. 20, p. 8595-9600, 2009.

MASCINI, M.; TOMBELLI, S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. **Biomarkers**, v. 13, v. 7-8, p. 637-657, 2008.

MIAO, Peng; TANG, Yuguo; WANG, Bidou; JIANG, Chengmin; GAO, Liqian; BO, Bing; WANG, Jue. Nuclease assisted target recycling and spherical nucleic acids gold nanoparticles recruitment for ultrasensitive detection of microRNA. **Electrochimica Acta**, v. 190, p. 396-401, 2016.

MIURA, Daimei; ASANO, Ryutaro. Biosensors: Immunosensors. *In: Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2021.

MOHAMMED, Ihsan A.; AL-GAWHARI, Fatima J. Gold Nanoparticle: Synthesis, Functionalization, Enhancement, Drug Delivery and Therapy: A Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 11, n. 6, p. 888-910, 2020.

NANOBROOK Series. *In: Brookhaven Instruments*. Holtsville (Nova York – EUA), 2021. Disponível em: <https://www.brookhaveninstruments.com/product/nanobrook-series/>. Acesso em: 12 jul. 2021.

NANODAYS. **Exploring Materials – Nano Gold**. 2012. Disponível em: https://www.nisenet.org/sites/default/files/catalog/uploads/8880/materialsgold_sign_31oct11.pdf. Acesso em 29 mar. 2021.

NEGAHDARI, Babak; DARVISHI, Mohammad; SAEEDI, Ali Asghar. Gold nanoparticles and hepatitis B virus. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 455-461, 2019.

NUNNA, Bharath Babu; MANDAL, Debdyuti; LEE, Joo Un; SINGH, Harsimranjit; ZHUANG, Shiqiang; MISRA, Durgamadhab; BHUYIAN, Md Nasir Uddin; LEE, Eon Soo. Detection of cancer antigens (CA-125) using gold nano particles on interdigitated electrode-based microfluidic biosensor. **Nano Converge**, v. 6, n. 3, p. 1-12, 2019.

OJEA-JIMÉNEZ, Isaac; ROMERO, Francisco M.; BASTÚS, Neus G.; PUNTES, Victor. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1800-1804, 2010.

OLIVEIRA, Jairo P.; PRADO, Adilson R.; KEIJOK, Wanderson Juvêncio; RIBEIRO, Moisés, R. N.; PONTES, Maria J.; NOGUEIRA, Breno V.; GUIMARÃES, Marco C. C. A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 216-226, 2020.

OMRAN, Basma A. Fundamentals of Nanotechnology and Nanobiotechnology. In: OMRAN, Basma A. *Nanobiotechnology: A Multidisciplinary Field of Science*. Springer, 2020. p. 1-36.

PARK, Ki-Soo; TAE, Jinsung; CHOI, Bongkum; KIM, Young-Seok; MOON, Cheol; KIM, Sa-Hyun; LEE, Han-Sin; KIM, Jinhyun; KIM, Junsung; PARK, Jaeberm; LEE, Jung-Hee; LEE, Jong Eun; JOH, Jae-Won; KIM, Sungjoo. Characterization, *in vitro* cytotoxicity assessment, and *in vivo* visualization of multimodal, RITC-labeled, silica-coated magnetic nanoparticles for labeling human cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 263-276, 2010.

PAROLO, Claudio; SENA-TORRALBA, Amadeo; BERGUA, José Francisco; CALUCHO, Enric; FUENTES-CHUST, Celia; HU, Liming; RIVAS, Lourdes; ÁLVAREZ-DIDUK, Ruslan; NGUYEN, Emily P.; CINTI, Stefano; QUESADA-GONZÁLEZ, Daniel; MERKOÇI, Arben. Tutorial: designs and fabrication of nanoparticle-based lateral flow-immunoassays. **Nature Protocols**, v. 15, p. 3788-3816, 2020.

PELLEGRINO, T.; SPERLING, R. A.; ALIVISATOS, A. P.; PARAK, W. J. Gel Electrophoresis of Gold-DNA Nanoconjugates. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2007, p. 1-9, 2007.

PEREIRA, João Francisco Peinado. **Seleção e caracterização de aptâmeros de DNA capazes de se ligar à galectina-1 humana recombinante e inibirem sua função *in vitro***. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

PERRAULT, Steven D.; WALKEY, Carl; JENNINGS, Travis; FISCHER, Hans C.; CHAN, Warren C. W. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. **Nano Letters**, v. 9, n. 5, p. 1909-1915, 2009.

PIRIYA, Ajay; JOSEPH, Printo; DANIEL, S. C. G. Kiruba; LAKSHMANAN, Susithra; KINOSHITA, Takatoshi; SIVAKUMAR, Muthusany. Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 1231-1245, 2017.

QUINTEN, Michael. **Optical Properties of Nanoparticle Systems: Mie and beyond**. Singapura: Wiley-VCH, 2011.

RAHME, Kamil; CHEN, Lan; HOBBS, Richard G.; MORRIS, Michael A.; O'DRISCOLL, Caitriona; HOLMES, Justin D. PEGylated gold nanoparticles: Polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. **RSC Advances**, v. 3, p. 6085-6094, 2013.

RAPP, Bastian E.; GRUHL, Friederike J.; LÄNGE, Kerstin. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 2403-2412, 2010.

RASHEED, P. Abdul; SANDHYARANI, N. A highly sensitive DNA sensor for attomolar detection of the BRCA1 gene: signal amplification with gold nanoparticle clusters. **Analyst**, v. 140, n.8, p. 2713-2718, 2015.

SAHA, Krishnendu; AGASTI, Sarit S.; KIM, Chaekyu; LI, Xiaoning; ROTELLO, Vincent M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739-2779, 2012.

SEFEROS, Dwight S.; PRIGODICH, Andrew E.; GILJOHANN, David A.; PATEL, Pinal C.; MIRKIN, Chad A. Polyvalent DNA Nanoparticle Conjugates Stabilize Nucleic Acids. **Nano Letters**, v. 9, n. 1, p. 308-311, 2009.

SHENOY, Dinesh; FU, Wei; LI, Jane; CRASTO, Curtis; JONES, Graham; DIMARZIO, Charles; SRIDHAR, Srinivas; AMIJI, Mansoor. Surface functionalization of gold nanoparticles using hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) spacer for intracellular tracking and delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 51-57, 2006.

SHIRZADFAR, Hamidreza; KHANAHMADI, Mahtab. Application of Biomarkers and Biosensors to Detect and Track Pathogenic Agents. **International Journal of Analytical Techniques**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2018.

SHOKOUFI, Nader; ASBAGHI, Behnaz Abbasgholi Nejad; ABBASI-AHD, Atefeh. Microfluidic chip-photothermal lens microscopy for DNA hybridization assay using gold nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 6119-6128, 2019.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de Dados de Segurança – Sodium Borohydride**. 2011. Disponível em: <https://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Borohidreto%20de%20sodio.pdf>. Acesso em 29 mar. 2021.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J.; BRYCE, David L. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2019.

SOUSA, Eliane Teixeira; LOPES, Wilson A.; DE ANDRADE, Jailson B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

SRIVASTAVA, Sudhanshu; FRANKAMP, Benjamin L.; ROTELLO, Vincent M. Controlled Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles Self-Assembled with PAMAM Dendrimers. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 3, 2005.

STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean A.; PATEL, Trushar R. **Dynamic light scattering: a practical guide applications in biomedical sciences**. *Biophysical Reviews*, v. 8, p. 409-427, 2016.

SU, K. H.; WEI, Q. H.; ZHANG, X. Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. **Nano Letters**, v. 3, n. 8, p. 1087-1090, 2003.

SU, Han; LI, Shaopei; JIN, Yiyun; XIAN, Ziyue; YANG, Duowen; ZHOU, Wenxia; MANGARAN, Franklin; LEUNG, Felicia; SITHAMPARANATHAN, Gobika; KERMAN, Kagan. Nanomaterial-based biosensors for biological detections. **Advanced Health Care Technologies**, v. 3, p. 19-29, 2017.

SUAVE, Jaqueline. **Degradação fotocatalítica heterogênea de polivinilpirrolidona dissolvida em água**. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

TEMPLETON, Allen C.; PIETRON, Jeremy J.; MURRAY, Royce W.; MULVANEY, Paul. Solvent Refractive Index and Core Charge Influences on the Surface Plasmon Absorbance of Alkanethiolate Monolayer-Protected Gold Clusters. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 3, p. 564-570, 2000.

THE BRITISH MUSEUM. **The Lycurgus cup**. Disponível em: https://www.britishmuseum.org/collection/search?title=The%20Lycurgus%20Cup&view=grid&sort=object_name__asc&page=1. Acesso em 19 jun. 2021.

THÉVENOT, Daniel R.; TOTH, Klara; DURST, Richard A.; WILSON, George S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999.

TITUS, Deena; SAMUEL, E. James Jebaseelan; ROOPAN, Selvaraj Mohana. Nanoparticles characterization techniques. *In*: SHUKLA, Ashutosh Kumar; IRAVANI, Siavash (ed.). **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**. Elsevier, 2019. p. 303-319.

TIWARI, Pooja M.; VIG, Komal; DENNIS, Vida A.; SINGH, Shree R. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 1, p. 31-63, 2011.

TOMA, Henrique E.; BONIFÁCIO, Leonardo da Silva. Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 897-900, 2005.

TURKEVICH, John; STEVENSON, Peter Cooper; HILLER, James. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.

VIDOTTI, Marcio; CARVALHAL, Rafaela F.; MENDES, Renata K.; FERREIRA, Danielle C.; KUBOTA, Lauro T. Biosensors Based on Gold Nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 1, p. 3-20, 2011.

VIEIRA, Fabiola Sulpino; PIOLA, Sergio Francisco; BENEVIDES, Rodrigo Pucci de Sá. **Texto para discussão – Vinculação orçamentária do gasto em saúde no Brasil: resultados e argumentos a seu favor**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2019.

VINAYAKA, K. S.; PRASHITH, Kekuda T.R.; MALLIKARJUN, N.; SATEESH, V. N. Anti-dermatophyte activity of *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 7, p. 170-172, 2010.

WANG, Han; ZHENG, Linfeng; PENG, Chen; GUO, Rui; SHEN, Mingwu; SHI, Xiangyang; ZHANG, Guixiang. Computed tomography imaging of cancer cells using acetylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 2979-2988, 2011.

WANG, Qing; LIU, Rongjuan; YANG, Xiaohai; WANG, Kemin; WANG, Jinqing; ZHU, Leiliang He; LI, Qing. Surface plasmon resonance biosensor for enzyme-free amplified microRNA detection based on gold nanoparticles and DNA supersandwich. **Sensors and Actuators B**, v. 223, p. 613-620, 2016.

WANG, Qing; LIU, Rongjuan; YANG, Xiaohai; WANG, Kemin; ZHU, Jinqing; HE, Leiliang; LI, Qing. Surface plasmon resonance biosensor for enzyme-free amplified microRNA detection based on gold nanoparticles and DNA supersandwich. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 223, p. 613-620, 2016.

WANGOO, Nishima; BHASIN, K. K.; MEHTA, S. K.; SURI, C. Raman. Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: Bioconjugation and binding studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 323, p. 247-254, 2008.

WILSON, Robert. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 2028-2045, 2008.

WONGYAI, Kamonpan; WINTACHAI, Phitchayapak; MAUNGCHANG, Rasimate; RATTANAKIT, Parawee. Exploration of the Antimicrobial and Catalytic Properties of Gold Nanoparticles Greenly Synthesized by *Cryptolepis buchanani* Roem. And Shult Extract. **Journal of Nanomaterials**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

WORSFOLD, Paul. Spectrophotometry – Overview. *In*: WORSFOLD, Paul; TOWNSHEND, Alan; POOLE, Colin. (ed.). **Encyclopedia of Analytical Science**. Elsevier, 2005. p. 318-321.

YEH, Yi-Cheun; CRERAN, Brian; ROTELLO, Vincent M. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. **Nanoscale**, v. 4, p. 1871-1880, 2012.

ZAGAYNOVA, E. V.; SHIRMANOVA, M. V.; KIRILLIN, M. Yu; KHLEBTSOV, B. N.; ORLOVA, A. G.; BALALAEVA, I. V.; SIROTKINA, M. A.; BUGROVA, M. L.; AGRBA, P. D.; KAMENSKY, V. A. Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography phantom, *in vivo* studies and Monte Carlo simulation. **Physics in Medicine & Biology**, v. 53, p. 4995-5009, 2008.

ZAVALETA, Cristina L.; SMITH, Bryan R.; WALTON, Ian; DOERING, William; DAVIS, Glenn; SHOJAEL, Borzoyeh; NATAN, Michael J.; GAMBHLR, Sanjiv S. Multiplexed imaging of surface enhanced Raman scattering nanotags in living mice using noninvasive Raman spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 32, p. 13511-13516, 2009.

ZENG, Shuwen; BAILLARGEAT, Dominique; HO, Ho-Pui; YONG, Ken-Tye. Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. **Chemical Society Reviews**, v. 43, p. 3426-3452, 2014.

ZHENG, Hanye; MA, Xiaoming; CHEN, Lisong; LIN, Zhenyu; GUO, Longhua; QIU, Bin; CHEN, Guonan. Label-free electrochemical impedance biosensor for sequence-specific recognition of double-stranded DNA. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5005-5009, 2013.