

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Tese de doutorado

Nucleação e crescimento de nanohíbridos núcleo/casca Au@ZnS  
por rota coloidal aquosa mediada por carboximetilcelulose e estudo  
de propriedades nanofotônicas



Prof. Herman Sander Mansur (assinado digitalmente)  
Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais - DEMET  
ESCOLA DE ENGENHARIA - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
hmansur@demet.ufmg.br herman.mansur2016@gmail.com

**APROVADO**  
**28/10/2020**  
**Herman S Mansur**

Autor: Anderson Caires de Jesus

Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Março/2020

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Anderson Caires de Jesus

Nucleação e crescimento de nanohíbridos núcleo/casca Au@ZnS por rota coloidal aquosa mediada por carboximetilcelulose e estudo de propriedades nanofotônicas

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da escola de engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Metalúrgica.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Engenharia

2020

J58n

Jesus, Anderson Caires de.

Nucleação e crescimento de nanohíbridos núcleo/casca Au@ZnS por rota coloidal aquosa mediada por carboximetilcelulose e estudo de propriedades nanofotônicas [recurso eletrônico] / Anderson Caires de Jesus. – 2020.

1 recurso online (xxiv, 238 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Herman Sander Mansur.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices: f. 207-210.

Bibliografia: f. 211-238.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Ouro - Teses. 4. Nanopartículas - Teses. 5. Pontos quânticos - Teses. 6. Nanofotônica - Teses. 7. Detectores - Teses. I. Mansur, Herman Sander, 1962-. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

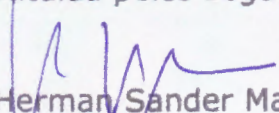
CDU: 620(043)




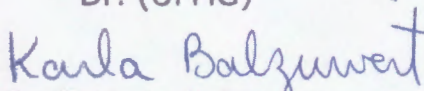
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Metalúrgica, Materiais e de Minas

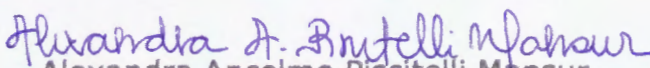



Tese Intitulada "**Nucleação e Crescimento de Nanohíbridos Núcleo/casca Au/ZnS por Rota Coloidal Aquosa Mediada por Carboximetilcelulose e Estudo de Propriedades Nanofotônicas**", área de concentração: Ciência e Eng. Materiais, apresentada pelo candidato **Anderson Caires de Jesus**, para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

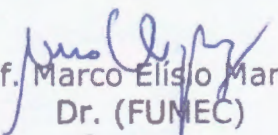
  
Prof. Herman Sander Mansur  
Orientador - Dr. (UFMG)

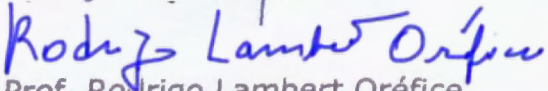
  
Prof. Eduardo Henrique Martins Nunes  
Dr. (UFMG)

  
Prof<sup>a</sup> Karla Balzuweit  
Dr. (UFMG)

  
Alexandra Ancelmo Piscitelli Mansur  
Dr<sup>a</sup> (PNPD-CAPEs)

  
Prof. Fábio Pereira Ramapery  
Dr. (Escola Estadual Ari da França)

  
Prof. Marco Elísio Marques  
Dr. (FUNEC)

  
Prof. Rodrigo Lambert Oréfice  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Metalúrgica, Materiais e de Minas/UFMG

Belo Horizonte, 17 de março de 2020

## **AGRADECIMENTOS**

"Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes (Sir Isaac Newton, 1675)". Muitos gigantes são contribuintes deste trabalho e, principalmente, da minha carreira. Em quatro anos, tive a oportunidade de aprender e vivenciar grandes experiências acadêmicas, com contribuição essencial para meu crescimento pessoal e profissional.

Um agradecimento especial, ao meu orientador, Professor Dr. Herman Sander Mansur, por ter aceitado o desafio e ter me guiado com dedicação e profissionalismo. A Dra. Alexandra Mansur, pela dedicação e orientações fundamentais para este trabalho, bem como na produção acadêmica e ensinamentos diários.

Para os queridos amigos, Isadora Cota, Alice, Josué, Sandhra e toda equipe do LASMAT, pelo apoio constante e força nos momentos de dificuldade. A Nádia, por todos os momentos de apoio, pela amizade e, acima de tudo, por ter sido uma pessoa em quem confiar.

Aos alunos do DEMET, que despertaram na minha mente o desejo de ser professor e, por ter me mostrado a grandeza que é ensinar e aprender juntos.

Aos queridos colegas de departamento, pelos cafés e longas conversas que tanto tem contribuído para meu crescimento. A professora Augusta, pelo apoio, conselhos e, principalmente, sua amizade.

A equipe do CM-UFMG, em especial o Érico, pelo apoio e extrema boa vontade para comigo.

A minha família que sempre procurou apoiar e incentivar ao máximo.

Ao meu herói, papai, que sempre esteve do meu lado, que sempre deu todo apoio, que sempre me ensinou procurar ser a melhor pessoa possível e por me guiar pelo melhor caminho, como pessoa e como profissional.

A toda equipe ppgem, por todo apoio. A CAPES, CNPq, FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao projeto.

Obrigado gigantes.

# SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>XXX</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Notações .....</b>	<b>XXII</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>XXIV</b>
<b>Capítulo 1 - Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>Capítulo 2 - Objetivos .....</b>	<b>04</b>
<b>2.1 - Objetivo Geral.....</b>	<b>04</b>
<b>2.2 - Objetivos específicos.....</b>	<b>04</b>
<b>Capítulo 3 - Revisão bibliográfica .....</b>	<b>05</b>
<b>3.1 - Nanomateriais .....</b>	<b>05</b>
3.1.1 - Nanocristais semicondutores .....	05
3.1.2 - Síntese de Nanocristais semicondutores – O estado da arte.....	07
3.1.3 - Síntese de AuNPs – O estado da arte.....	09
3.1.4 - Síntese ambientalmente sustentável de AuNPs e QDts.. .....	10
3.1.5 - Síntese de Híbridos Metal/Semicondutor – O estado da arte.....	14
3.1.6 - Nanohíbridos Au@ZnS .....	17
<b>3.2 - Plasmônica.....</b>	<b>18</b>
3.2.1 - Ressonância de Plasmon de superfície localizada.....	19
3.2.2 - Propriedades plasmônicas de Nanopartículas metálicas .....	20
<b>3.3 - Fluorescência.....</b>	<b>23</b>
3.3.1 - Técnica de espectroscopia de Fotoluminescência (PL).....	25
<b>3.4 - Heterojunção Metal-Semicondutor.....</b>	<b>25</b>
3.4.1 - Junções Au@ZnS.....	27
<b>Capítulo 4 - Procedimentos Experimentais .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 - Materiais.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 - Métodos experimentais.....</b>	<b>30</b>
4.2.1 - Determinação do pKa da CMC.....	30
4.2.2 - Síntese de AuNPs@CMC .....	31
4.2.3 - Síntese de conjugados AuNPs@CMC_PolyArg.....	31
4.2.4 - Síntese de biconjugados AuNPs@CMC-gp41.....	32
4.2.5 - Síntese de bioconjugados de AuNPs@CMC_PolyArg com anticorpos HIV1 .....	32
4.2.6 - Protocolo do imunoenensaio para detecção do HIV1 (LIA).....	33
4.2.7 - Ensaio ELISA .....	35
4.2.8 - Ensaio de Atividade Mitocondrial (MTT) .....	35
4.2.9 - Síntese de ZnS@CMC .....	37
4.2.10 - Síntese de nanoheterojunção núcleo-casca Au@ZnS-CMC .....	39
4.2.11 - Mistura física entre AuNPs@CMC e ZnS@CMC.....	41

4.2.12 - Variação de espessura da casca de ZnS .....	41
4.2.13 - Nanoheterojunção núcleo-casca Au@ZnS-CMC dopada com índio (Au@ZnS:In-CMC)..	42
<b>4.3 - Caracterização .....</b>	<b>44</b>
4.3.1 - Caracterização óptica .....	44
4.3.2 - Caracterização morfológica e estrutural.....	45
4.3.3 - Caracterização química.....	46
4.3.4 - Caracterização de carga superficial e diâmetro hidrodinâmico.....	46
4.3.5 - Caracterização Biológica .....	46
<b>Capítulo 5 - Resultados e discussões.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 - Caracterização da CMC.....</b>	<b>48</b>
5.1.1 - Caracterização por Potencial Zeta (ZP) .....	51
5.1.2 - Caracterização por espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	52
<b>5.2 - Nucleação e crescimento de AuNPs mediado por CMC.....</b>	<b>55</b>
5.2.1 - Avaliação da influência do GS na síntese de AuNPs estabilizadas por CMC .....	56
5.2.2 - Caracterização das AuNPs@CMC por espectroscopia UV-Vis .....	58
5.2.3 - Caracterização da carga superficial por medidas de potencial Zeta (ZP). .....	62
5.2.4 - Caracterização do tamanho por medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....	62
5.2.5 - Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	63
5.2.6 - Caracterização por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	70
5.2.7 - Caracterização por Difração de Raios-X .....	71
5.2.8 - Caracterização por espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	73
5.2.9 - Avaliação da influência do pH na solução coloidal de AuNPs@CMC .....	76
5.2.9.1 - Influência do pH na absorbância das AuNPs .....	76
5.2.9.2 - Influência do pH no diâmetro hidrodinâmico das AuNPs .....	77
5.2.9.3 - Influência do pH na carga superficial das AuNPs .....	78
5.2.10 - Influência do pH na nucleação e crescimento de AuNPs@CMC. ....	79
5.2.11 - Modelo para nucleação e crescimento de AuNPs@CMC.....	86
5.2.12 - Ensaios Biológicos .....	88
<b>5.3 - Desenvolvimento de um nano biossensor para HIV-1.....</b>	<b>93</b>
5.3.1 - Funcionalização da CMC com PolyArginina (PolyArg) .....	93
5.3.2 - Síntese de AuNPs- CMC_PolyArg .....	95
5.3.3 - Síntese de AuNPs@CMC-PolyArg .....	96
5.3.4 - Caracterização das soluções de AuNPs@CMC e AuNPs@CMC-PolyArg.....	96
5.3.5 - Análises morfológicas e de composição química .....	99
5.3.6 - Análises de carga superficial .....	100
5.3.7 - Caracterização biológica - Ensaios de viabilidade celular .....	103
5.3.8 - Projeto e construção de um nano biossensor para HIV-1 .....	105
5.3.9 - Caracterização dos nanoconjugados por FTIR .....	108
5.3.10 - Caracterização dos nanoconjugados por DLS.....	110
5.3.11 - Nanobiossensor for HIV-1 baseado em espalhamento dinâmico de luz (LIA) .....	115
5.3.12 - Teste ELISA para validação do nanobiossensor LIA .....	118
<b>5.4 - Síntese, caracterização e estudo das propriedades ópticas de ZnS@CMC .....</b>	<b>121</b>
5.4.1 - Caracterização óptica de nanoconjugados ZnS@CMC .....	121
5.4.2 - Análise morfológica de ZnS@CMC.....	133
5.4.3 - Análise de estrutura de ZnS@CMC.....	136

5.4.4 - Análise de propriedades físico-químicas de QDs de ZnS@CMC .....	139
5.4.5 - Análise de propriedades físico-químicas de QDs de ZnS@CMC resultados de FTIR .....	142
5.4.6 - Análises por Espectroscopia XPS .....	145
5.4.7 - Análise biológica de QDs de ZnS@CMC ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> .....	147
5.4.8 - Bioimagem de células de glioma usando ZnS@CMC fluorescentes .....	149
<b>5.5 – Nanoheterojunções plasmônicas fotoluminescentes.....</b>	<b>151</b>
5.5.1 - Modelo matemático para cálculos de espessura da casca .....	151
5.5.2 - Modelo para determinação do LSPR .....	153
5.5.3 - Síntese de nanoheterojunções Au@ZnS-CMC .....	156
5.5.4 - Comparação entre as diferentes dispersões coloidais. ....	159
5.5.5 - Caracterização espectroscópica Au@ZnS-CMC .....	160
5.5.6 - Caracterização morfológica e estrutural.....	173
5.5.7 - Caracterização química por STEM/EELS image mapping .....	179
5.5.8 - Confinamento quântico na casca de ZnS .....	183
5.5.9 - Caracterização morfológica .....	186
<b>5.6 - Nanoheterojunção Au@ZnS-CMC dopada com In<sup>3+</sup> .....</b>	<b>188</b>
5.6.1 - Síntese e caracterização de ZnS:In@CMC .....	189
5.6.2 - Caracterização Espectroscópica.....	190
5.6.3 - Análise morfológica de ZnS:In@CMC .....	194
5.6.4 - Síntese e caracterização de Au@ZnS:In-CMC .....	196
5.6.5 - Análise morfológica de Au@ZnS:In@CMC .....	200
<b>5.7 - Conclusões.....</b>	<b>203</b>
<b>Capítulo 6 - Contribuições para a literatura .....</b>	<b>204</b>
6.1 - Artigos publicados em periódicos.....	204
6.2 - Artigos publicados em colaboração.....	204
<b>Capítulo 7 - Sugestões de trabalhos futuros.....</b>	<b>206</b>
<b>Capítulo 8 – Apêndice A1 .....</b>	<b>207</b>
<b>Capítulo 9 - Referências bibliográficas .....</b>	<b>211</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - a) QDts semicondutores demonstrando a variação de suas propriedades ópticas com o tamanho (modificado e reproduzido com permissão da referência (5)). b) AuNPs de diferentes morfologias (modificado e reproduzido da referência (14) com permissão de The Royal Society of Chemistry).. ..... 1
- Figura 3.1 - Comparação dos estados de energia eletrônicos de materiais semicondutores com diferentes tamanhos. Eg: Energia de band gap, BC: Banda de condução, BV: Banda de valência (Fonte: próprio autor. Adaptado da referência (3)).....6
- Figura 3.2 - Dinâmica de crescimento de AuNPs esféricas. (Fonte: próprio autor. Adaptado da referência (3) com permissão da The Royal Society of Chemistry (RSC) e Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)). ..... 9
- Figura 3.3 - Estrutura química da carboximetilcelulose. (Fonte: Desenho realizado com software ChemSketch®, sendo adaptado das referências (70-80))..... 11
- Figura 3.4 - Ressonância de plasmon em nanopartículas metálicas esféricas a) Polarização de plasmon de superfície (b) Ressonância de plasmon de superfície localizada. (Modificado e reproduzido com permissão da referência (125)) ..... 19
- Figura 3.5 - (a) forte espalhamento de luz, (b) criação em torno de sua superfície de um intenso campo elétrico, (c) transferência de elétrons para materiais próximos e (d) efeito de transferência de energia por ressonância de Förster. (Fonte: Modificado e reproduzido da referência (130) com permissão da The Royal Society of Chemistry).... ..... 21
- Figura 3.6 - Ilustração esquemática da influência do tamanho de uma nanoestrutura metálica sobre o mecanismo de amplificação de sinais ópticos. (a) em pequenas nanopartículas o efeito mais predominante é o de transferência de elétrons do metal para o semicondutor. (b) para nanopartículas maiores a influência do campo elétrico criado pela ressonância de plasmon é mais importante. (c) para nanopartículas muito maiores o espalhamento é o efeito mais importante. (Fonte: Modificado e reproduzido da referência (130) com permissão da The Royal Society of Chemistry)..... 22
- Figura 3.7 - (A) Estados de energia eletrônica em QDts com transição de elétrons da banda de valência (VB) para banda de condução (CB). (B) Espectros de absorção (superior) e de fluorescência (inferior) para QDts. (Fonte: Modificado e reproduzido da referência (4) com permissão da American Chemical Society, Copyright © 2010, American Chemical Society)..... 24

Figura 3.8 - Comparação entre os níveis de energia de materiais metálicos (a), semicondutores (b) e isolantes (c). (Fonte: próprio autor).....25

Figura 3.9 - (a) diagrama de bandas de um metal e de um semicondutor, (b) e de uma junção metal-semicondutor. (Fonte: Próprio Autor, adaptado da referência (153))..... 27

Figura 3.10 - “elétrons quentes” induzidos por Plasmon. a). Plasmons em nanoestruturas metálicas podem decair através de processos radiativos com emissão de fótons ou através de processos não radiativos através da emissão de elétrons (transições intrabanda ou interbanda) b). Os elétrons perto da interface são transportados para o semicondutor e os elétrons longe da interface podem se recombinar com buracos. c,d) Exemplo de um diagrama de bandas para um dispositivo Schottky híbrido Au-TiO<sub>2</sub>. A barreira Schottky impede elétrons de baixa energia de atravessar para o semicondutor. e) Exemplo de um diagrama de bandas para um dispositivo Schottky híbrido Au-CdSe. (Fonte: Modificado e reproduzido com permissão das referências (155-158). Copyright 2016 WILEY (155); (a-b) (157) Copyright 2014, Nature Publishing Group; (c-d) (158) Copyright 2015, Nature Publishing Group; (e) (156) Copyright 2015, American Association for the Advancement of Science... .. 29

Figura 4.1 - Procedimento experimental para síntese de ZnS@CMC.....38

Figura 4.2 - Procedimento experimental para síntese de nanohíbridos núcleo-casca Au@ZnS-CMC..... 40

Figura 5.1 - Curva de titulação da CMC-77. Medidas realizadas no intervalo de pH entre  $(3,0 \pm 0,1)$  e  $(7,0 \pm 0,1)$ . pH ajustado com HCl 0,5M.....49

Figura 5.2 - Curva de titulação da CMC-122. Medidas realizadas no intervalo de pH entre  $(3,0 \pm 0,1)$  e  $(7,0 \pm 0,1)$ . pH ajustado com HCl 0,5 M..... 49

Figura 5.3 - Determinação do valor de pKa da CMC-77 de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch.. ..... 50

Figura 5.4 - Determinação do valor de pKa da CMC-122 de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch.. ..... 50

Figura 5.5 - Resultados de medidas de potencial zeta para amostras de CMC pura em (a) GS 0,77 (CMC-77) e (b) GS 1,22 (CMC-122)..... 52

Figura 5.6 - (A) Espectros de FTIR na CMC (a) CMC-122 e (b) CMC-77. (B) Espectros de FTIR na CMC (a) CMC-122 e (b) CMC-77 para região espectral  $1800-1200 \text{ cm}^{-1}$ , para identificação dos grupos carboxilato (pH  $7,5 \pm 0,1$ )..... 54

Figura 5.7 - Espectros de FTIR na CMC-77 em função do pH para identificação da protonação/desprotonação dos carboxilatos. (a) (3,5 ±0,1), (b) (7,5 ±0,1) e (c) (10,5 ±0,1).....	55
Figura 5.8 - Fotografias mostrando a andamento do processo de síntese utilizando CMC-77. (a) Início do aquecimento, (b) 30min de aquecimento, (c) 1h de aquecimento, (d) 1,5h de aquecimento.....	57
Figura 5.9 - Fotografias mostrando a andamento do processo de síntese utilizando CMC-122. (a) Início do aquecimento, (b) 2h de aquecimento, (c) 5h de aquecimento, (d) 10h de aquecimento..	57
Figura 5.10 - Ilustração do mecanismo de síntese de AuNPs utilizando CMC simultaneamente como agente redutor e agente de estabilização.....	58
Figura 5.11 - Espectros UV-Vis para as medidas de cinética de crescimento das AuNPs na amostra AuNPs@CMC-77. (a) CMC-77, (b) AuNPs@CMC 1h, (c) AuNPs@CMC 2h, (d) AuNPs@CMC 3h, (e) AuNPs@CMC 4h.....	59
Figura 5.12 - Espectros UV-Vis para as medidas de cinética de crescimento das AuNPs na amostra AuNPs@CMC-122. (a) CMC-122, (b) AuNPs@CMC 1h, (c) AuNPs@CMC 3h, (d) AuNPs@CMC 5h, (e) AuNPs@CMC 7h, (f) AuNPs@CMC 9h, (g) AuNPs@CMC 10h.....	60
Figura 5.13 – (A-D) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de AuNPs@CMC-77 em diferentes magnificações. ....	64
Figura 5.14 – (A) imagem de alta resolução de AuNPs@CMC-77, destacando medidas de distância interplanar e (B) imagem com padrão SAED e tabela de distâncias interplanares medidas. ....	65
Figura 5.15 – Histograma de distribuição de tamanhos da amostra AuNPs@CMC-77 medido por MET.....	66
Figura 5.16 – Espectro de EDS das amostras de AuNPs@CMC-77.....	66
Figura 5.17 - (A-D) Imagens de MET de AuNPs@CMC-122 em diferentes magnificações. ....	67

Figura 5.18 – (A) imagem de alta resolução de AuNPs@CMC-122, destacando medidas de distância interplanar e (B) imagem com padrão SAED e tabela de distâncias interplanares medidas.....	68
Figura 5.19 – Histograma de distribuição de tamanhos da amostra AuNPs@CMC-122 medido por MET.....	69
Figura 5.20 – Espectro de EDS da amostra AuNPs@CMC-122 .....	69
Figura 5.21 - (A-B) Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da amostra AuNPs@CMC-122 depositadas em uma superfície de mica.. .....	70
Figura 5.22 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da amostra AuNPs@CMC-77 depositadas em uma grid de MET.....	71
Figura 5.23 - Difratoograma referente à amostra AuNPs@CMC-122.....	72
Figura 5.24 - (A) (a) Resultados das medidas de FTIR na amostra CMC-77 (b) e na amostra AuNPs@CMC-77. (B) Destaque da região 1800 a 1200 $\text{cm}^{-1}$ de (A).....	74
Figura 5.25 - (A) (a) Resultados das medidas de FTIR na CMC 1.22 pura (a) e na amostra AuNPs@CMC-122. (B) Destaque da região 1800 a 1200 $\text{cm}^{-1}$ de (A). .....	75
Figura 5.26 - Medidas de UV-Vis das AuNPs medidos na faixa de pH de 4 a 11.....	76
Figura 5.27 - Medidas de DLS na faixa de pH de 4 a 11, mostrando a variação do HD das AuNPs em função do pH.....	77
Figura 5.28 - Medidas de potencial zeta na faixa de pH de 4 a 10, mostrando a variação da carga superficial das AuNPs em função do pH.....	78
Figura 5.29 - Foto das dispersões coloidais resultante da síntese em diferentes valores de pH.....	79
Figura 5.30 - Resultados de espectroscopia UV-Vis da dinâmica de crescimento das AuNPs em pH $3,5 \pm 0,1$ .....	80
Figura 5.31 - Resultados de espectroscopia UV-Vis da dinâmica de crescimento das AuNPs em pH $(7,1 \pm 0,1)$ . .....	81

Figura 5.32 - Resultados de espectroscopia UV-Vis da dinâmica de crescimento das AuNPs em pH (10,5± 0,1). .....	81
Figura 5.33 - Resultados de espectroscopia UV-Vis normalizados de AuNPs em três diferentes valores de pH. (a) (3,5± 0,1), (b) (7,5± 0,1), e (c) (10,5± 0,1).....	82
Figura 5.34 - Resultados de potencial zeta apresentado os valores de carga superficial para a síntese em três diferentes valores de pH. (barra de erro: desvio padrão, n ≥ 10).. .....	83
Figura 5.35 - Resultados de DLS apresentado os valores de HD para a síntese em três diferentes valores de pH. (barra de erro: desvio padrão, n ≥ 3).....	84
Figura 5.36 - Imagens MET para síntese de AuNPs@CMC em, (a) pH 3,5, (b) pH 7,1 e (c) pH 10,5, utilizando CMC-77.....	85
Figura 5.37 - Modelo de nucleação e crescimento de AuNPs mediado por CMC.....	87
Figura 5.38 - Gráfico MTT após 24 horas de tratamento da amostra AuNPs@CMC-77 em contato com as células HEK293T.....	88
Figura 5.39 - Gráfico MTT após 24 horas de tratamento da amostra AuNPs@CMC-122 em contato com as células HEK293 T.....	89
Figura 5.40 - Imagens de microscopia de células HEK 293 T. (a) sem tratamento (condição controle) e após 6 horas de tratamento com amostras de conjugados (b) AuNPs@CMC-77 25 µg/mL.....	90
Figura 5.41 - Gráfico MTT após 24 horas de tratamento da amostra AuNPs@CMC-77 em contato com as células U87.....	91
Figura 5.42 - Gráfico MTT após 24 horas de tratamento da amostra AuNPs@CMC-122 em contato com as células U87.....	91
Figura 5.43 - Imagens de microscopia de células U87. (a) sem tratamento (condição controle) e após 24 horas de tratamento com amostras de conjugados (b) AuNPs@CMC-122 - 25µg/mL.....	92
Figura 5.44 - (a) Estrutura química da CMC; (b) Polimerização de L-Arginina na presença de EDC (polipeptídeo, PolyArg) e (c) Funcionalização da CMC com PolyArginina (PolyArg) na presença de EDC (polipeptídeo, PolyArg) (x = anel anidrogucose substituído com carboximetil, y = anel anidrogucose não substituído; w	

= PolyArg anel anidroglicose substituído com carboximetil;  $v = x-w$ );  $n=8$ , número de unidade de repetição de L-arginina em PolyArg)..... 94

Figura 5.45 - Espectros de FTIR de (a) CMC e (b) CMC\_PolyArg..... 95

Figura 5.46 - (A) Representação esquemática da síntese de AuNPs com CMC (I) e CMC\_PolyArg (II); ( $x$  = anel anidroglicose substituído com carboximetil,  $y$  = anel anidroglicose não substituído;  $w$  = PolyArg anel anidroglicose substituído com carboximetil;  $v = x-w$ ). (B) Espectros de UV-Vis para coloides de AuNPs sintetizado com (a) CMC (linha vermelha) e (b) CMC\_PolyArg (linha preta). Inserção: Imagem digital das dispersões coloidais AuNPs@CMC (direita, a) e AuNPs@CMC\_PolyArg (esquerda, b)..... 98

Figura 5.47 - Caracterização morfológica, estrutural e química de AuNPs@CMC\_PolyArg: (a) imagens MET e histograma da distribuição de tamanho. (b) espectro EDS e (c) padrão SAED. .... 100

Figura 5.48 - Resultados de DLS e ZP: (a) Representação esquemática das nanoestruturas de casca de núcleo de AuNPs@CMC (esquerda) e AuNPs@CMC\_PolyArg (direita). (b) Medidas de ZP de conjugados AuNPs@CMC, antes e depois da adição de poliarginina para a cadeia polimérica da CMC (barra de erro: desvio padrão,  $n=10$ )..... 102

Figura 5.49 - (A) Resposta da viabilidade celular das linhas celulares (A) HEK 293T e (B) U87 MG com base no ensaio MTT após 24h de incubação com AuNPs@CMC. (C) Curvas de concentração-resposta para (a) linhas de células HEK 293T e (b) U87 MG e (D) valores de IC50. (barra de erro: desvio padrão (SD),  $n = 6$ ). .... 104

Figura 5.50 - (a) Funcionalização da CMC com a glicoproteína gp41 e (b) Funcionalização da CMC\_PolyArg com o anticorpo abHIV, respectivamente, na presença do EDC/NHS. .... 106

Figura 5.51 - Ilustração da metodologia proposta para o desenvolvimento do nanobiosensors utilizando AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg. As duas dispersões coloidais independentes, AuNPs@CMC-gp41 e AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV, são misturadas, e a ligação específica da glicoproteína gp41 (antígeno) com o anticorpo monoclonal HIV-1, atua formando ligações entre as AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg que são perceptíveis pela técnica de DLS pelo significativo aumento do HD e do espalhamento de luz. .... 107

Figura 5.52 - (A) Espectros de FTIR de nanoconjugados baseados em AuNPs@CMC antes e depois da ligação covalente com antígeno (gp41) ou anticorpo (abHIV): (a) AuNPs@CMC; (b) AuNPs@CMC-gp41; (c) AuNPs@CMC\_PolyArg; e (d) AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV. (B) Evolução das bandas vibracionais de (d) carboxilatos (COO-) e (e) Amida II a 1590  $\text{cm}^{-1}$  e 1540  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente,

associadas à formação de ligações covalentes entre o polímero CMC e o peptídeo gp41 (barra de erro: DP, n = 3)..... 109

Figura 5.53 - Distribuições de HD de nanoconjugados baseados em AuNPs@CMC antes e depois da ligação covalente com antígeno (gp41) ou anticorpo (abHIV): (a) AuNPs@CMC; (b) AuNPs@CMC-gp41; (c) AuNPs@CMC\_PolyArg; e (d) AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV..... 111

Figura 5.54 - Intensidade de espalhamento de luz pela dispersão coloidal de (A) AuNPs@CMC e (B) AuNPs@CMC\_PolyArg em diferentes concentrações e 3 condições de pH ácido, neutro e alcalino: (a) pH ( $5,0 \pm 0,1$ ), (b) pH ( $7,0 \pm 0,1$ ) e (c) pH ( $10,0 \pm 0,1$ ) conforme determinado a partir das medições DLS (barra de erro: desvio padrão, n=3)..... 113

Figura 5.55 - (A) Distribuição de tamanho hidrodinâmico de imunoconjugadas e (B) curvas de correlação normalizadas: (a) AuNPs@CMC-gp41; (b) AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV; (c) Ensaio LIA; (d) teste negativo: mistura de dispersões coloidais de AuNPs@CMC-gp41 e AuNPs@CMC\_PolyAr sem conjugação de anticorpos (sem bHIV) (apenas apresentada em (B)).. 117

Figura 5.56 - Ensaio de ELISA. (a) Fotografia digital de parte da placa ELISA de 96 poços usada nos experimentos. 1ª fila: poços sensibilizados com AuNPs-gp41 e testado com anticorpo monoclonal anti-HIV1 em duas concentrações de 1:1500 e 1:3000 (anticorpo: tampão, v/v) de anticorpo secundário. 2ª fila: poços sensibilizados com a proteína gp41 e testado com anticorpo monoclonal anti-HIV1 como um controle positivo a uma concentração de 1:1500 e com tampão de carbonato/bicarbonato como controle. (b) Medidas de absorção em  $\lambda=450\text{nm}$  (barra de erro: desvio padrão, n=3). 118

Figura 5.57 - (a) Curva de dose e resposta LIA (HD) (AuNPs@CMC\_PolyArg-abEIAV e AuNPs@CMC-pgp45); HD determinado a partir de medidas de DLS em função da concentração de anticorpos. (Barra de erro: SD, n=3, tracejada-linha: Referência HD conjugado desvinculado). ..... 120

Figura 5.58 - Espectros de UV-vis e de PL (d-f) de ZnS@CMC em dispersão coloidal para diferentes pHs (A) ( $3,5 \pm 0,1$ ), (B) ( $7,5 \pm 0,1$ ) e (C) ( $10,5 \pm 0,1$ ) e Zn:S ((a,d) 1:2; (b,d) 1:1; (c,f) 2:1). ..... 123

Figura 5.59 - Band gap óptico usando a relação "Tauc" de ZnS@CMC em dispersões coloidais para diferentes valores de pH ((A) ( $3,5 \pm 0,1$ ), (B) ( $7,5 \pm 0,1$ ) e (C) ( $10,5 \pm 0,1$ )). Zn:S ((a) 1:2; (b) 1:1; (c) 2:1..... 124

Figura 5.60 - (A) Band gap óptico ( $E_g$ ) e (B) diâmetro ( $2r$ ) de ZnS@CMC em função do pH em diferentes proporções molares (Zn:S): (a) 1:2, (b) 1:1 e (c) 2:1 (barra de erro: desvio padrão (SD), replica (n)  $\geq 3$ ).. ..... 129

Figura 5.61 - Curvas de excitação-emissão 3D medidas nas diferentes proporções de precursores e pH. .... 131

Figura 5.62 - Relação do QY com tamanho dos QDts de ZnS (2r) em função do pH: (a) 3,5 (ácido); (b) 7,5 (neutro); e (c) 10,5 (alcalina).....	132
Figura 5.63 - (a) Imagens MET e (b) histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas de ZnS@CMC QDts sintetizados em pH 3,5 em diferentes proporções de Zn:S molar: (A) 2:1; (B) 1:1; e (C) 2:1. Para a distribuição de tamanhos foram medidas em média 100 nanopartículas).....	134
Figura 5.64 - Análise da influência da concentração dos precursores Zn:S no tamanho médio (2r) maior ou igual ao ZnS@CMC medida por MET (barra de erro = SD; $n \geq 100$ ) e estimada usando "Relação Tauc" (barra de erro = SD; $n = 3$ ) em pH = 3,5. Inserção: Representação esquemática da dependência de tamanho dos QDts de ZnS@CMC com $[Zn^{2+}]/[S^{2-}]$ na síntese. ....	135
Figura 5.65 - AFM de ZnS@CMC .....	135
Figura 5.66 - Imagens de MET mostrando a morfologia e caracterização química por EDS de ZnS-CMC sintetizados em estequiometria (Zn:S 1:1) e diferente pH. (A) pH (3,5±0,1), (B) pH (7,5±0,1) and (C) pH (10,5±0,1). (a) Imagem MET. Inset: imagem de alta resolução e (b) EDS. ....	137
Figura 5.67 - Imagens de MET mostrando a morfologia e caracterização estrutural de ZnS@CMC sintetizados em diferentes tamanhos pela variação do pH. ....	138
Figura 5.68 - (A) Zeta potencial (barra de erro: desvio padrão, $n \geq 10$ ) e (B) HD (barra de erro: desvio padrão, $n \geq 3$ ) medições em diferentes proporções molar de precursores e pH ((a) (3,5 ± 0,1), (b) (7,5 ± 0,1) e (c) (10,5 ± 0,1)).....	141
Figura 5.69 - (A) Efeito do pH nos espectros FTIR de ZnS 1:2: (a) pH 10,5; (b) pH 7,5; e (c) pH 3,5. Efeito de Zn: S relação molar ((a) ZnS 2:1; (b) ZnS 1:1; e (c) ZnS 1:2) em comparação com CMC (d) em (B) pH 3.5 (pH < pKa) e (C) pH 10.5 (pH > pKa).....	144
Figura 5.70 - Figura 5.70 - XPS (A) Zn 2p e (B) S 2p (Zn:S 2:1, pH 7,5).....	146
Figura 5.71 - Resposta de viabilidade celular de (A) HEK 293T e (B) linhas celulares U87 MG com base no ensaio MTT após 24h de incubação com ZnS@CMC (Zn:S 1:2, pH 3,5) (barra de erro: desvio padrão, $n = 6$ ). ....	148
a 5.72 - Imagens de microscopia confocal da absorção celular da ZnS@CMC emissão azul por (A) células HEK 293T e (B) células U87 MG com tempo de incubação 120 min: (a) Imagem de campo claro, (b) imagem PL e (c) mesclado PL + imagem de campo claro (barra de escala = 10 µm).....	150
Figura 5.73 - Modelo matemático para cálculos de espessura da casca. ....	151



Figura 5.74 - (A) Simulação do LSPR em função da espessura da casca, sendo (a) modelo da equação 5.19 e (b) modelo corrigido pela equação 5.22 e (B) simulação do valor do pico máximo de LSPR com o comprimento de onda ajustados pelo índice de refração em AuNPs@CMC (a) e Au@ZnS-CMC, (b) Dados simulados para uma camada de 2,5nm de ZnS. A dependência conhecida do índice de refração com o comprimento de onda não afeta o comportamento do sistema em relação ao deslocamento para o vermelho do espectro após o crescimento da casca.. ..... 155

Figura 5.75 - Ilustração do processo de crescimento de casca na superfície de AuNPs@CMC formando uma nanoheterojunção núcleo-casca Au@ZnS-CMC (Fonte: próprio autor).. ..... 156

Figura 5.76 - Resultados de potencial Zeta (A) e DLS (B) para amostras de AuNPs@CMC, o efeito da adição de Zn<sup>2+</sup> e após o crescimento da casca de ZnS@CMC em pH ácido (a), neutro (b) e alcalino (c). DLS (n ≥ 5) e ZP (n ≥ 15). ..... 158

Figura 5.77 - Resultados de (a) DLS e (b) potencial Zeta para amostras de AuNPs@CMC, ZnS@CMC, Mix-Au-ZnS@CMC e Au@ZnS-CMC. Todas as amostras foram medidas em pH 7,5 ± 0,5. DLS (n ≥ 5) e ZP (n ≥ 15). ..... 160

Figura 5.78 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC. .... 161

Figura 5.79 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC. .... 162

Figura 5.80 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC. .... 164

Figura 5.81 - (A) Medidas de espectroscopia de fotoluminescência (PL) de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC. (B) Comparação entre PL e absorvância para amostra de Au@ZnS-CMC.  $\lambda_{exc} = 310 \text{ nm}$ . ..... 166

Figura 5.82 - Mapas 3D de excitação-emissão em amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Au@ZnS-CMC e (d) Mix-Au-ZnS@CMC. (ZnS sintetizado com estequiometria 1:1 e pH 7,5±0,2). ..... 167

Figura 5.83 - (A) Ilustração da interface em uma junção Au@ZnS-CMC destacando os processos ópticos na interface metal/semicondutor (1) absorção do ouro na região do UV, (2) transferência de elétrons (Te-) na nano interface metal-semicondutor, (3) reabsorção de fótons pelo ouro e (4) absorção pelo LSPR. TE = Transferência de energia e AuEF = Energia de Fermi para o ouro. (B) Modelo de confinamento quântico na espessura da casca de ZnS. (Fonte: próprio autor). ..... 169

Figura 5.84 - Diagrama de bandas representando os processos esperados de absorção e emissão em uma nanoheterojunção metal-semicondutor (Fonte: próprio autor). .....	170
Figura 5.85 - (A) imagens de MEV para os sistemas de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC e (c) Mix-Au-ZnS@CMC. (B) imagens de MET para os sistemas de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC. (C) imagens de MET de alta resolução destacando as os sistemas mostrados em (B) (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC.....	174
Figura 5.86 - Distribuição de espessura para a casca de ZnS medidas em imagens de MET.....	175
Figura 5.87 - Distribuição de diâmetros para o núcleo de ouro medido em imagens de MET.....	175
Figura 5.88 - Avaliação da nanoestrutura núcleo-casca por MET. (a) Imagem de uma nanoestrutura de Au@ZnS-CMC destacando a medida de distância interplanar na casca e no núcleo. (b) distância interplanar identificada pela estrutura do ouro. (c) distância interplanar identificada na estrutura do ouro. (c) distância interplanar identificada na estrutura do ZnS. (d) distância interplanar identificada na estrutura do ZnS. ....	176
Figura 5.89 - (A) Padrão de difração de elétrons SAED e tabela com resultados com os resultados de distância interplanar da amostra de Au@ZnS-CMC. (B) imagem MET de alta resolução com medidas de dimensões da nanoestrutura.....	178
Figura 5.90 - (A) Medidas de EELS em diferentes posições das Au@ZnS-CMC mostradas em (B). (B) imagem STEM e ilustração mostrando a vista de perfil das nanopartículas, apresentado medidas no centro da nanopartícula (a), na borda da nanopartícula (b) e fora das nanopartículas (c). (C) Intensidade do sinal EELS para (I) zinco e (II) ouro em relação à posição das nanopartículas na imagem STEM (B).....	180
Figura 5.91 - (A) Espectros EELS medidas no centro da nanopartícula (a). (B) Ampliação da região 0-20eV do espectro (A). ....	181
Figura 5.92 - (A) (a) Imagem STEM das nanoestruturas tipo núcleo-casca Au@ZnS-CMC. (b) Mapa de distribuição de ouro, (c) mapa de distribuição de zinco, (d) Combinação das figuras (b) e (d). Inset: Combinação do mapa de distribuição de plasmons com mapa filtrado na energia do band gap do ZnS ~ 4eV. (B) (a) Distribuição de plasmons pelos núcleos metálicos (b) mapa gerado pela filtragem de energia no gap do material semicondutor 4eV e (c) Combinação de (B) (a) e (b). ....	182
Figura 5.93 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC 1L e (c) Au@ZnS-CMC 2L. ....	183
Figura 5.94 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC 1L e (c) Au@ZnS-CMC 2L na faixa entre 450 e 900 nm.....	184

Figura 5.95 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC 1L e (c) Au@ZnS-CMC 2L na faixa entre 200 e 400 nm.....	185
Figura 5.96 – Modelo de confinamento quântico na espessura da casca de ZnS. ....	186
Figura 5.97 - Imagens da Au@ZnS-CMC com o crescimento de uma segunda camada de ZnS.....	187
Figura 5.98 - Ilustração do processo de crescimento de casca na superfície de AuNPs@CMC, formando uma nanoheterojunção núcleo-casca dopada com índio Au@ZnS:In-CMC.....	189
Figura 5.99 - Valores medidos de ZP e DLS nas amostras de ZnS@CMC e Zn(In)S@CMC. (Zn:In 1:0,3). DLS ( $n \geq 5$ ) e ZP ( $n \geq 15$ ).....	190
Figura 5.100 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) ZnS-CMC e (b-f) Zn(In)S@CMC em diferentes concentrações do precursor de índio ( $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ ). A concentração de ZnS foi mantida igual em todas as amostras [ $Zn^{2+} = 0,5mM$ e $S^{2-} = 0,5mM$ ]; ( $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ ), (b) 1:0,1, (c) 1:0,2, (d) 1:0,3, (e) 1:0,5 e (f) 1:0,7..	191
Figura 5.101 – (A) Tauc para amostras de (a) ZnS-CMC e (b-f) Zn(In)S@CMC em diferentes concentrações do precursor de índio ( $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ ). A concentração de ZnS foi mantida igual em todas as amostras [ $Zn^{2+} = 0,5mM$ e $S^{2-} = 0,5mM$ ]; (B) variação do band gap em função da razão ( $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ ). ....	192
Figura 5.102 - Medidas de PL de amostras de (a) ZnS@CMC e (b) ZnS:In@CMC...	193
Figura 5.103 - (A) (a) Imagens de MET para Zn(In)S@CMC e (B) Espectro de EDS para Zn(In)S@CMC. (Zn:In 1:0,3).....	195
Figura 5.104 – Valores medidos de ZP e DLS com e sem a dopagem com In para amostras de Au@ZnS-CMC. (Zn:In 1:0,3). ( $n \geq 5$ ) e ZP ( $n \geq 15$ ). ....	196
Figura 5.105 - Espectros UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC e (c-e) Au@Zn(In)S-CMC em função da razão $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ (c) 1:0,1, (d) 1:0,3 e (e) 1:0,7. ....	198
Figura 5.106 - Medidas de PL de amostras de (a) ZnS@CMC, (b) ZnS:In@CMC e ZnS@CMC e (c) Au@ZnS-CMC. (Zn:In 1:0,3).....	199
Figura 5.107 - (A) Imagens de MET para Au@ZnS:In e (B) Espectro de EDS para Au@ZnS:In. (Zn:In 1:0,3) .....	201

Figura 5.108 - Imagem MET (a) e MET no modo varredura (b) de Au@Zn(In)S-CMC. (c) Mapa de distribuição de Au e Zn, (d) mapa de distribuição de Au, (e) mapa de distribuição de Zn, (d) mapa de distribuição de In. (Zn:In 1:0,3).....	202
Figura A1 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) amostra após a purificação por centrifugação e (d) o sobrenadante resultante da centrifugação. ....	207
Figura A2 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) amostra após a purificação por centrifugação e (d) sobrenadante resultante da centrifugação (Inset: foto após a centrifugação mostrando Au@ZnS-CMC depositado no fundo do eppendorf). ....	208
Figura A3 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) amostra após a purificação por centrifugação e (d) sobrenadante resultante da centrifugação. ....	209
Figura A4 - Medidas de espectroscopia PL de amostras de (a) Au@ZnS-CMC, (b) Au@ZnS-CMC após a purificação por centrifugação, (c) sobrenadante resultante da centrifugação e (d) ZnS@CMC para comparação. ....	210

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Concentrações de precursores na síntese de ZnS@CMC

Tabela 4.2 - Concentração dos precursores na síntese de Au@Zn(In)S-CMC

Tabela 4.3 - Concentração na condição de síntese de Au@Zn(In)S-CMC

Tabela 5.1 – Potencial zeta de CMC em diferentes valores de pH (mV)

Tabela 5.2 - Diâmetro, concentração e densidade de nanopartículas na solução coloidal calculados pelo espectro UV-Vis

Tabela 5.3 – Potencial zeta (mV) e HD (nm) de AuNPs@CMC

Tabela 5.4 – Sensibilidade para medidas de espalhamento de luz em coloides de AuNPs@CMC

Tabela 5.5. Resumo das propriedades de ZnS@CMC nanoconjugados

Tabela 5.6 - ZnS interplanar distance (111) em função do pH

Tabela 5.7 – ZnS interplanar distance (111) em função do diâmetro

## LISTA DE ABREVIATURAS E NOTAÇÕES

AuNPs – Nanopartículas de ouro

AuNPs@CMC – Nanopartículas de ouro estabilizadas por CMC

Au@ZnS-CMC – Nanoheterojunções com núcleo de ouro e casca de ZnS estabilizados por CMC.

Au@ZnS:In-CMC – Nanoheterojunções com núcleo de ouro e casca de ZnS estabilizados por CMC dopadas com índio.

AuNPs@CMC\_PolyArg - AuNPs estabilizadas por CMC modificada por poli arginina

BSA – Albumina bovina

BC – Banda de condução

BV – Banda de valência

COO<sup>-</sup> - Carboxilato

COOH – Acido carboxílico

CMC – Carboximetilcelulose

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EELS – Espectroscopia por perda de energia de elétrons

FRET - Transferência de energia por ressonância de Förster

E<sub>g</sub> – Energia de band gap

E<sub>gPQ</sub> - Energias de band gap para QDs.

Gp41 – proteína gp41 (HIV)

GS - Grau de Substituição

HIV1 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

H<sub>D</sub> – Diâmetro hidrodinâmico

LIA – Laser immunoassay

LSPR - Ressonância de plasmon de superfície localizada

MNPs - Nanopartículas metálicas

pM – pico molar

PIRET – Transferência de energia induzida por Plasmon

QDs - Nanocristais semicondutores

QY – Rendimento quântico

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ZnS – Sulfeto de zinco

ZnS@CMC– Sulfeto de zinco estabilizados por CMC

ZP – Zeta Potencial

$(e^-/h^+)$  – Par elétron/buraco

$\mu$  é a massa reduzida do éxciton no sólido.

## Resumo

O desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados é de vital relevância para a solução de diversos desafios na sociedade contemporânea. Neste sentido, dispersões coloidais de pontos quânticos (QDs) de ZnS e nanopartículas de ouro (AuNPs), têm sido extensivamente estudadas devido a suas propriedades ópticas e sua capacidade de biofuncionalização. Neste trabalho, foi realizada a síntese e um amplo estudo de dispersões coloidais aquosas de AuNPs, QDs de ZnS e nanoheterojunções (Au@ZnS), por rota coloidal aquosa mediada por carboximetilcelulose (CMC). Os materiais nanoestruturados desenvolvidos foram caracterizados por técnicas morfológicas, espectroscópicas e químicas. Os resultados obtidos demonstram nanoestruturas metálicas cristalinas de diâmetro em torno de 20 nm, estáveis e com características físico-químicas, coloidais e ópticas dependentes do pH e do grau de substituição das cadeias poliméricas da CMC associado ao efeito da protonação/desprotonação dos grupos carboxilatos ( $\text{COO}^-/\text{COOH}$ ), no mecanismo de nucleação e crescimento coloidal. AuNPs@CMC nanoconjugados com a glicoproteína gp41 e anticorpos anti-HIV1, foram aplicados como biossensor para detecção de HIV, com sensibilidade na ordem de pM, através de espalhamento de luz em dispersão coloidal. A síntese de QDs de ZnS, apresentou nanocristais com diâmetro em torno de 3 nm e, características dependentes das condições de síntese, com significativa emissão de luz (~430 nm) e rendimento quântico (QY) de 0,3 %, sendo aplicados para bioimagem de células cancerígenas de glioma. As condições químicas da cadeia polimérica ( $\text{RCOO}^- \rightarrow \text{COOH}$ ), juntamente com a estequiometria de reação (Zn:S), apresentou efeito fundamental na nucleação e crescimento dos QDs de ZnS@CMC, influenciando nas propriedades ópticas de absorção e emissão. A casca de ZnS nanocristalina com espessura de 2,5 nm, garantiu o confinamento quântico na nanoheterojunção Au@ZnS-CMC, resultando em emissão de luz (~430 nm), com acoplamento plasmon/éxciton e mecanismos de transferência de carga/energia na interface influenciando a ressonância plasmônica e a emissão fotoluminescente. A inclusão de íons trivalentes ( $\text{In}^{3+}$ ) na estrutura cristalina da casca, resultou em ajuste do band gap e, na supressão da emissão de luz (quenching), devido à complexa estrutura de defeitos.



## Abstract

Nowadays, the development of new nanostructured materials is vital for nanotechnology applications. In this sense, colloidal dispersions of ZnS quantum dots (QDs) and gold nanoparticles (AuNPs), have been extensively studied due to their optical properties and biofunctionalization capacity. In this work, the synthesis of aqueous colloidal dispersions of AuNPs, ZnS QDs and nanoheterojunctions (Au@ZnS-CMC) were carried out by aqueous colloidal route mediated by carboxymethylcellulose (CMC) biopolymer. The nanostructured materials were characterized by morphological, spectroscopic, and chemical techniques. The results demonstrate 20 nm diameter crystalline metallic nanostructures, stable and with physicochemical, colloidal and optical properties dependent on the pH and the degree of substitution of the CMC polymer chains associated with the protonation/deprotonation effect of the carboxylate groups ( $\text{COO}^-/\text{COOH}$ ), in the nucleation and colloidal growth mechanism. AuNPs@CMC nanoconjugates with the glycoprotein gp41 and anti-HIV1 antibodies, were applied as a biosensor for HIV detection, with sensitivity in the order of pM, through light scattering in colloidal dispersion. The synthesis of ZnS QDs, presented nanocrystals with a diameter around 3 nm and optical properties dependent on the synthesis conditions, with significant light emission ( $\sim 430$  nm) and quantum yield (QY) of 0.3%, being applied to bioimaging of glioma cancer cells. The chemical conditions of the polymeric chain ( $\text{RCOO}^- \rightarrow \text{COOH}$ ), combined with the reaction stoichiometry (Zn:S), had a fundamental effect on the nucleation and growth of ZnS@CMC QDs, influencing the optical properties. The 2.5 nm thick nanocrystalline ZnS shell ensured quantum confinement in the Au@ZnS-CMC nanoheterojunction, resulting in light emission ( $\sim 430$  nm), with plasmon/exciton coupling and charge/energy transfer mechanisms in the interface influencing plasmon resonance and photoluminescent emission. The inclusion of trivalent ions ( $\text{In}^{3+}$ ) in the crystalline structure of the shell resulted in the adjustment of the band gap and in the suppression of light emission (quenching), due to the complex structure of defects.

## Capítulo 1 - Introdução

O desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados é de vital relevância para o desenvolvimento científico e tecnológico. Pontos quânticos “Quantum dots” (QDs) <sup>(1-5)</sup>, nanopartículas metálicas (MNPs) <sup>(6-7)</sup>, nanoestruturas de carbono <sup>(8-9)</sup> e nanomateriais híbridos <sup>(10-11)</sup> têm sido extensivamente estudados, principalmente devido às suas propriedades físico-químicas e comportamento óptico <sup>(12)</sup>. Em especial, dispersões coloidais de QDs de ZnS e de nanopartículas de ouro (AuNPs) têm sido extensivamente estudadas devido a suas propriedades ópticas e capacidade de biofuncionalização <sup>(13-16)</sup>. As novas propriedades apresentadas por esses materiais são relacionadas principalmente ao seu tamanho em escala nanométrica, o que provoca a ocorrência de efeitos de confinamento quântico, e pela significativa razão entre área superficial e volume <sup>(17)</sup>. A Figura 1.1 apresenta imagens de dispersões coloidais de QDs semicondutores em (a), e AuNPs em (b), demonstrando o efeito destas propriedades em escala nanométrica sobre as características macroscópicas dos nanomateriais.

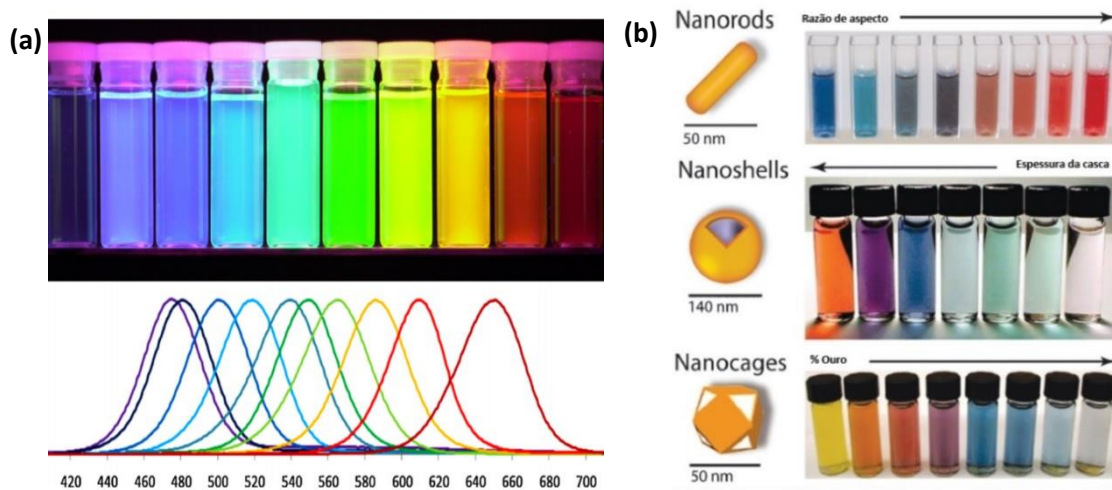


Figura 1.1 - a) QDs semicondutores demonstrando a variação de suas propriedades ópticas com o tamanho (modificado e reproduzido com permissão da referência (5)). b) AuNPs de diferentes morfologias (modificado e reproduzido da referência (14) com permissão de The Royal Society of Chemistry).

Dispersões coloidais de QDs, são uma classe de nanomateriais semicondutores amplamente aplicadas para bioimagem de sistemas biológicos e em biossensoriamento, devido à emissão fotoluminescente dependente do tamanho, fenômeno associado ao confinamento quântico dos elétrons <sup>(18-22)</sup>. Por outro lado, AuNPs <sup>(23-24)</sup>, são promissoras para aplicações biomédicas, devido à possibilidade de biofuncionalização com proteínas e anticorpos, e principalmente, pelo fenômeno de ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR) <sup>(25-27)</sup>. LSPR são modos eletromagnéticos criados na superfície de nanoestruturas metálicas, associados com oscilações coletivas dos elétrons de condução confinados em dimensões menores que o comprimento de onda de excitação. Sistemas híbridos entre QDs e AuNPs são interessantes, principalmente porque combinam as propriedades plasmônicas das AuNPs com as propriedades luminescentes dos QDs, formando nanoestruturas híbridas funcionais com propriedades diferentes de seus constituintes individuais <sup>(28)</sup>.

A síntese de nanomateriais, contudo, é geralmente realizada através de rotas químicas orgânicas que envolvem a utilização de reagentes tóxicos ou de elevada toxicidade em meio biológico. Assim, recentemente tem havido um grande interesse na síntese de nanomateriais utilizando técnicas e procedimentos ambientalmente sustentáveis, eliminando metais pesados, ligantes tóxicos e resíduos perigosos. Neste trabalho, a síntese de AuNPs foi realizada através da mediação do biopolímero carboximetilcelulose (CMC). A celulose é um polissacarídeo abundante, natural e renovável que pode ser modificado em CMC substituindo o grupo CH<sub>2</sub>OH da unidade de glicose por um grupo carboxilato (-COO<sup>-</sup>). Sendo um derivado de celulose, a CMC pode ser um ótimo agente de estabilização de MNPs e QDs em meio aquoso em aplicações visando a biocompatibilidade, devido ao seu caráter aniônico, a dependência das características da cadeia polimérica com o pH e pela solubilidade em água. As propriedades físico-químicas da CMC dependem do grau de substituição (GS). O GS é o número médio de grupos hidroxila substituídos por unidade monomérica, sendo de significativa influência na solubilidade de soluções de CMC. Sendo assim, tem grande importância em métodos de síntese aquosa de nanomateriais. Recentemente, diversos trabalhos têm sido publicados com a utilização de CMC para síntese de nanomateriais <sup>(29-31)</sup>.

Neste trabalho, foram desenvolvidas dispersões coloidais aquosas de AuNPs utilizando CMC como agente de redução e estabilização (AuNPs@CMC), e ainda um sistemático estudo das condições de síntese e sua dependência com o pH e o GS. A síntese ainda foi realizada com uma inovadora metodologia para crescimento de AuNPs através de CMC com cadeias poliméricas modificadas com o aminoácido arginina. Esses coloides foram aplicados no desenvolvimento de um inovador método de detecção de HIV1 por espalhamento de luz pelo método de LIA (Laser immunoassay). Além disto, foi sistematicamente estudado as condições e parâmetros de síntese de QDs de ZnS estabilizados por CMC (ZnS@CMC), sendo então aplicados para bioimagem de células de tumor cerebral (glioma). Como consequência das etapas de desenvolvimento realizadas, o objetivo principal deste trabalho foi alcançado com o desenvolvimento de uma nanoestrutura híbrida, constituída por um núcleo metálico de ouro e uma casca semicondutora de ZnS, formando uma nanoheterojunção plasmônica fotoluminescente com morfologia núcleo/casca (Au@ZnS-CMC), que foi desenvolvida através de rota aquosa a temperatura ambiente e mediada pelo biopolímero CMC.

## Capítulo 2 – Objetivos

### 2.1 – Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto foi o desenvolvimento de dispersões coloidais aquosas de AuNPs, QDts de ZnS e nanoestruturas híbridas, constituídas por um núcleo de ouro e casca de ZnS, a temperatura ambiente, mediada pelo biopolímero carboximetilcelulose (CMC) e estudo das propriedades físico-químicas e ópticas.

### 2.2 - Objetivos específicos

- Síntese de AuNPs estabilizadas por CMC em dispersão coloidal aquosa e sua completa caracterização espectroscópica, morfológica e química.
- Avaliação dos parâmetros de síntese nas propriedades físico-químicas e ópticas de AuNPs.
- Desenvolvimento de ensaio imunológico para detecção de HIV1 através de espalhamento dinâmico de luz pelo método LIA (*Light Scattering Immunoassay*).
- Síntese de QDts de ZnS estabilizados por CMC em dispersão coloidal e sua completa caracterização espectroscópica, morfológica e química.
- Avaliação dos parâmetros de síntese nas propriedades físico-químicas e ópticas de ZnS@CMC.
- Aplicação de ZnS@CMC como método de bioimagem para identificação de células cancerígenas de tumor cerebral.
- Nucleação e crescimento de uma casca de ZnS na superfície de AuNPs pela mediação e estabilização do biopolímero CMC, para formação de nanoheterojunções metal/semicondutor e sua completa caracterização espectroscópica, morfológica e química.
- Avaliação das propriedades ópticas em dispersões coloidais formadas pela mistura física entre AuNPs@CMC e ZnS@CMC.
- Nucleação e crescimento de uma casca de ZnS dopada com íons ( $\text{In}^{3+}$ ) na superfície de AuNPs@CMC pela mediação da CMC, e sua completa caracterização espectroscópica, morfológica e química. Avaliação das propriedades ópticas em dispersões coloidais de nanoheterojunções dopadas.

## Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

### 3.1 - Nanomateriais

#### 3.1.1 – Nanocristais semicondutores

QDts <sup>(1-5, 32)</sup>, são nanocristais cristalinos de reduzidas dimensões (1-5 nm), em que efeitos do confinamento quântico dos elétrons tem considerável influência nas propriedades das dispersões coloidais. Desde a sua descoberta em 1982, por Efros e Ekimov <sup>(33-35)</sup>, tem considerável atenção como um componente importante de pesquisa em nanotecnologia, devido à emissão de fotoluminescência e a dependência do comprimento de onda de emissão com o diâmetro.

Os nanomateriais semicondutores em geral são caracterizados pelas suas estruturas de banda, principalmente sua energia de band gap ( $E_g$ ), sendo a energia mínima necessária para excitar um elétron da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC). Em materiais de gap direto, a posição do mínimo da banda de condução e do máximo da banda de valência ocorre no centro da zona de Brillouin, e nos de gap indireto ocorrem fora do centro. Fisicamente, isso é caracterizado pelo fato de que os materiais com gap indireto, têm que absorver ou emitir um fônon, para garantir a conservação do momento durante os processos de transições intra-banda. Devido à necessidade de emissão ou absorção de um fônon, o tipo de transição é de segunda ordem, caracterizada por baixa probabilidade de transição óptica e consequentemente baixa eficiência quântica de emissão, além de ter tempo de vida radiativos elevados em comparação com os materiais de gap direto <sup>(36)</sup>. QDts, têm uma energia adicional devido ao confinamento dos elétrons em sua estrutura, diferindo dos materiais em escala “bulk” pelo aparecimento níveis quantificados de energia. Além disso, existe a possibilidade de emissão de luz em diversos comprimentos de onda, devido à dependência do grau de confinamento dos elétrons com as dimensões dos nanocristais (Figura 3.1).

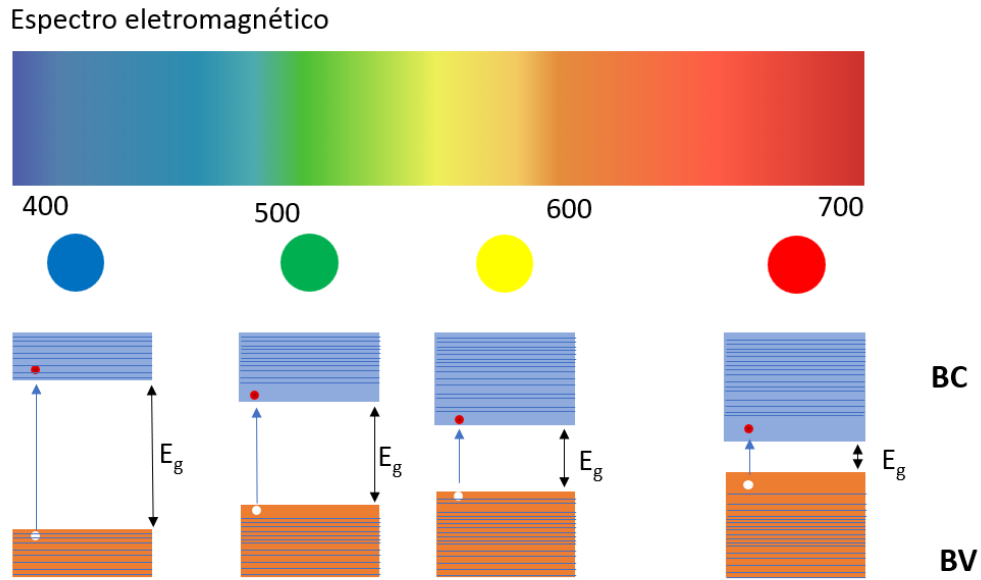


Figura 3.1 - Comparação dos estados de energia eletrônicos de materiais semicondutores com diferentes tamanhos.  $E_g$ : Energia de band gap, BC: Banda de condução, BV: Banda de valência (Fonte: próprio autor. Adaptado da referência (3)).

Quando excitados por radiação eletromagnética de energia maior que sua energia de band gap, os elétrons em QDs podem ser promovidos da banda de valência para a banda de condução. Esse processo gera um par elétron-buraco ( $e^-/h^+$ ), também conhecido por éxciton, que após determinado tempo de relaxação, decaem para os níveis de valência (recombinação do par), com consequente emissão de fótons com energia igual à energia de band gap. Em materiais com band gap indireto, é necessário levar em consideração à energia do fônon absorvido ou emitido pela rede cristalina, diminuindo assim a probabilidade de recombinação com emissão de um fóton. A equação 3.1 apresenta a relação entre o tamanho da partícula e a energia de band gap para QDs semicondutores.

$$E_g = E_{g(bulk)} + \left( \frac{h^2}{8R^2} \right) \left( \frac{1}{\mu} \right) - \left( \frac{1,8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon R} \right) \quad (3.1)$$

Onde:

$E_g$  e  $E_{g(\text{bulk})}$  são, respectivamente, as energias de band gap para QDs e para o sólido “bulk”, respectivamente.

$R$  é o raio do ponto quântico.

$\mu$  é a massa reduzida do éxciton no sólido.

$e$  é a carga elementar do elétron.

### 3.1.2 – Síntese de Nanocristais semicondutores – O estado da arte.

A síntese de QDs geralmente utiliza precursores orgânicos e organometálicos em alta temperatura, utilizando como agente de estabilização, solventes orgânicos de elevado ponto de ebulição <sup>(37-38)</sup>. Entre os agentes estabilizantes, ligantes tióis são vantajosos porque são eficazes para a formação de QDs monodispersos, com reduzidas dimensões, sendo aplicáveis a uma ampla variedade de nanocristais semicondutores, tais como, cádmio, zinco, chumbo, ect. A síntese utilizando ácido mercaptopropiônico tem sido desenvolvida para diversos tipos de QDs, tais como, Zn (ZnS, ZnSe, ZnTe), Cd (CdS, CdSe, CdTe), Pb (PbS, PbSe), além de ligas e estruturas do tipo núcleo/casca <sup>(39-43)</sup>.

A síntese de QDs contendo cádmio (CdS, CdSe e CdTe) é geralmente realizada a alta temperatura utilizando acetato de cádmio  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd}$  como precursor, e elementos calcogênios (S, Se ou Te) em meio orgânico, sendo utilizados diversos compostos estabilizantes <sup>(44)</sup>. Em uma síntese típica, precursores organometálicos são adicionados a solventes de coordenação em um recipiente a altas temperaturas ( $\approx 300^\circ\text{C}$ ). Basicamente, os solventes de coordenação servem como ligante, sendo geralmente uma mistura de agentes tensoativos. Durante o processo de síntese, seus grupos terminais funcionais são ligados à superfície dos QDs, deixando as cadeias disponíveis na superfície. Um requisito experimental é a necessidade de ser realizada em atmosfera inerte, juntamente com injeção rápida dos precursores metálicos. Esse processo de síntese envolve o uso de produtos químicos perigosos e diversos cuidados em seu processo.



Abordagens mais simples, e ambientalmente sustentáveis, têm sido desenvolvidas para síntese de pontos quânticos, pela substituição do cádmio, altamente tóxico, por zinco, geralmente ZnS, sintetizado em meio aquoso. Além disso, polímeros têm sido utilizados para diminuir a toxicidade. Essas abordagens mais “verdes” incluem ainda utilização de matérias-primas ambientalmente sustentáveis, como solventes e agentes de coordenação, tais como o ácido oleico, de rícino, e azeite. Estes são três notáveis alternativas verdes de materiais ambientalmente sustentáveis utilizados na síntese de QDs, evitando a necessidade de utilização de produtos químicos, tóxicos, caros e sensíveis ao ar.

Recentemente, tem sido muito explorada a síntese de QDs em meio aquoso. Lihong Jing *et al* <sup>(45)</sup>, publicou um extensivo artigo de revisão com os mais recentes desenvolvimentos em síntese de QDs semicondutores em meio aquoso. A abordagem aquosa para síntese é atualmente utilizada para produção de vários compostos binários estáveis de átomos dos grupos II-VI e IV-VI da tabela periódica, tais como, CdS <sup>(46)</sup>, ZnS, CdTe <sup>(47)</sup>, CdSe <sup>(48-49)</sup>, ZnSe, PbS e ligas de CdSeTe, CdHgTe, ZnSeS, ZnCdSe, ZnHgSe e ZnSeTe. Em uma síntese típica, o precursor de metal é dissolvido em água e coordenado por agentes hidrofílicos. O precursor calcogênio é preparado em meio aquoso, a partir da redução química de selênio (Se) ou telúrio (Te), por boro-hidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>). Atmosfera inerte não é necessária porque precursores são estáveis. Após a adição do precursor a reação é submetida a refluxo para promover o crescimento dos QDs <sup>(45-49)</sup>.

### 3.1.3 - Síntese de AuNPs – O estado da arte.

Métodos de síntese têm sido relatados nos últimos anos na tentativa de obter AuNPs de alta qualidade, homogêneas e estáveis <sup>(6)</sup>. Na metodologia de síntese de AuNPs por redução química, as nanopartículas são crescidas pela redução de ácido cloroáurico por diversos agentes redutores, tais como, boridreto de sódio, citrato de sódio e ácido ascórbico. A figura 3.2 apresenta um diagrama mostrando a dinâmica do processo de crescimento de nanopartículas em meio aquoso. Neste processo, o agente redutor atua, simultaneamente, reduzindo os íons de ouro  $\text{Au}^{3+}$  para átomos de ouro neutros  $\text{Au}^0$ , e como agente de estabilização, garantindo a estabilidade da dispersão coloidal. Neste processo de formação de AuNPs pode ser observada por uma mudança de cor já que dispersões coloidais de AuNPs apresentam geralmente cor vermelha devido a absorvância em torno de 520 nm, causada pela oscilação dos elétrons livres no metal.

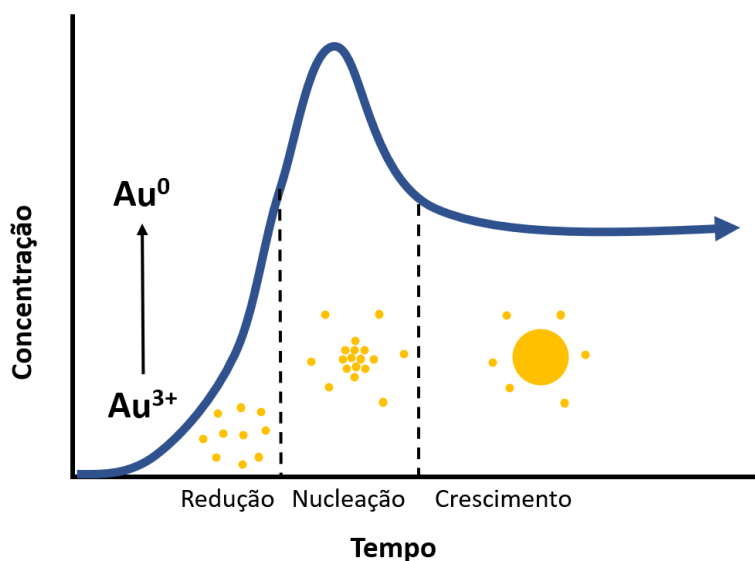


Figura 3.2 - Dinâmica de crescimento de AuNPs esféricas. (Fonte: próprio autor. Adaptado da referência (3) com permissão da The Royal Society of Chemistry (RSC) e Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)).

Outro método de síntese comum na literatura é o chamado de “mediado por sementes”, descoberto por Murphy *et al* <sup>(50)</sup>. Esse processo é realizado pelo crescimento de AuNPs de pequeno diâmetro, de cerca de ~3 nm, geralmente por redução de uma

solução de ácido cloroáurico em meio aquoso. Estas nanopartículas são chamadas de “sementes” porque serão a base para o crescimento das AuNPs de maior dimensão e geralmente anisotrópicas. Essa semente é adicionada em uma solução, chamada de solução de crescimento, sendo essa última uma solução aquosa de  $\text{HAuCl}_4$  e  $\text{AgNO}_3$  em dispersão em solução de surfactante <sup>(50)</sup>. Essa solução é preparada reduzindo os íons de ouro  $\text{Au}^{3+}$  para  $\text{Au}^+$  com um agente redutor fraco, geralmente ácido ascórbico. Quando as sementes são adicionadas na solução de crescimento, elas atuam catalisando a redução dos íons de ouro  $\text{Au}^+$  para  $\text{Au}^0$  o que causa a ignição do crescimento de AuNPs. Com a utilização de surfactantes com determinada preferência de ligação em planos cristalográficos específicos do ouro, o crescimento resulta em partículas assimétricas, cuja morfologia pode ser controlada. A função dos íons de prata é desacelerar a taxa de crescimento sobre estas faces, fazendo os átomos de ouro ser predominantemente depositados sobre as faces de outros planos cristalográficos. O tamanho e a forma das nanopartículas podem ser modificados ajustando cuidadosamente as condições de crescimento, tais como a composição do surfactante, o pH, as quantidades e concentração dos reagentes, a temperatura, e a estrutura das sementes.

Além destes métodos, existem outros para síntese de nanopartículas metálicas. O método fotoquímico, foi originalmente reportado por Peidong Yang *et al* <sup>(51)</sup>. Este método é semelhante ao método de crescimento mediado por semente, diferindo no fato de que as reações fotoquímicas promoveram o crescimento de AuNPs (sementes), sendo que o surfactante direciona o crescimento das AuNPs, o ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) é o precursor de ouro, o nitrato de prata induz do crescimento anisotrópico, sendo utilizado ciclohexano para promover a formação de micelas e acetona como iniciador, que promove a redução de  $\text{Au}^{3+}$  em  $\text{Au}^0$  através do  $\text{Au}^+$  intermediário, originado da primeira redução do precursor de ouro com um agente redutor fraco.

### **3.1.4 – Síntese ambientalmente sustentável de AuNPs e QDts.**

Como visto anteriormente, a síntese de AuNPs é geralmente realizada utilizando reagentes pouco sustentáveis ou tóxicos, tais como, agentes surfactantes e agentes redutores (boridetro de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) ou citrato de sódio ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$ )). Uma abordagem mais ambientalmente sustentável para síntese de nanopartículas metálicas, é

a substituição destes compostos por outros não-tóxicos. Recentemente, tem havido muito interesse para a síntese de nanomateriais utilizando técnicas e procedimentos sustentáveis, eliminando metais pesados, ligantes tóxicos, e resíduos perigosos <sup>(52)</sup>. Diversos autores têm publicado mecanismos e processos de síntese de MNPs, utilizando reagentes alternativos para redução, tais como, plantas <sup>(53-55)</sup>, Óleos <sup>(56-57)</sup>, polissacarídeos <sup>(58-59)</sup>, quitosana <sup>(60-62)</sup>, entre outros <sup>(63-67)</sup>.

Neste trabalho, a síntese de nanopartículas metálicas foi realizada através de carboximetilcelulose <sup>(68-69)</sup>. Sendo um derivado de celulose, a CMC (Figura 3.3), pode ser um ótimo agente de estabilização de nanomateriais em meio aquoso em aplicações visando a biocompatibilidade, devido ao seu caráter aniônico, a dependência das características da cadeia polimérica com o pH e sua solubilidade em água.

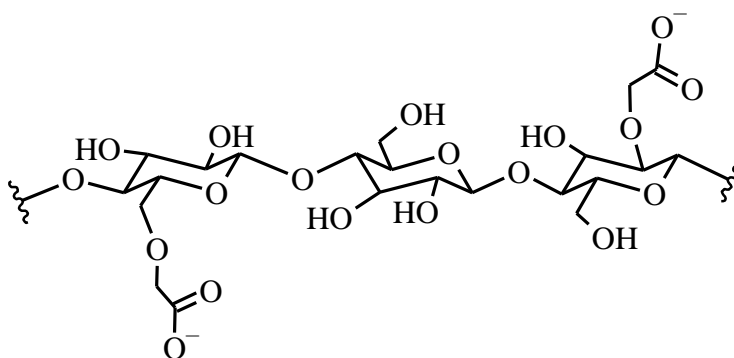


Figura 3.3 - Estrutura química da carboximetilcelulose. (Fonte: Desenho realizado com software ChemSketch<sup>®</sup>, sendo adaptado das referências (70-80)).

O biopolímero CMC, é um derivado hidrossolúvel de celulose, geralmente produzido na forma sódica (Na-CMC), apresentando em meio aquoso as características típicas de polieletrólitos, com propriedades físico-químicas dependentes do grau de substituição (GS), da uniformidade da substituição (grupos hidroxila pelos grupos carboximetil) ao longo da cadeia polimérica, além da concentração, da massa molar e da estrutura molecular do polímero <sup>(70-74)</sup>. O GS é definido como o número médio de grupos hidroxila substituídos por grupos  $-CH_2-COO^-$  em cada unidade monomérica. Essa substituição provoca o afastamento das cadeias poliméricas permitindo maior penetração de água e assim aumentando a solubilidade do polímero quando em solução aquosa <sup>(74)</sup>. Em geral, a solubilidade é alcançada para GS maior que 0,45 <sup>(70-74)</sup>.

Quanto maior a substituição, maior será densidade de carga e, conseqüentemente, com interações repulsivas de natureza eletrostática mais intensas, devido à presença de carboxilatos ao longo das cadeias, contribuindo para uma conformação mais estendida e, assim, favorecendo a expansão das cadeias poliméricas. Por outro lado, para cadeias poliméricas menos substituídas, as interações eletrostáticas repulsivas são minimizadas, favorecendo uma conformação enovelada das cadeias, com interações fracas e de curto alcance entre os segmentos poliméricos <sup>(74)</sup>.

O efeito do pH nas cadeias poliméricas é relacionado principalmente a protonação/desprotonação dos grupos substituídos. Para pH abaixo do pKa <sup>(75)</sup>, os grupos carboxílicos são protonados ( $R/COO^- + H^+ \rightarrow R/COOH$ ), diminuindo a carga das cadeias poliméricas e conseqüentemente a repulsão eletrostática. Por outro lado, para pH acima do pKa, os grupos carboxílicos são desprotonados ( $R/COOH \rightarrow R/COO^- + H^+$ ), aumentando a carga das cadeias poliméricas e conseqüentemente a repulsão eletrostática. Esses fatores podem influenciar decididamente na síntese de nanomateriais, na medida em que a densidade e distribuição de carga tem influência na interação com íons na solução, alterando a dinâmica de nucleação e crescimento de nanocristais, metálicos ou semicondutores <sup>(31, 71)</sup>.

Para a síntese de nanopartículas, alguns trabalhos têm sido publicados utilizando CMC <sup>(76-78)</sup> para síntese e estabilização. Porém, existem poucos trabalhos publicados a respeito da produção de AuNPs, utilizando carboximetilcelulose como agente redutor. Íons de ouro não reagem com a CMC à temperatura ambiente <sup>(79-80)</sup>, assim a síntese é geralmente realizada utilizando métodos de aquecimento ou micro-ondas, para redução de  $Au^{3+}$  para  $Au^0$  <sup>(81-84)</sup> e posterior crescimento e estabilização em dispersão coloidal.

Junjun Tan *et al* <sup>(85)</sup> reportou a síntese de AuNPs por redução direta de ácido cloroáurico ( $HAuCl_4$ ) por CMC. Neste processo de síntese, a CMC serviu tanto como um agente redutor para  $Au^{3+}$ , como agente de estabilização das AuNPs crescidas. Os autores argumentam que os grupos hidroxila na estrutura química da CMC são responsáveis pela redução de  $Au^{3+}$  para  $Au^0$ , e os íons carboxílicos ( $-COO^-$ ) nas cadeias de CMC provocam fortes interações eletrostáticas com as nanopartículas formadas fazendo da CMC um bom estabilizador. A vantagem deste método é principalmente porque ele é realizado em apenas uma etapa em meio aquoso, e sem utilizar reagentes

tóxicos ou agressivos ao meio ambiente. Outros autores têm reportado a síntese de MNPs através da redução com CMC. Xiaoyi Wei *et al* <sup>(86)</sup> aplicou este processo de síntese para o desenvolvimento de um sensor colorimétrico para determinação de cisteína. Neste trabalho, a afinidade da ligação química entre o enxofre (presente nas cisteínas) e o ouro (Au-S) provoca a agregação das nanopartículas, o que é facilmente detectado a olho nu, ou por medidas de espectroscopia UV-Vis.

Mohamed Basuny *et al* <sup>(87)</sup> reportou a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs), através de irradiação por luz UV, utilizando CMC como agente redutor. Neste trabalho os autores demonstram por diversas análises que o mecanismo de redução de prata é principalmente dependente da presença dos grupamentos -COOH e -OH na superfície da CMC. Jing Chen *et al* <sup>(88)</sup> sintetizou AgNPs por um método de síntese assistida por micro-ondas utilizando CMC como agente redutor e de estabilização. Neste trabalho os autores concluíram que o tamanho das nanopartículas é dependente da concentração de CMC e do nitrato de prata. Capanema *et al* <sup>(89-90)</sup> tem reportado a síntese e extensiva caracterização de AgNPs utilizando CMC como agente redutor e de estabilização, para produção de filmes poliméricos.

Como um polímero aniônico de cadeia sensível ao pH, não tóxico e solúvel em água, a CMC é um excelente agente para estabilização de QDts de ZnS, devido as interações dos cátions metálicos ( $Zn^{2+}$ ) com cargas negativas de CMC ( $R-COO^-$ ), formando quelatos  $COO^-/Zn^{2+}$  de acordo com a Eq. 3.2, e devido à estabilização coloidal por impedimento estérico e/ou repulsão eletrostática entre cadeias poliméricas solvatadas carregadas negativamente no meio aquoso. A síntese de QDts semicondutores utilizando CMC tem recentemente sido reportada na literatura. Mansur *et al* tem reportado a síntese de  $AgInS_2/ZnS$  <sup>(91)</sup>, ligas ternárias de AIS/ZAIS <sup>(92)</sup> e  $ZnCdS$  <sup>(93-94)</sup> para diversas aplicações. A estabilidade coloidal pode ser atribuída ao crescimento, termodinâmica e cineticamente favorável, de nanocristais de ZnS em fase sólida com base no baixo produto de solubilidade ( $K_{sp} = 1,0 \times 10^{-23}$ ) <sup>(95)</sup>.



Os trabalhos publicados em síntese de nanopartículas utilizando CMC como agente redutor mostram que este biopolímero é eficiente para produção de MNPs e

QDts, e, além disto, tem a vantagem de atuar também como estabilizante, em um processo realizado em apenas uma etapa e sem utilizar reagentes químicos ou perigosos.

### 3.1.5 – Síntese de Híbridos Metal/Semicondutor – O estado da arte.

Nanoestruturas híbridas, são materiais compostos de dois ou vários componentes, em que ao menos um tem uma dimensão em nano escala <sup>(96-97)</sup>. Nanoestruturas híbridas podem exibir novas propriedades e funções devido à combinação das características de seus componentes individuais <sup>(11)</sup>.

A síntese controlada de nanoestruturas de metais combinadas com nanocristais semicondutores tem muito interesse, uma vez que as suas propriedades físicas e químicas são dependentes do seu tamanho, forma, composição e estrutura, e a combinação de suas características leva a novas e interessantes propriedades. Com suas excelentes propriedades plasmônicas, grande área de superfície específica, e sua facilidade de biofuncionalização, AuNPs são nanomateriais ideais para a combinação com QDts, para a produção de nanoestruturas híbridas funcionais através de diversos métodos <sup>(10, 12)</sup>.

Sistemas híbridos entre nanopartículas plasmônicas e QDts semicondutores são interessantes, principalmente porque combina as propriedades plasmônicas das nanopartículas metálicas com as propriedades luminescentes dos semicondutores. Alterações significativas podem ocorrer quando da formação do híbrido, por que a ressonância de Plasmon é altamente dependente do meio dielétrico em torno das nanopartículas. Uma motivação para o estudo de híbridos metal/semicondutor é a ocorrência de novas propriedades plasmônicas que são possíveis graças à combinação de tipos diferentes de estruturas e morfologias. Christian Strelow *et al* <sup>(98)</sup> estudou nano sistemas híbridos compostos por nanopartículas plasmônicas e QDts que apresentam propriedades diferentes devido à interação éxciton-plasmon. O sistema estudado por estes autores é baseado em nanopartículas coloidais que formam combinações híbridas auto-organizadas, permitindo ajustar a distância entre as nanopartículas e combinar nanopartículas de tamanhos diferentes, o que permitiu uma investigação sistemática do acoplamento éxciton-plasmon. Eles experimentalmente observaram a forte influência da diferença de energia entre o éxciton e os plasmons, e uma forte influência dos tamanhos

das nanopartículas e sua distância ideal de acoplamento, o que levou ao desenvolvimento de uma teoria quântica para a dinâmica de luminescência que descreve a excitação, e a emissão coerente e incoerente. Estudos como este são muito recentes e abrem espaço para novos desenvolvimentos e aplicações.

Diversos métodos têm sido publicados para a síntese de híbridos metal/semicondutor. Um método muito explorado é a deposição ou crescimento de nanocristais de metais sobre nanoestruturas semicondutoras pré-crescidas. Este método é muito interessante para semicondutores usualmente aplicados em catalise, tais como o  $\text{TiO}_2$ . Diversos trabalhos têm sido publicados com este método <sup>(99-100)</sup>. Geralmente as nanoestruturas semicondutoras pré-crescidas são imersas em uma solução de sal de metal, seguido pela adição de um agente redutor adequado. Os nanocristais metálicos gerados através da redução serão preferencialmente ligados nas nanoestruturas semicondutoras.

O tipo mais comum, porém, é o crescimento ou ligação de nanoestruturas semicondutoras em nanopartículas metálicas funcionalizadas através de ligantes apropriados <sup>(101-102)</sup>. Zhenhua Sun *et al* <sup>(103)</sup> desenvolveram um método geral para a preparação de nanoestruturas híbridas com ouro como núcleo e semicondutores como casca, através de tratamentos hidrotérmicos. As AuNPs foram preparadas por métodos de crescimento mediado por sementes <sup>(50)</sup>. Neste processo de síntese, o tratamento térmico atua fornecendo enxofre para os íons de  $\text{Ag}^+$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  formando sulfetos. O  $\text{Ag}_2\text{S}$  e o  $\text{CuS}$  resultantes crescem preferencialmente sobre a superfície dos nanocristais de ouro devido a sua afinidade química. Eles funcionam como uma camada adesiva para a deposição de outros sulfuretos metálicos que são hidro termicamente gerados. A função de  $\text{Ag}_2\text{S}$  e  $\text{CuS}$  como uma camada adesiva é atribuída à permuta catiônica parcial entre os diferentes sulfuretos de metálicos. Estes sulfuretos metálicos são então depositados sobre as AuNPs, formando a casca com  $\text{ZnS}$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{Ag}_2\text{S}$ , e  $\text{Ni}_{1-x}\text{S}$ .

Outro método reportado na literatura para a preparação de nanoestruturas híbridas entre AuNPs como núcleo e QDs de  $\text{CdS}$  ou  $\text{ZnS}$  como casca, tem sido demonstrada através de direta decomposição dos complexos de cisteína com íons  $\text{Cd}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ . Neste método, a cisteína atua como fonte de enxofre e agente estabilizador, porque possui os grupos funcionais,  $\text{SH}$ ,  $\text{COOH}$  e  $\text{NH}_2$ . O grupo tiol permite que a formação de



complexos entre as cisteína e os íons  $\text{Cd}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ . O grupo amino permite que os complexos sejam adsorvidos sobre as AuNPs. O grupo carboxila promove a dispersão das AuNPs gerando o crescimento dos QDs de ZnS como uma casca em volta de sua superfície. Wei-Ta Chen *et al* <sup>(104)</sup> aplicou este método para a síntese de núcleo-casca entre AuNPs e QDs de CdS, com o controle da espessura da casca. Os mesmos autores publicaram este método, porém com a utilização de ZnS para aplicação em células de combustível <sup>(105)</sup>. Ting-Ting Yang *et al* <sup>(106)</sup> utilizou o mesmo método para sintetizar e estudar a dinâmica dos transportadores de carga nas interfaces núcleo-casca entre as AuNPs e os nanocristais semicondutores com várias espessuras de casca. Neste trabalho, os autores demonstram que o núcleo de ouro é carregado negativamente (elétrons) e a casca de CdS carregado positivamente (buracos). Os autores ainda descrevem a variação das propriedades fotocatalíticas em função da espessura da casca. Este método é interessante porque é simples, e tem a possibilidade de sintetizar estruturas com diferentes espessuras de casca, e que por sua vez pode permitir a modificação de suas propriedades ópticas.

Deste os métodos já reportados de síntese de nanoestruturas híbridas núcleo-casca entre metal e semicondutor, o reportado por Jiatao Zhang *et al* <sup>(107)</sup> é um dos mais interessantes. Neste artigo, os autores reportam uma rota de síntese de heteroestruturas formadas por um núcleo de metal e uma casca de semicondutor nanocristalino através de reações de coordenação ácido-base. A característica mais importante deste método de síntese de nanoestruturas híbridas, é que as cascas são calcogenetos nanocristalinos, podendo ser de diversos tipos diferentes de nanocristais semicondutores.

### 3.1.6 Nanohíbridos Au@ZnS

A combinação das propriedades ópticas das AuNPs, com propriedades de outros tipos de materiais tem sido um intenso campo de pesquisa <sup>(108, 109)</sup>. Os materiais semicondutores são os principais candidatos devido à sua emissão de luz por fotoluminescência. Apesar de vários tipos diferentes de semicondutores atualmente em pesquisa, o sulfeto de zinco (ZnS) tem sido um forte candidato à formação de nanoheterojunções com nanoestruturas de ouro <sup>(110)</sup>.

O ZnS <sup>(111-112)</sup> é um semicondutor II-VI com gap direto, apresentando uma banda relativamente larga (3,61 eV) e energia de ligação de éxciton de 39 meV à temperatura ambiente. Nas dimensões nanométricas e dentro do “regime de confinamento quântico”, o ZnS exibe emissão de fotoluminescência na região visível e tem sido amplamente utilizado em aplicações de bioimagem <sup>(113-115)</sup>. O ZnS é um nanomaterial ecológico, com síntese aquosa simples à temperatura ambiente. Em relação à sua estrutura, duas formas cristalinas principais podem ser observadas, a saber, a blenda de zinco mais estável (abaixo de 1290 K) (ZB) com estrutura cúbica no centro da face e a wurtzita alótropo a alta temperatura (WZ) com simetria hexagonal. A combinação de nanoestruturas baseadas em ZnS com nanomateriais metálicos, como as AuNPs, é importante porque combina propriedades de semicondutores com o amplo campo de pesquisa de plasmons de superfícies.

O ZnS possui um alto potencial de banda de condução, o que garante a transferência de elétrons quando em contato direto com o metal <sup>(111)</sup>, causando alta separação de carga. Nas nanointerfaces metal/semicondutor, os elétrons excitados no semicondutor transferem-se preferencialmente para o metal, deixando, buracos fotogerados no domínio do semicondutor e, assim, causando separação de carga. No entanto, apesar das interessantes propriedades e promessas de aplicação em físico-química e nanofotônica, poucas pesquisas foram relatadas sobre a síntese de híbridos entre AuNPs e ZnS <sup>(116)</sup>.

Prashant Kumar *et al* <sup>(117)</sup> desenvolveram uma síntese de fase orgânica de nanoestruturas de calcogeneto de Au-zinco com espessura de casca controlável, juntamente com controle de composição do material da casca. Jiatao Zhang *et al* <sup>(118)</sup>

relatou o crescimento não-epitaxial das nanoestruturas núcleo-casca com base no mecanismo de reação ácido-base de Lewis. Neste método, uma casca do semicondutor é crescida na superfície das nanopartículas através de uma troca catiônica. Andrew Tobias *et al* <sup>(119)</sup> relataram um procedimento para o revestimento de AuNPs com casca de semicondutores de CdS e ZnS por meio de um método de troca de cátions semelhante usando sulfeto de prata. Liu Huang *et al* <sup>(120)</sup> relataram um método de crescimento não-epitaxial, para composições variadas da síntese monodispersa de núcleo/casca (como Ag<sub>2</sub>S, CdS e ZnS), usando ligantes de co-capeamento ácido/alcalino. Outros autores têm relatado diferentes tipos de nanoestruturas entre o ZnS e nanomateriais de ouro <sup>(121-123)</sup>.

Apesar desses estudos, não foi relatado na literatura a síntese de nanoestruturas núcleo/casca Au@ZnS por rota aquosa e onde o crescimento da casca é mediado por biopolímero. Neste trabalho, relatamos um processo de crescimento novo e inovador de uma nanoestrutura núcleo/casca entre AuNPs (núcleo) e sulfeto de zinco ZnS (casca) através da mediação do biopolímero CMC (Au@ZnS-CMC) por uma rota química coloidal aquosa à temperatura ambiente. Além disso, relatamos a síntese e a completa caracterização físico-química da nova nanoestrutura produzida e o estudo das propriedades ópticas.

## 3.2 – Plasmônica

Plasmons são oscilações coletivas de elétrons de condução em nanoestruturas de metais nobres <sup>(124)</sup>. Esse movimento de carga origina diversos fenômenos na superfície destas nanoestruturas, sendo de especial atenção os campos eletromagnéticos caracterizados por altas intensidades de campo elétrico. Existem dois comportamentos possíveis, dependentes da geometria em estudo: se a excitação ocorrer na interface condutor/dielétrico em uma superfície plana será originado o fenômeno de polarização de plasmon de superfície (*surface plasmon polariton*) e, se a excitação for a uma superfície fechada de nanopartículas, o fenômeno é designado por ressonância de plasmon de superfície localizada (*localized surface plasmon resonance*). Uma ilustração destes dois processos físicos é mostrada na figura 3.4 . A importância do

estudo desses efeitos é principalmente suas novas aplicações úteis em várias áreas de pesquisa <sup>(124, 126)</sup>.

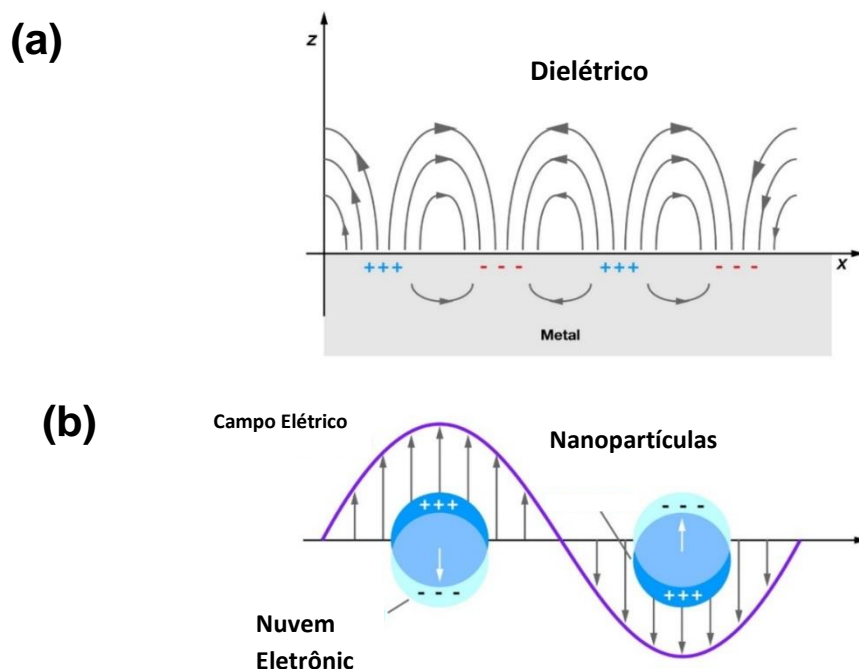


Figura 3.4 - Ressonância de plasmon em nanopartículas metálicas esféricas a) Polarização de plasmon de superfície (b) Ressonância de plasmon de superfície localizada. (Modificado e reproduzido com permissão da referência (125))

### 3.2.1 - Ressonância de Plasmon de superfície localizada

A ressonância de plasmon de superfície localizada são oscilações coletivas dos elétrons de condução na superfície de nanocristais metálicos, induzidas por radiação eletromagnética, e que não se propagam devido ao confinamento dos elétrons nas dimensões das nanopartículas. No caso de pequenas partículas de metais nobres, com tamanhos da ordem da profundidade de penetração de um campo eletromagnético, o campo elétrico externo pode deslocar a nuvem de elétrons de condução, fazendo-a oscilar em determinadas frequências. Essa oscilação tem uma determinada frequência de ressonância que depende profundamente das características do material utilizado, especialmente, a constante dielétrica, a morfologia e o ambiente químico em torno das nanopartículas <sup>(127)</sup>. Sob uma excitação ressonante, nanocristais interagem fortemente com a luz criando um intenso campo elétrico em torno de sua superfície que decai

exponencialmente. A ressonância plasmônica provoca um aumento na amplitude do campo elétrico, variando senoidalmente em função do tempo, na mesma frequência da luz de excitação. Este campo elétrico pode se acoplar com campos eletromagnéticos emitidos por moléculas, átomos, ou QDs colocados na sua proximidade, provocando a uma forte alteração das características radiativas e não radiativas do emissor adjacente <sup>(128)</sup>. Como o campo elétrico perto da superfície de nanocristais é amplificado em várias ordens de magnitude, mudanças no ambiente químico local, a fluorescência e sinais de Raman de moléculas próximas, podem ser significativamente modificados, fato que vem sendo aplicado em sensoriamento químico, biológico e em diagnóstico biomédico <sup>(31, 129)</sup>.

### **3.2.2 - Propriedades plasmônicas de Nanopartículas metálicas.**

Nanoestruturas plasmônicas quando excitadas na condição de ressonância originam diversos fenômenos <sup>(130-131)</sup>, destacando-se, a criação em torno de sua superfície de um intenso campo elétrico <sup>(132-134)</sup>, o forte espalhamento de luz <sup>(135)</sup>, a transferência de elétrons para materiais próximos <sup>(136)</sup> e o efeito de transferência de energia por ressonância de Förster <sup>(137)</sup>. Na figura 3.5 temos todos estes efeitos esquematizados <sup>(130)</sup>.

A luz incidente em nanoestruturas metálicas sofre um forte espalhamento, que depende fundamentalmente da geometria e do material das nanopartículas. A secção de choque de espalhamento pode ser ordens de grandeza maiores dependendo da geometria, do material da partícula e da polarização da luz incidente, por exemplo, a secção de choque de espalhamento de luz polarizada varia com a quarta potência do diâmetro e a secção de choque de espalhamento de luz despolarizada varia com a sexta potência do diâmetro <sup>(138)</sup>. Os fótons de luz espalhados podem ser reabsorvidos pelos QDs, aumentando assim a taxa de absorção de luz e conseqüentemente, a excitação de QDs, mesmo a distâncias de várias centenas de nanômetros. Fótons espalhados por cada nanoestrutura também podem sofrer espalhamentos múltiplos por nanoestruturas próximas, o que aumenta o total de luz “presa” dentro do sistema. Além disso, por meio do ajuste da ressonância de plasmons para comprimentos de onda complementares aos

dos QDs, nanoestruturas podem ser projetadas para capturar fótons não absorvidos pelos QDs.

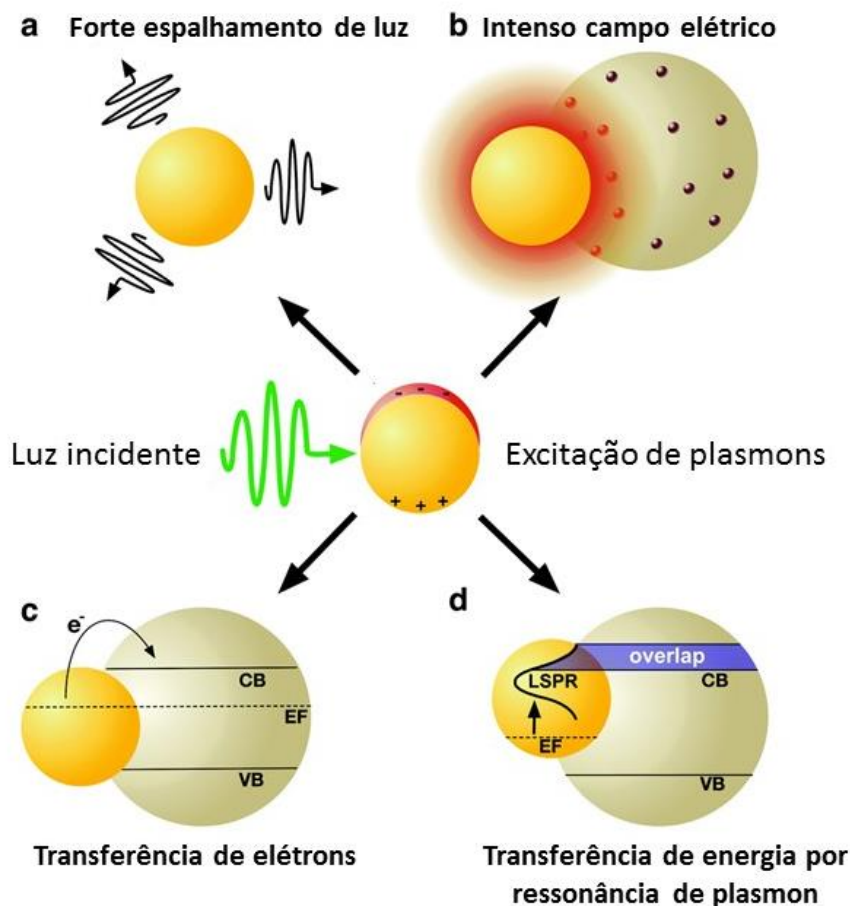


Figura 3.5 - (a) forte espalhamento de luz, (b) criação em torno de sua superfície de um intenso campo elétrico, (c) transferência de elétrons para materiais próximos e (d) efeito de transferência de energia por ressonância de Förster. (Fonte: Modificado e reproduzido da referência (130) com permissão da The Royal Society of Chemistry).

A interação de nanoestruturas plasmônicas com a luz incidente concentra a luz no espaço em torno delas, criando um intenso campo elétrico. Esse campo elétrico criado por nanoestruturas metálicas pode ser ordens de grandeza mais intensos que o campo de excitação, e é o principal mecanismo de amplificação de sinais ópticos, tanto Raman, como fluorescência. Os campos eletromagnéticos criados pela ressonância de plasmon tem um decaimento proporcional a  $r^{-6}$ , sendo campos de curto alcance, e mais intensos próximos à superfície das nanopartículas (*near-field*). A intensidade deste campo elétrico é muito dependente da morfologia, sendo que nanoestruturas anisotrópicas

geram campos mais intensos em torno de bordas e regiões altamente curvadas, e ainda tem a vantagem de ter bandas de absorção de plasmons ajustáveis em toda a região visível e do infravermelho próximo (NIR) <sup>(139)</sup>. Thomas *et al* <sup>(140)</sup>, demonstrou que dimers de AuNPs, formam regiões de altíssimo campo elétrico (hot-Spots). Nesta condição as nanopartículas se comportam como “nanoantenas” devido às amplificações de campo elétrico em torno de sua superfície. QDs na proximidade das nanoestruturas plasmônicas sentem esse intenso campo elétrico, e o acoplamento plasmon-éxcitons resultante, aumenta a geração de pares elétron-buraco, o que por sua vez modifica as propriedades ópticas do semicondutor em nanohíbridos metal/semicondutor <sup>(141-146)</sup>.

Na figura 3.6, temos uma ilustração esquemática da dependência do tamanho das nanopartículas nos mecanismos de interação com materiais em sua vizinhança <sup>(130)</sup>. Em pequenas nanopartículas (Fig. 3.6a), o efeito mais predominante é o de transferência de elétrons do metal para o semicondutor. Para nanopartículas maiores (Fig. 3.6b), a influência do campo elétrico criado pela ressonância de plasmon é fator mais importante. Já para nanopartículas muito maiores (Fig. 3.6c), o espalhamento é o efeito predominante. Neste trabalho, os três fenômenos são observados, devido as dimensões nanométricas das nanopartículas sintetizadas.

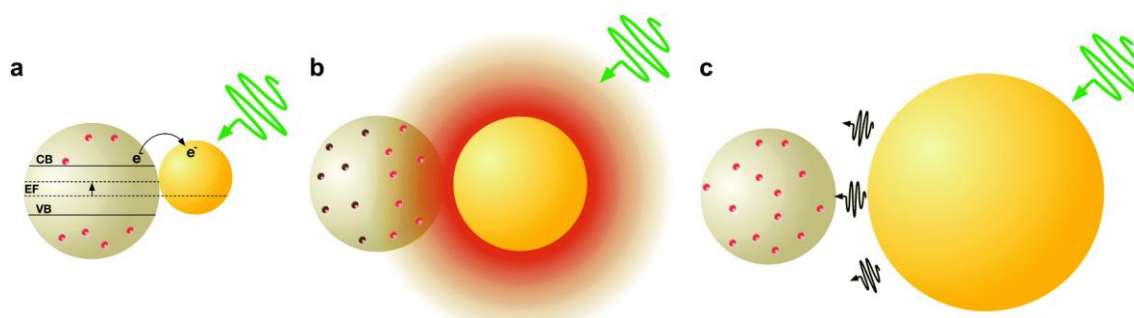


Figura 3.6 - Ilustração esquemática da influência do tamanho de uma nanoestrutura metálica sobre o mecanismo de amplificação de sinais ópticos. (a) em pequenas nanopartículas o efeito mais predominante é o de transferência de elétrons do metal para o semicondutor. (b) para nanopartículas maiores a influência do campo elétrico criado pela ressonância de plasmon é mais importante. (c) para nanopartículas muito maiores o espalhamento é o efeito mais importante. (Fonte: Modificado e reproduzido da referência (130) com permissão da The Royal Society of Chemistry).

### 3.3 – Fluorescência

Fluorescência é a propriedade de algumas moléculas e átomos de absorver luz em um determinado comprimento de onda, e emitir como resposta, luz de maior comprimento de onda <sup>(147-148)</sup>. A absorção de um fóton em um semiconductor leva um elétron para a banda de condução e um buraco para a banda de valência, cuja interação colombiana pode provocar a formação de par elétron-buraco, chamado de éxciton. A recombinação deste par provoca a emissão de fótons pelo material.

Os vários níveis de energia envolvidos na absorção e emissão de luz em QDs são classicamente apresentados por um diagrama de transições de energia (Figura 3.7). Ao absorver radiação eletromagnética, um elétron na banda de valência é excitado para a banda de condução (Figura 3.7(A)). Ao retorna para o estado fundamental, a energia pode ser dissipada em processos radiativos e não radiativos. Importante observar que os processos de absorção e emissão são dependentes do diâmetro dos nanocristais, devido ao confinamento quântico dos elétrons. Os processos não radiativos, são causados principalmente por colisões entre as moléculas e o solvente, processos de relaxação de um nível vibracional de menor energia para outro nível eletrônico de menor energia sem emitir radiação, interações e transferência de energia entre a molécula excitada e moléculas do solvente, e pela inversão de spin no estado excitado. O estado de defeitos na rede cristalina no material tem efeitos importantes neste processo, influenciando o processo de emissão ou de “quenching”. A inclusão de átomos, com características diferentes da rede, em geral pode ser origem de processos de decaimento não radiativos <sup>(1-5)</sup>.

Os processos radiativos são chamados de fotoluminescência, e ocorrem em dois tipos diferentes. A fluorescência é o processo de decaimento do estado singlete para o estado fundamental, sem alteração da orientação de spin e tem um tempo de vida médio da ordem de  $10^{-9}$  segundos. O processo de fosforescência, por outro lado, ocorre com mudança na orientação de spin, com o estado tripleto retornando para o estado fundamental singlete, e tem um tempo de vida médio da ordem de  $10^{-3}$  segundos.



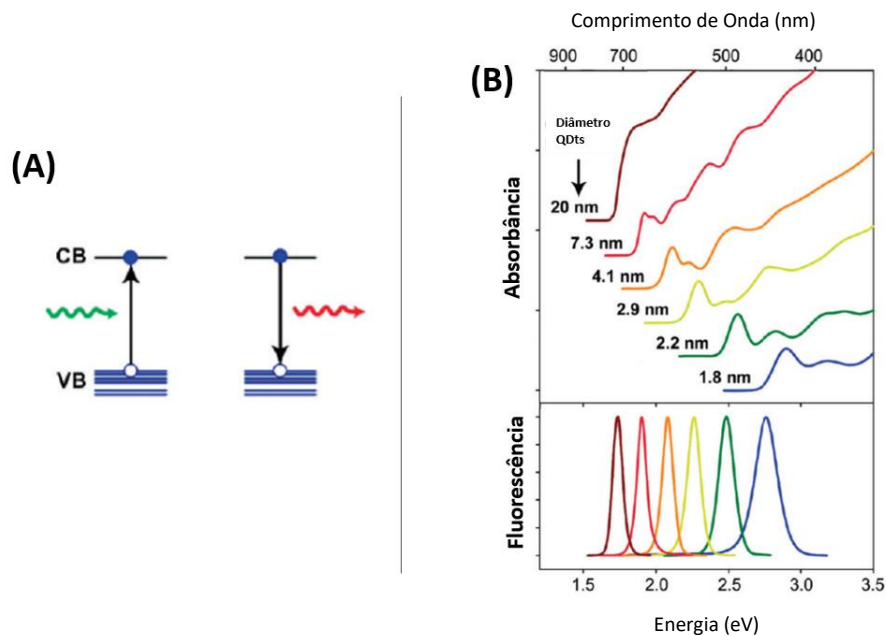


Figura 3.7 - (A) Estados de energia eletrônica em QDs com transição de elétrons da banda de valência (VB) para banda de condução (CB). (B) Espectros de absorção (superior) e de fluorescência (inferior) para QDs. (Fonte: Modificado e reproduzido da referência (4) com permissão da American Chemical Society, Copyright © 2010, American Chemical Society).

A fluorescência é caracterizada por três eventos importantes, os quais ocorrem em diferentes escalas de tempo. O processo de excitação ocorre muito rapidamente e em quantidades discretas, e corresponde a excitação do estado fundamental para o estado excitado, em um tempo muito curto, da ordem de femtosegundos ( $10^{-15}$  segundos), enquanto que o relaxamento vibracional dos elétrons excitados para um estado de mais baixa de energia é um processo mais lento e pode ser medido em picosegundos ( $10^{-12}$  segundos). O processo final, a emissão de fótons e o retorno para o estado fundamental, ocorrem no período relativamente longo de nanosegundos ( $10^{-9}$  segundos). Defeitos na estrutura cristalina podem alterar o comportamento óptico de QDs. No ZnS, as emissões são predominantemente baseadas em sítios ativados por defeitos, sendo a transição óptica da banda de valência para banda de condução geralmente ausente. Isso significa que os defeitos na estrutura (vacâncias de enxofre ( $V_S$ ) e metal ( $V_{Zn}$ ), e defeito intersticial,  $I_S$  e  $I_{Zn}$ ) atuam como armadilhas eficientes para elétrons, buracos, e portadores da carga do éxciton, conduzindo à recombinação radiativa em energias mais baixas (comprimentos de onda mais elevados) do que a emissão excitônica<sup>(112-115)</sup>.

### 3.3.1 - Técnica de espectroscopia de Fotoluminescência (PL)

A técnica de espectroscopia de fotoluminescência (Photoluminescence, PL), é uma das técnicas mais empregadas atualmente para estudo de diversos materiais e nanomateriais, e consiste basicamente em excitar o material com radiação eletromagnética em uma ampla faixa de comprimentos de onda, e estudar a sua resposta óptica através da luz emitida. A espectroscopia de fotoluminescência é baseada na detecção destes fótons para formação de um espectro. Diversas características dos materiais podem ser estudadas através da luz emitida por eles, como sua energia de band gap, por exemplo. Isso torna a técnica fundamental para estudo de QDs.

### 3.4 - Heterojunção Metal-Semicondutor

Nanomateriais semicondutores são caracterizados pelo intervalo entre a banda de condução e banda de valência (band gap), região com ausência de estados disponíveis, não sendo assim possível encontrar elétrons. A excitação de um elétron da banda de valência para banda de condução deixa o sistema em um estado excitado (éxciton) cuja recombinação provoca a emissão de um fóton. Por outro lado, em materiais metálicos, a banda de condução não é totalmente preenchida, existindo estados livres facilmente acessíveis, onde os elétrons podem se deslocar facilmente sob ação de um campo elétrico <sup>(149)</sup>. A figura 3.8 ilustra esse sistema físico.

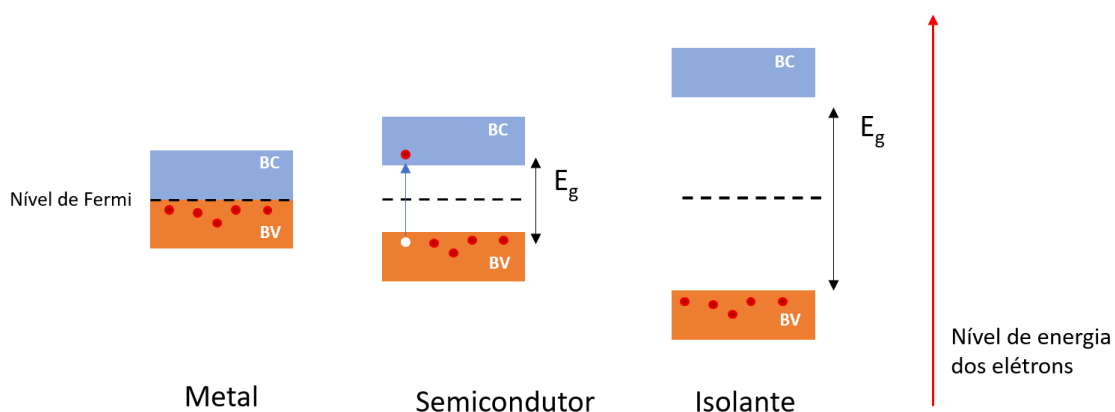


Figura 3.8 - Comparação entre os níveis de energia de materiais metálicos (a), semicondutores (b) e isolantes (c). (Fonte: próprio autor).

Nos sólidos, os estados ocupados com maior energia constituem o chamado nível de Fermi, cuja energia é chamada de energia de Fermi. Para os metais, o nível de Fermi se encontra dentro de uma banda de energia e para os semicondutores intrínsecos, como a banda de valência está completamente ocupada, o nível de Fermi se encontra em algum lugar entre as bandas de condução e de valência, próximo ao meio do gap de energia.

Para junções em sistemas híbridos, com cada material possuindo um nível de Fermi em diferentes valores de energia, ocorre uma transição que se dá pelo alinhamento entre os níveis de Fermi dos dois lados da junção. Diferentes combinações são possíveis entre materiais para formação de junções, tais como, junção p-n (tipo homo junção), heterojunção, junção metal-semicondutor e junção MOS (metal-óxido-semicondutor). Homo junção é uma interface de transição entre duas regiões de um mesmo semicondutor, por exemplo, uma região do tipo p e outra do tipo n. Por outro lado, uma heterojunção é uma junção formada por dois materiais diferentes, tais como, metal-semicondutor. Uma importante diferença entre os sistemas é que em heterojunções podem ser formadas descontinuidades na banda de condução, ao contrário da continuidade observada para as homo junções.

Junções formadas entre metais e semicondutores são interessantes devido a fenômenos que ocorrem na interface de contato entre os materiais <sup>(150-152)</sup> (Fig. 3.9). Em uma junção deste tipo, uma barreira se forma entre as bandas de energia, chamada de barreira Schottky. Uma barreira Schottky, é uma barreira potencial de energia para elétrons formados em uma junção metal-semicondutor. Uma das principais características é a altura da barreira, indicada por  $\Phi_x$  (veja a figura 3.9b). O valor de  $\Phi_x$  depende das propriedades do metal e do semicondutor. Observando o diagrama de bandas mostrado na figura 3.9a, entre um semicondutor tipo-n e um metal, fica evidente que o metal difere do semicondutor por não ter banda proibida, com os elétrons, ocupando todos os estados de energia possíveis até ao nível de Fermi. Na interface metal-semicondutor, um elétron só pode ser transportado do metal para o semicondutor se este tiver energia superior à função trabalho na junção <sup>(152)</sup>. Em uma situação de equilíbrio termodinâmico, podemos esboçar o diagrama de bandas e uma junção metal-semicondutor como o mostrado na figura 3.9b.

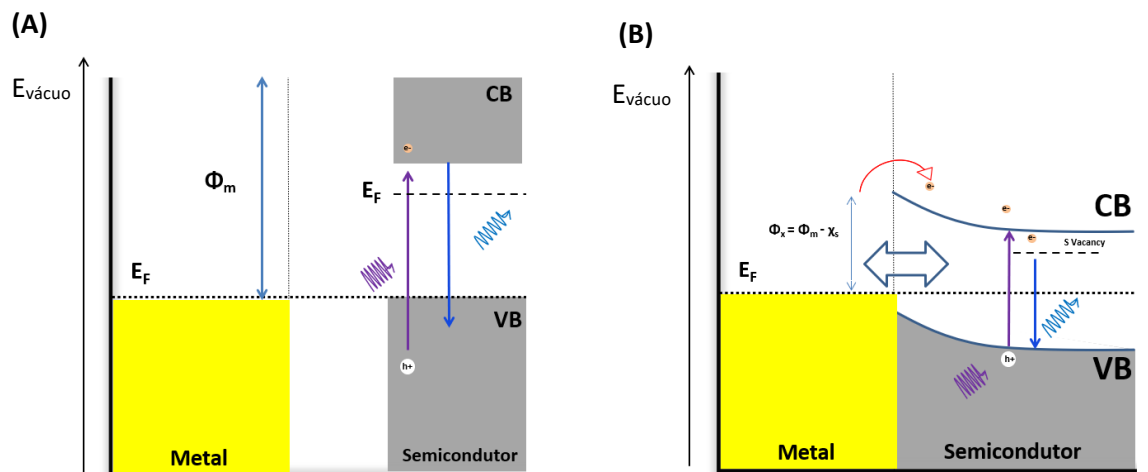


Figura 3.9 - (a) diagrama de bandas de um metal e de um semiconductor, (b) e de uma junção metal-semiconductor. (Fonte: Próprio Autor, adaptado da referência (153)).

### 3.4.1 Junções Au@ZnS

Neste trabalho, propomos a formação de nanoheterojunções entre AuNPs e ZnS nanoestruturado. Sistemas híbridos entre nanopartículas plasmônicas e QDs combinam as propriedades plasmônicas das AuNPs com as propriedades luminescentes dos semicondutores. A síntese controlada de nanoestruturas de metais combinadas com QDs tem muito interesse, uma vez que as suas propriedades físicas e químicas são dependentes do seu tamanho, forma, composição e estrutura, e a combinação de suas características leva a novas e interessantes propriedades. Com suas propriedades plasmônicas, grande área de superfície específica, e sua facilidade de biofuncionalização, nanopartículas metálicas são materiais ideais para a combinação com QDs, para a produção de nanoestruturas híbridas funcionais através de diversos métodos.

Neste tipo de nanoestrutura, a interação entre os éxcitons, no material semiconductor, e os plasmons, no metálico, é possível se os materiais estiverem em contato, formando uma heterojunção. Neste caso, duas condições de acoplamento são possíveis, fraco e forte. No regime de acoplamento fraco, as funções das ondas e os modos eletromagnéticos de éxcitons e plasmons, respectivamente, são considerados imperturbáveis, e as interações éxciton-plasmon são frequentemente descritas pelo acoplamento do dipolo do éxciton com o campo eletromagnético do LSPR. No regime

de acoplamento fraco, fenômenos como, seções transversais de absorção, taxas radiativas e não radiativas e transferência de energia éxciton-plasmon são possíveis. Por outro lado, no regime de acoplamento forte, ocorre quando as interações ressonantes éxciton-plasmon provocam a modificação das funções da onda do éxciton e dos modos eletromagnéticos do LSPR. Nesse regime, a energia de excitação é compartilhada, com oscilações entre os sistemas plasmônicos e excitônicos (oscilações de Rabi) <sup>(153-154)</sup>.

Outro mecanismo que ocorre quando nanoestruturas plasmônicas estão em contato com nanoestruturas semicondutoras, é o processo de transferência de elétrons na interface metal/semicondutor <sup>(155-158)</sup>. Em nanoestruturas híbridas metal/semicondutor, uma barreira Schottky se forma na interface de junção entre o metal e semicondutor que bloqueia a transferência eletrônica (Figura 3.10). No entanto, sob a excitação ressonante do plasmon de nanocristais metálicos, a transferência de elétrons do metal para o semicondutor pode ocorrer durante o decaimento do plasmon. Após a excitação óptica, cada quantum plasmônico pode decair tanto radiativamente em um fóton ou não radiativamente como um par elétron/buraco. O processo dominante de decaimento é de geração par elétrons/buracos. Os elétrons excitados pelo plasmon são caracterizados por não estarem em equilíbrio térmico com os átomos no metal e por sua alta temperatura, sendo por isso chamados de “elétrons quentes” <sup>(159)</sup>. Além da geração de elétrons através da excitação de plasmon, fótons incidentes com suficientemente energia podem também causar excitações interbanda e intrabandas. Se os elétrons gerados tiverem energias suficientes para superar a barreira Schottky, eles podem ser injetados na banda de condução do semicondutor. Quando nanoestruturas plasmônicas estão em contato com nanoestruturas semicondutoras, é possível ainda a transferência de energia na interface metal/semicondutor. Existem dois processos distintos. No processo de FRET (Förster Resonance Energy Transfer), transferência de energia por ressonância de Förster, a energia é transferida do semicondutor para o plasmon. Já no processo de transferência de energia induzida por ressonância de plasmons (PIRET - Plasmon-Induced Resonance Energy Transfer), a energia é transferida do plasmon para o semicondutor <sup>(158)</sup>.

Diante de variedade de fenômenos ocorrentes em heterojunções metal/semicondutor e, de suas perspectivas para aplicações, o desenvolvimento de

novos métodos de nucleação e crescimento, além do estudo detalhado das propriedades físico-químicas e nano fotônicas, tem significativa relevância para o desenvolvimento científico e tecnológico. Neste trabalho, foram sistematicamente estudadas dispersões coloidais aquosas de AuNPs e QDs de ZnS, sintetizadas através do polímero CMC. Como consequência dos resultados obtidos, foi desenvolvida uma nanoheterojunção Au@ZnS, na morfologia núcleo/casca, através de rota coloidal aquosa a temperatura ambiente, mediada pelo biopolímero CMC e o estudo das propriedades físico-químicas e ópticas.

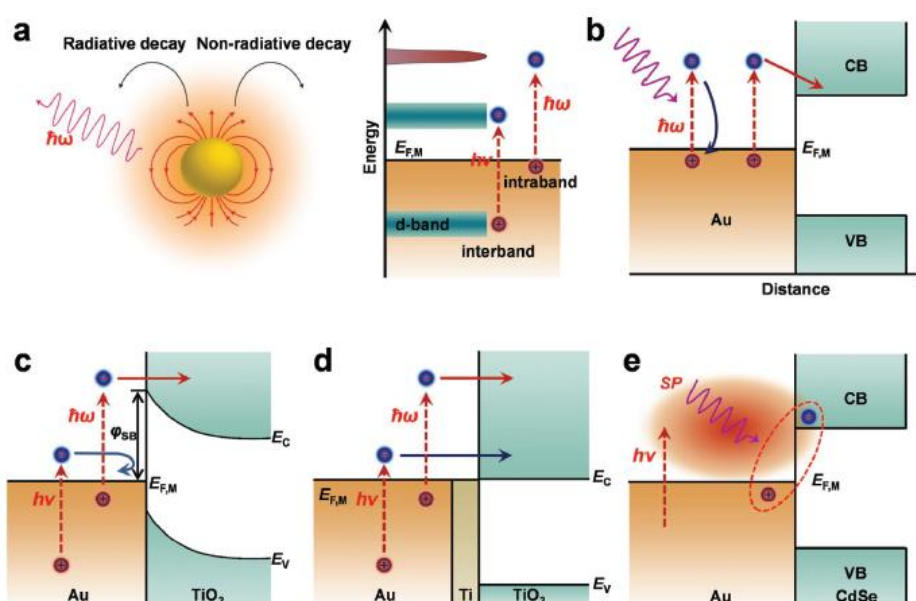


Figura 3.10 - “elétrons quentes” induzidos por Plasmon. a). Plasmons em nanoestruturas metálicas podem decair através de processos radiativos com emissão de fótons ou através de processos não radiativos através da emissão de elétrons (transições intrabanda ou interbanda) b). Os elétrons perto da interface são transportados para o semiconductor e os elétrons longe da interface podem se recombinar com buracos. c,d) Exemplo de um diagrama de bandas para um dispositivo Schottky híbrido Au-TiO<sub>2</sub>. A barreira Schottky impede elétrons de baixa energia de atravessar para o semiconductor. e) Exemplo de um diagrama de bandas para um dispositivo Schottky híbrido Au-CdSe. (Fonte: Modificado e reproduzido com permissão das referências (155-158). Copyright 2016 WILEY (155); (a-b) <sup>(157)</sup> Copyright 2014, Nature Publishing Group; (c-d) <sup>(158)</sup> Copyright 2015, Nature Publishing Group; (e) <sup>(156)</sup> Copyright 2015, American Association for the Advancement of Science.

## Capítulo 4 – Procedimentos Experimentais

### 4.1 Materiais

Para o processo de síntese de AuNPs@CMC foram utilizados os seguintes reagentes e materiais. Água Milli-Q (resistividade de 18 MΩ.cm), ácido tetracloroaurico (III) trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,9\%$ ), sal de sódio da carboximetilcelulose (CMC) (0,2%, GS = 1,2 e 0,77 com Massa molar  $\approx 250,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e viscosidade de 735cps, 2% em  $\text{H}_2\text{O}$  a 25 °C), ácido clorídrico (HCl) – 37%, ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) - 64 – 66%, albumina sérica bovina (BSA,  $\geq 96,0\%$ ), L-arginina (Arg,  $\geq 98,0\%$ ), tampão MES (ácido 2- (N-morfolino) etanossulfônico,  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ ,  $\geq 99,0\%$ ), 1-etil- 3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC,  $\geq 98,0\%$ ) e N-hidroxissuccinimida (NHS,  $\geq 98,0\%$ ), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB,  $\geq 99,0\%$ ) e ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\geq 99,9\%$ ) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (EUA). Anticorpos monoclonais anti-HIV1 gp41 purificados (número de catálogo ab9065, abHIV, 150kDa, 100 $\mu\text{g}$  a 1,27mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e a proteína recombinante purificada HIV gp41 (número de catálogo ab49070, 130kDa, 100 $\mu\text{g}$  a 1,0mg  $\text{mL}^{-1}$ ) foram adquiridos da Abcam (EUA). Cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) ( $\text{ZnCl}_2$ ,  $\geq 98\%$ ), Sulfeto de sódio nonahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 98\%$ ) e nitrato de índio hidratado ( $\text{In}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , In = 28.5%) foram adquiridos na Sigma Aldrich. Os produtos químicos acima mencionados foram utilizados sem purificação adicional.

### 4.2 Métodos experimentais

#### 4.2.1 Determinação do pKa da CMC

Para a determinação do pKa da CMC, foram utilizadas metodologias já relatadas na literatura <sup>(160-161)</sup>. Para o procedimento experimental foram preparadas soluções estoque de CMC em dois graus de substituição (GS), a saber, 0,77 e 1,22, denominadas CMC-77 e CMC-122, respectivamente. Foi utilizada a concentração de (2% p/v), dissolvendo 2g de CMC em 100mL de uma solução 0,05M de  $\text{KNO}_3$ , em temperatura ambiente e sob agitação magnética por duas horas para os dois graus de substituição. Essa concentração foi escolhida em função da concentração utilizada para síntese das dispersões coloidais de AuNPs@CMC e ZnS@CMC. Após a completa solubilização,

foi realizada a titulação, adicionando-se quantidades conhecidas de HCl (0,5M) e medindo o pH após o equilíbrio.

#### 4.2.2 Síntese de AuNPs@CMC

Para o processo de síntese, 200mL de uma solução aquosa na concentração de 0,2% em peso de CMC (GS = 1,2 e 0,77 com massa molar  $\approx 250,000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) foi preparada e mantida sob agitação por 24 horas até a completa dissolução. Foi preparada uma solução estoque aquosa de 0,05M de ácido tetracloroaúrico (III) trihidratado ( $\text{HAuCl}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), dissolvendo-se 84mg do sal em 5ml de água deionizada. A vidraria utilizada foi limpa com água régia ( $\text{HCl}:\text{HNO}_3$  3:1). Na sequência, 600 $\mu\text{L}$  da solução de ácido tetracloroaúrico (III) trihidratado (0,05M) foram adicionados em 200mL da solução de CMC em um balão de fundo chato sob agitação constante, com concentração de ouro de 0,1mM na solução de CMC. A solução foi mantida em aquecimento a cerca de 100°C em um condensador de refluxo. Foram sintetizadas amostras em dois diferentes graus de substituição, GS = 1,2 e GS= 0,77, ambas com massa molar  $\approx 250,000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , denominadas AuNPs@CMC-77 e AuNPs@CMC-122, respectivamente. O processo de síntese foi repetido em três diferentes valores de pH de ( $3,5 \pm 0,5$ ) (ácido), ( $7,1 \pm 0,5$ ) (neutro) e ( $10,5 \pm 0,5$ ) (alcalino).

#### 4.2.3 Síntese de conjugados AuNPs@CMC\_PolyArg

AuNPs também foram sintetizadas usando um conjugado químico projetado entre CMC e o aminoácido arginina, através do polipeptídeo poliarginina, nomeado de CMC\_PolyArg. Esse conjugado foi preparado adicionando grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) nas cadeias poliméricas da CMC. A adição dos grupos amina para a CMC foi necessária para a posterior conjugação covalente com a porção terminal carboxílico do anticorpo HIV-1 (região  $F_C$ ), enquanto o outro terminal (região  $F_{ab}$ ) permaneceu "livre" para o processo de afinidade de reconhecimento de antígenos. A síntese de CMC funcionalizada com poliarginina (CMC\_PolyArg) foi realizada por via aquosa à temperatura ambiente. Inicialmente, a solução de PolyArg foi preparada adicionando EDC (excesso de 5 vezes) a 28mL de 2,0% (p/v) de L-arginina dissolvida em tampão MES (0,1M, pH  $4,7 \pm 0,1$ ) e incubando por 2h sob agitação vigorosa. Enquanto isso, EDC (1:1 relacionado ao conteúdo de ácido carboxílico) foi adicionado a 5mL de CMC



na concentração de 2,0% (p/v) e dissolvida em tampão MES, sendo então incubada por 15 minutos para a ativação de grupos carboxílicos da CMC. Após esse tempo, a solução foi adicionada ao balão de reação e incubada por 2h sob agitação magnética. Em seguida, o conjugado polimérico CMC\_PolyArg sintetizado (conjugação de PolyArg a CMC via ligação amida) foi dialisado por 4 dias com água destilada usando uma membrana de celulose com corte de peso molecular de 12,000Da (Sigma). Este processo foi inovador e substituiu as moléculas comumente usadas para a conjugação de anticorpos com AuNPs. A formação dos conjugados coloidais de AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg foi monitorada *in situ* por medições de espectroscopia UV-Vis usando picos de ressonância plasmon de superfície (LSPR) das AuNPs. Os espectros sequenciais foram coletados até que não foram observadas alterações detectáveis indicando que o sistema alcançou equilíbrio.

#### **4.2.4 Síntese de biconjugados AuNPs@CMC-gp41**

Nas AuNPs@CMC foram conjugadas a glicoproteína gp41 através de uma rota aquosa da seguinte forma: a dispersão coloidal de AuNPs@CMC foi centrifugada (5 ciclos  $\times$  15 min, 12000rpm, Hettich Mikro 200R, Alemanha) para remoção de polímero e outros reagentes livres, sendo o precipitado dispersado em tampão MES (pH 5,5 $\pm$ 0,2). Em seguida, a solução EDC/NHS (300 $\mu$ L, 60mM EDC/0,2 M NHS) foi adicionada ao frasco de reação com 10,0mL de dispersão coloidal AuNPs@CMC (2,5 $\mu$ gmL<sup>-1</sup>) e magneticamente agitada por 25min a (6 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C. A solução resultante foi centrifugada (5 ciclos  $\times$  5min, 4000rpm) e o precipitado foi resuspenso em 10mL de tampão MES. Em seguida, sob agitação contínua, 30 $\mu$ g de glicoproteína gp41 foi adicionada ao frasco para preparar o bioconjugado AuNPs@CMC-gp41 e o sistema foi incubado a (6 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C overnight. A solução resultante foi purificada por centrifugação (6 ciclos  $\times$  5min, 4.000rpm) e o precipitado foi ressuspensionado em tampão MES (pH 5,5 $\pm$ 0,2).

#### **4.2.5 Síntese de bioconjugados de AuNPs@CMC\_PolyArg com anticorpos HIV1 (AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV)**

As AuNPs@CMC funcionalizadas com arginina foram conjugadas com anticorpo anti-HIV1 gp41 através de uma rota aquosa da seguinte forma: A dispersão coloidal de AuNPs@CMC\_PolyArg foi centrifugada (5 ciclos  $\times$  15min, 12000rpm) e o precipitado

foi ressuspensionado em tampão MES. Na sequência, 15µg de anticorpo monoclonal HIV1 foram adicionados a 300µL da solução EDC/NHS (60mM EDC/0,2 M NHS). Esta solução, contendo o anticorpo ativado (ou seja, região terminal carboxílica, F<sub>C</sub>) foi adicionada a um frasco de reação com 10,0mL de dispersão coloidal AuNPs@CMC\_PolyArg (2,5µg.mL<sup>-1</sup>), magneticamente agitada por 15min a 6±2°C e incubada durante a noite para formação de ligação covalente. O sistema AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV foi purificado por centrifugação (5 ciclos × 5min, 4000rpm), seguido pela redispersão do precipitado em 10 mL de tampão MÊS.

#### 4.2.6 Protocolo do imunoenensaio para detecção do HIV1 (LIA)

Para o imunoenensaio de detecção do HIV1, foi avaliada a sensibilidade de detecção de AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg por espalhamento dinâmico de luz (DLS): O limite de detecção (LOD) da técnica de DLS para os conjugados sintetizados foi avaliado por medidas de AuNPs@CMC em diluições em série da solução estoque (1,0nM, nos valores de pH de (5,0 ± 0,1), (7,0 ± 0,1) e (10,0 ± 0,1)). A intensidade do espalhamento (como taxa de contagem de fótons - kcps) foi medida por análises de DLS usando um instrumento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation) com um comprimento de onda da luz laser de 659nm (laser de diodo vermelho de 35mW), ângulo de dispersão de 90,0°C, temperatura de (25 ± 1)°C e tempo de execução de 5,0s. O limite de detecção (LOD, menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não quantificada) e o limite de quantificação (LOQ, menor quantidade de analito em uma amostra, que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas) foram calculados a partir de curvas de ajuste linear usando o desvio padrão da resposta ( $\sigma$ ) e a inclinação, de acordo com as equações 4.1 e 4.2.

$$\text{DBO} = 3,3\sigma / \text{inclinação} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$\text{LOQ} = 10\sigma / \text{inclinação} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Como prova de conceito, a técnica de DLS foi utilizada como imunoenensaio para detecção do HIV1 em análises qualitativas e semiquantitativas de interações de antígenos-anticorpos usando os novos imunonanoconjugados biofuncionalizados para detecção do HIV-1. Essa técnica foi então nomeada de LIA (Laser immunoassay). Para

o imunoensaio, a dispersão coloidal AuNPs@CMC-gp41 (1,5mL, gp41 na concentração de 23nM) e anticorpo AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV (1,5mL, anticorpo abHIV na concentração de 10nM) foram misturados em uma cubeta por 1h em temperatura ambiente e análises de DLS foram realizadas. A análise de DLS foi realizada ainda em amostras de "referência" e "controle": AuNPs@CMC, AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV e a mistura de AuNPs@CMC-gp41 e AuNPs@CMC\_PolyArg (sem anticorpos) (1,5mL de cada).

Além disso, para validar esses nanoconjugados baseados em AuNPs para biosensorização em aplicações clínicas, seria necessário amostras de soro sanguíneo de paciente HIV-positivo, o que tem sérias restrições de biossegurança e preocupações éticas e está fora do escopo desta pesquisa. No entanto, para contornar este problema, sem levantar quaisquer preocupações de saúde humana, um novo sistema equivalente de anticorpos-antígeno foi projetado e desenvolvido a partir de outros mamíferos (vírus da anemia infecciosa equina, EIAV, para "imitar o HIV") usando a mesma resposta biosensorizante com base na técnica DLS para detectar aglutinação.

AuNPs@CMC foram conjugadas com glicoproteína 45 (proteína gp45, sequência de 20 aminoácidos, KERQQVEETFNLIGCIERTH,  $2.430,70\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e AuNPs@CMC\_PolyArg foram conjugados com anticorpo anti-gp45 (abEIAV) por via aquosa equivalente ao protocolo descrito anteriormente para glicoproteína gp41 e anticorpo anti-HIV1 nas seções 4.2.3 e 4.2.4, respectivamente. A escolha deste sistema baseou-se na alta similaridade do vírus da anemia infecciosa dos equídeos (EIAV) para a produção do anticorpo e da gp45, que desempenham um papel semelhante ao da gp41 no HIV, ao mediar à infecção por células hospedeiras do vírus. Os anticorpos anti-gp45 (abEIAV) derivados do soro sanguíneo positivo para EIAV foram gentilmente fornecidos pelo Prof. JKP dos Reis (extraídos/purificados de animais inoculados com proteína antigênica gp45; Escola de Veterinária, UFMG, Brasil; aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal -CTEA e diretrizes brasileiras). Assim, o método LIA, com base em análises de DLS, foi aplicado variando a concentração de anticorpo AuNPs@CMC\_PolyArg (2, 4, 8, 16, 32 e 64pM) na solução misturada com a solução AuNPs@CMC-gp45 (64pM). Essa faixa de concentração foi definida pelas experiências anteriores de intensidade de espalhamento de luz de nanoconjugados de AuNPs@CMC, onde a região linear da resposta de concentração foi utilizada.

#### 4.2.7 Ensaio ELISA

Para confirmar a bioatividade da proteína recombinante gp41 na superfície de AuNPs@CMC foram realizados ensaios de ELISA <sup>(161)</sup>. Em cada poço de uma placa de ELISA padrão de 96 poços foram adicionados 100µL de AuNPs@CMC-gp41 na concentração de 1,0µg.mL<sup>-1</sup> e incubada durante a noite a 4°C. Os conjugados AuNPs@CMC-gp41 eventualmente não ligados, foram removidos da placa com tampão de lavagem (tampão salino de fosfato com Tween, PBST) e cada poço foi bloqueado com BSA a 1% em PBS a 37°C por 1h. Então, 100µL de anticorpos anti-HIV (4,0µg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados a cada poço e incubados por 1h a 37°C. Após a remoção dos anticorpos não ligados com o tampão de lavagem, foram adicionados 100µL de anticorpo secundário anti-IgG (peroxidase) e incubados a 37°C por 1h. A placa foi lavada cinco vezes usando tampão de lavagem para remover anticorpos não ligados. Em seguida, 100µL da solução de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados a cada poço e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. A reação foi encerrada adicionando 100µL de 2,0M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A absorbância foi medida em  $\lambda = 450\text{nm}$ . As amostras de controle para o ensaio foram preparadas da seguinte forma: (a) Os poços de microplaca preenchidos com tampão carbonato/bicarbonato foram usados como amostras do grupo controle; (b) As amostras do controle positivo foram preparadas utilizando poços de microplacas sensibilizados com a proteína gp41 em vez de conjugados AuNPs@CMC-gp41.

#### 4.2.8 Ensaio de Atividade Mitocondrial (MTT)

O protocolo experimental para os ensaios de Atividade Mitocondrial (MTT) foram os seguintes: Todos os testes biológicos foram realizados de acordo com a ISO 10993-5: 2009/(R) 2014 (Avaliação biológica de dispositivos médicos: Testes de citotoxicidade *in vitro*). Células de rim embrionário humano (HEK 293T, American Type Culture Collection - ATCC® CRL-1573™) foram gentilmente fornecidas pelo Prof. M. F. Leite (Departamento de Fisiologia e Biofísica, UFMG). As células do glioma maligno (U87 MG) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (ATCC® HTB-14™). As células HEK 293T (passagem 21) e U87 MG (passagem 10) foram cultivadas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco BRL, EUA) com 10% de

FBS (soro bovino fetal, Gibco BRL, EUA), penicilina G de sódio ( 10 unidades mL<sup>-1</sup>, Gibco BRL, EUA), sulfato de estreptomicina (10mg.mL<sup>-1</sup>, Gibco BRL, EUA) e anfotericina-b (0,025mg.mL<sup>-1</sup>, Gibco BRL, EUA) em uma atmosfera umidificada de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

Todas as células foram plaqueadas (1 x 10<sup>4</sup> células/poço) em placas de 96 poços. As populações de células foram sincronizadas em meio sem soro por 24h. Depois disso, o volume do meio foi aspirado e substituído por meio DMEM contendo 10% de FBS por 24h. Em seguida, o nanoconjugado AuNPs@CMC foi adicionado aos poços individuais em concentrações finais de AuNPs de 1,25mg.L<sup>-1</sup> até 125,0mg.L<sup>-1</sup>. As amostras de controle foram projetadas da seguinte forma: grupo controle (cultura de células com DMEM e 10% de FBS); controle positivo (cultura de células com DMEM, 10% de FBS e 1,0% v/v Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, EUA)); e controle negativo (cultura de células com DMEM, 10% de FBS e chips de polipropileno estéril Eppendorf®, 1mg.L<sup>-1</sup>, Eppendorf, Alemanha). Após 24h, todos os meios foram aspirados e substituídos por 60µL de meio de cultura contendo soro para cada poço. MTT (5mg.mL<sup>-1</sup>, > 98%, Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado a cada poço e incubado por 4h em um forno a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, 40µL de solução de SDS (dodecilsulfato de sódio, ≥ 99,0%, Sigma-Aldrich, EUA)/HCl a 4% (37%, Sigma-Aldrich, EUA) foram colocados em cada poço e incubados por 16h em um forno a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, 100µL foram removidos de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida no leitor de absorbância de microplacas iMark™ (Bio-Rad) com um filtro de comprimento de onda em λ = 595nm. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada após correções em branco, de acordo com a Equação 4.3, em que os valores do grupo controle foram definidos como 100% de viabilidade celular.

$$\text{Viabilidade celular} = (\text{absorbância da amostra e células})/(\text{absorbância do controle}) \times 100\% \quad (\text{Eq. 4.3})$$

A significância estatística foi testada usando ANOVA de uma via, seguida pelo método de Bonferroni. No nível de confiança  $\alpha$ ,  $\alpha < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As experiências foram realizadas com pelo menos triplicadas ( $n \geq 3$ ).

#### 4.2.9 Síntese de ZnS@CMC

Os QDts de ZnS@CMC foram sintetizados por via aquosa à temperatura ambiente com diferentes proporções molares de Zn:S: 1:2 ( $[Zn^{2+}]/[S^{2-}] = 0,5$ , excesso de enxofre); 1:1 ( $[Zn^{2+}]/[S^{2-}] = 1,0$  estequiométrico); e 2:1 ( $[Zn^{2+}]/[S^{2-}] = 2,0$  excesso de zinco), conforme ilustrado na figura 4.1. Além disso, a síntese foi realizada em diferentes valores de pH ( $3,5 \pm 0,1$ ) e ( $5,5 \pm 0,1$ ) (ácido), ( $7,5 \pm 0,1$ ) (neutro) e ( $8,5 \pm 0,1$ ) e ( $10,5 \pm 0,1$ ) (alcalino). Esses parâmetros foram escolhidos com base no comportamento sensível ao pH da CMC, associado ao efeito das concentrações relativas de precursores na nucleação e crescimento de QDts de ZnS em dispersão coloidal. Foi preparada uma solução de CMC (0,3% p/v) adicionando pó de carboximetilcelulose (0,6 g) em 200 mL de água DI e mantida sob agitação por 24h até a completa dissolução em pH  $\sim (7,5 \pm 0,1)$ . Para a síntese química em condições alcalinas (pH 8,5 e 10,5), o pH da solução CMC foi ajustado com NaOH ( $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ) adicionado gota a gota. Para a síntese ácida (pH  $\sim 3,5$  e 5,5), o pH foi ajustado com HCl ( $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) adicionado gota a gota. Após o ajuste do pH, a quantidade necessária de água DI foi adicionada para obter uma concentração de CMC de 0,2% em peso. Considerando a razão molar relativa de precursores, as sínteses dos QDts de ZnS@CMC foram realizadas da seguinte forma:

Em 15mL de solução aquosa de CMC foram adicionadas lentamente e sob agitação constante, 10mL da solução de  $ZnCl_2$  nas concentrações apresentadas na tabela 4.1, considerando a razão molar relativa de precursores. A solução resultante permaneceu em repouso em geladeira  $\sim (6 \pm 1)^\circ\text{C}$  por 24 horas. Em seguida foi realizada a adição lenta de 2mL da solução sulfeto de sódio nas concentrações apresentadas na tabela 4.1, considerando a razão molar relativa de precursores. A agitação foi mantida por 30 minutos após esse procedimento. As suspensões de QDts obtidas foram nítidas e incolores, sendo as amostras armazenadas a  $\sim (6 \pm 1)^\circ\text{C}$ . As amostras foram preparadas em triplicatas.

Amostra	$[Zn^{2+}]$ (mol.L <sup>-1</sup> )	$[S^{2-}]$ (mol.L <sup>-1</sup> )	$[Zn^{2+}]/[S^{2-}]$
Zn:S 1:2	$2.2 \times 10^{-3}$	$4.4 \times 10^{-3}$	0.5
Zn:S 1:1	$2.2 \times 10^{-3}$	$2.2 \times 10^{-3}$	1.0
Zn:S 2:1	$4.4 \times 10^{-3}$	$2.2 \times 10^{-3}$	2.0

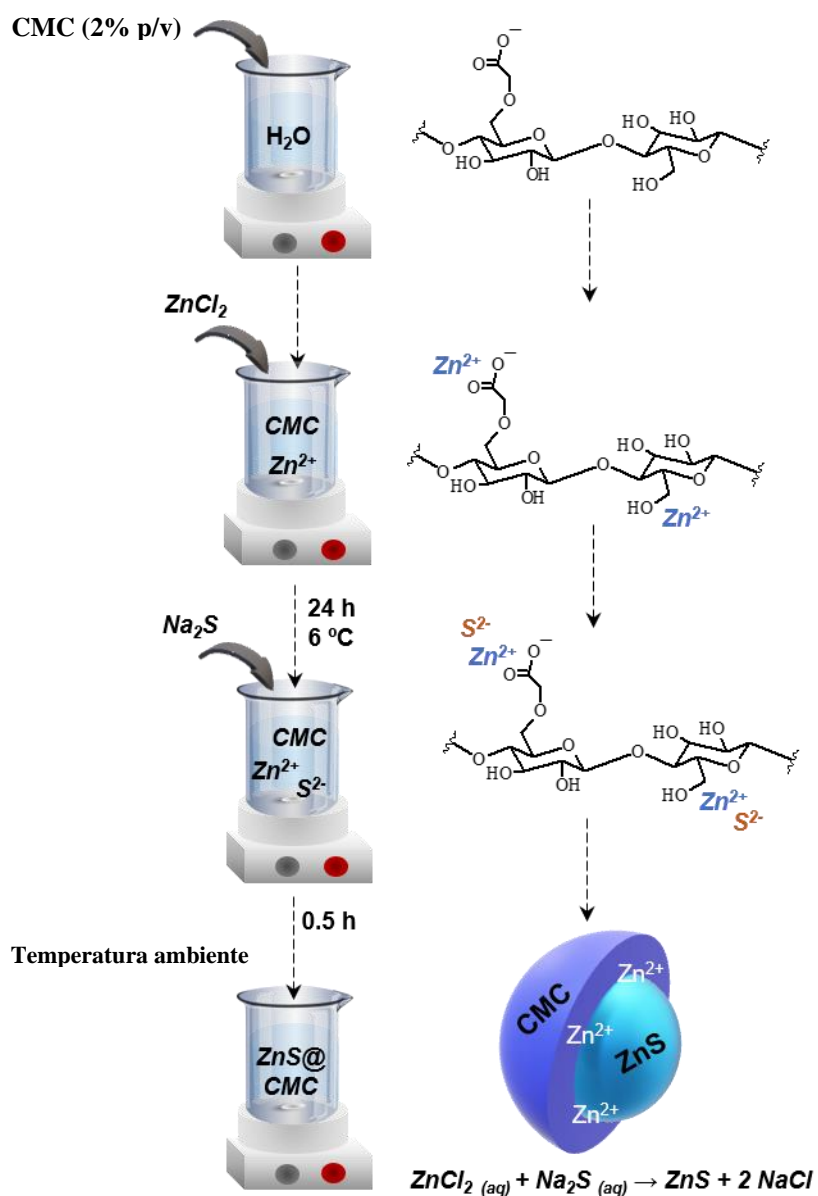


Figura 4.1 - Procedimento experimental para síntese de ZnS@CMC.

#### 4.2.10 Síntese de nanoheterojunção núcleo-casca Au@ZnS-CMC

Para a síntese da estrutura núcleo-casca foi utilizado um modelo matemático, considerando uma espessura de casca de 2,5nm (diâmetro estimado para observação do efeito de confinamento quântico, levando em consideração o raio de Bohr do ZnS). Pelo algoritmo foi estimada uma concentração de zinco e enxofre de 0,5mM, considerando uma reação estequiométrica (Zn:S 1:1). Para este experimento foram preparadas soluções estoque de ZnCl<sub>2</sub> na concentração 10mM e de Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O na concentração 50mM que atuam como precursores de zinco e enxofre, respectivamente, (Figura 4.2). Em 15mL de dispersão aquosa de AuNPs@CMC estabilizadas por CMC (GS = 0,77 com massa molar  $\approx 250,000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) foram adicionadas lentamente e sob agitação constante 10mL da solução de ZnCl<sub>2</sub> na concentração de 1,5mM, sendo a solução resultante deixada em repouso em geladeira  $\sim (6 \pm 1^\circ\text{C})$  por 24 horas. Em seguida, foi realizada a adição lenta de 2mL da solução de sulfeto de sódio na concentração de 7,5mM para uma razão molar final estequiométrica (Zn:S) de 1:1. A agitação foi mantida por 30 minutos após esse procedimento. A síntese foi realizada em pH  $(7,5 \pm 0,5)$ . A concentração final de [Zn<sup>2+</sup>] e [S<sup>2-</sup>] foi de 0,5mM. As amostras foram preparadas em triplicatas. As dispersões coloidais foram centrifugadas (5 ciclos  $\times$  10min, 10000rpm) para remoção de ZnS@CMC livre e qualquer componente não reagido na reação de síntese.

Para a síntese de ZnS@CMC puro que atua como controle para comparação nas amostras de Au@ZnS-CMC, foi utilizando os procedimentos a seguir.

Em 15mL de solução aquosa de CMC foram adicionadas lentamente e sob agitação constante, 10mL da solução de ZnCl<sub>2</sub> na concentração de 1,5mM, sendo a solução resultante deixada em repouso em geladeira  $\sim (6 \pm 1^\circ\text{C})$  por 24 horas. Em seguida foi realizada a adição lenta de 2mL da solução de sulfeto de sódio na concentração de 7,5mM para uma razão molar final estequiométrica (Zn:S) de 1:1. A agitação foi mantida por 30 minutos após esse procedimento. A síntese foi realizada em pH  $7,5 \pm 0,5$ . A concentração final de [Zn<sup>2+</sup>] e [S<sup>2-</sup>] foi de 0,55mM. As amostras foram preparadas em triplicatas. O ajuste do valor de concentração dos precursores em relação ao ZnS@CMC sintetizados na sessão 4.2.9, foi necessário para evitar excesso de



ZnS@CMC em relação ao número de AuNPs@CMC em solução, conforme modelo desenvolvido.

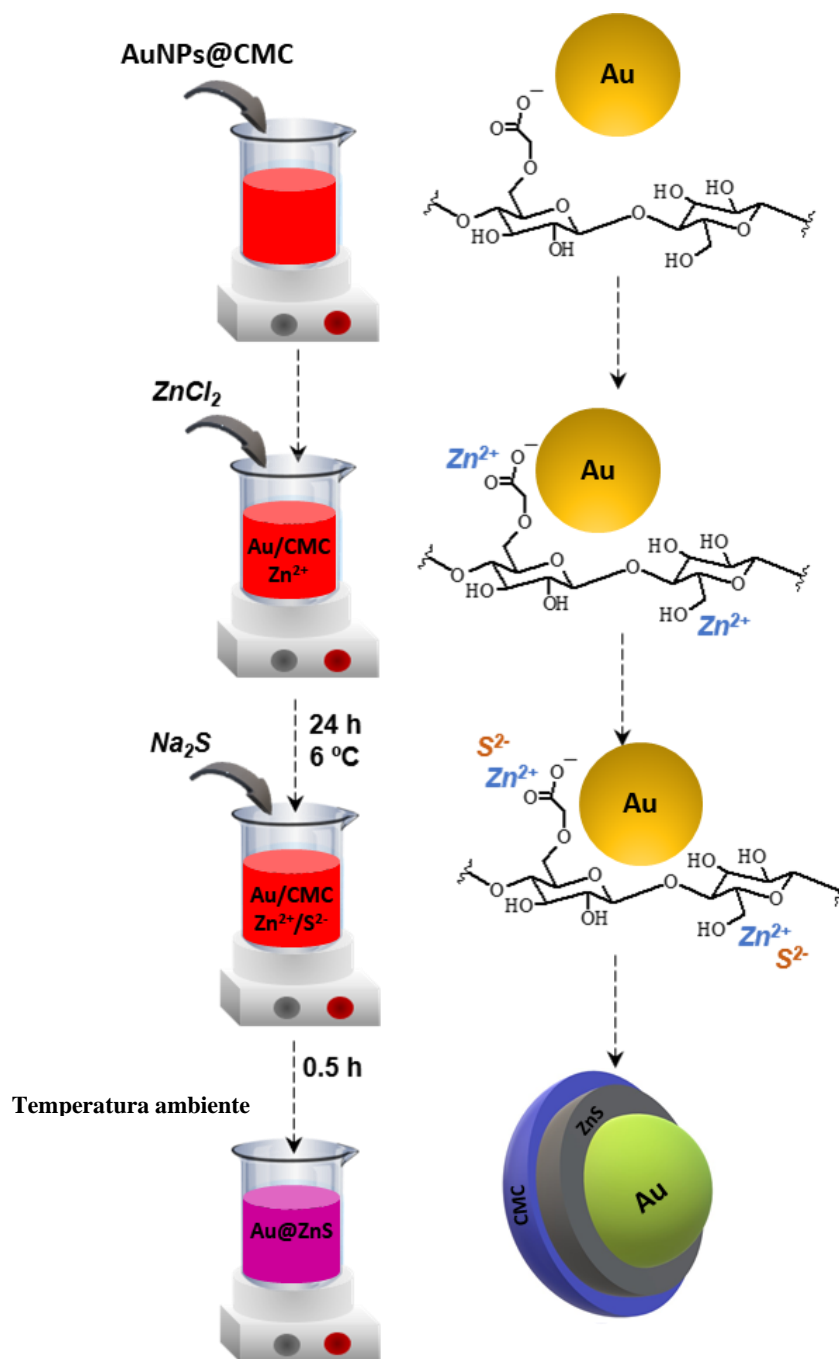


Figura 4.2 - Procedimento experimental para síntese de nanohíbridos núcleo-casca Au@ZnS-CMC.

#### **4.2.11 Mistura física entre AuNPs@CMC e ZnS@CMC**

As amostras de mistura física entre AuNPs@CMC e ZnS@CMC foram preparadas adicionando lentamente e em agitação magnética, 10mL da solução de ZnS@CMC em 10mL da solução de AuNPs@CMC. A agitação foi mantida por 30 minutos e a solução resultante mantida em repouso por 24 horas. A concentração de ouro e de ZnS foi mantida igual em todas as condições. As amostras foram preparadas em triplicatas. As amostras foram nomeadas de Mix-Au-ZnS@CMC.

#### **4.2.12 Variação de espessura da casca**

Nas amostras de Au@ZnS-CMC foi crescida uma camada adicional de material semiconductor para explorar os efeitos do confinamento quântico sobre as propriedades ópticas da dispersão coloidal. Inicialmente a solução de Au@ZnS-CMC foi purificada por centrifugação 3 vezes para remoção de íons não reagidos do crescimento da primeira camada. Em seguida, em 15mL de dispersão aquosa de Au@ZnS-CMC foram adicionados lentamente e sob agitação constante 10mL da solução de ZnCl<sub>2</sub> na concentração de 1,5mM, sendo a solução resultante deixada em repouso em geladeira ~ (6 ± 1°C) por 24 horas. Em seguida foi realizada a adição lenta de 2mL da solução sulfeto de sódio na concentração de 7,5mM para uma razão molar final estequiométrica (Zn:S) de 1:1. A agitação foi mantida por 30 minutos após esse procedimento. A síntese foi realizada em pH (7,5 ± 0,5). As medidas de espectroscopia UV-Vis foram realizadas ajustando as dispersões coloidais para a mesma concentração de AuNPs@CMC.

#### **4.2.13 Nanoheterojunção núcleo-casca Au@ZnS-CMC dopada com índio (Au@ZnS:In-CMC)**

Para a síntese da estrutura núcleo-casca foi utilizado um modelo matemático, considerando uma espessura de casca de 2,5nm (diâmetro estimado para observação do efeito de confinamento quântico, levando em consideração o raio de Bohr do ZnS). Pelo algoritmo foi estimada uma concentração de zinco e enxofre de 0,5mM, considerando uma reação estequiométrica (Zn:S 1:1). Para este experimento foram preparadas soluções estoque de ZnCl<sub>2</sub> na concentração 10mM e Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O na concentração 10mM que atuam como precursores de zinco e enxofre, respectivamente. Foi preparada ainda

uma solução estoque de nitrato de índio  $\text{In}(\text{NO}_3)_3$  na concentração 5mM que atuou como precursor de íons  $[\text{In}^{3+}]$  para dopagem da casca de ZnS. Em 15mL de solução aquosa de AuNPs@CMC estabilizadas por CMC (GS = 0,77 com Massa molar  $\approx 250,000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) foram adicionadas lentamente e sob agitação constante 4mL da solução de  $\text{ZnCl}_2$  na concentração de 3,5mM. Em seguida foram então adicionados 6mL da solução de  $\text{In}(\text{NO}_3)_3$  nas concentrações mostradas na tabela 4.2, para concentração dos reagentes precursores e na tabela 4.3 para a concentração final na condição de síntese. A solução resultante permaneceu em repouso em geladeira  $\sim (6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$  por 24 horas. Em seguida foi realizada a adição lenta de 2mL da solução sulfeto de sódio na concentração de 7,5mM, para uma razão molar final estequiométrica (Zn:S) de 1:1. A agitação foi mantida por 30 minutos após esse procedimento. A síntese foi realizada em pH  $(7,5 \pm 0,5)$ . A concentração final de  $[\text{Zn}^{2+}]$  e  $[\text{S}^{2-}]$  foi de 0,55mM. As amostras foram preparadas em triplicatas. As dispersões coloidais foram centrifugadas (5 ciclos  $\times$  10min, 10000rpm) para remoção de ZnS@CMC livre e qualquer componente não reagido na reação de síntese.

O volume final foi 27mL com os valores de concentrações de AuNPs,  $\text{ZnCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  iguais em todas as amostras sintetizadas. Em valores de concentração de  $\text{In}(\text{NO}_3)_3$  na condição de síntese maiores que 0,5 mM foi observada precipitação das AuNPs@CMC.

Tabela 4.2 - Concentração dos precursores (mM)						
Amostra	A1	A2	A3	A4	A5	A6
ZnCl <sub>2</sub> (4mL)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Na <sub>2</sub> S (2mL)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
In(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (6mL)	0	1,6	1,2	0,7	0,5	0,25

Tabela 4.3 - Concentração na condição de síntese (mM)						
Amostra	A1	A2	A3	A4	A5	A6
[Zn <sup>2+</sup> ]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
[S <sup>2-</sup> ]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
[In <sup>3+</sup> ]	0	0,35	0,25	0,15	0,10	0,05
Zn:In		1:0,7	1:0,5	1:0,3	1:0,2	1:0,1
Zn:In In (%)		70%	50%	30%	20%	10%

## 4.3 Caracterização

### 4.3.1 Caracterização óptica

A caracterização óptica foi realizada por espectroscopia UV-Vis-NIR, usando um espectrofotômetro Perkin-Elmer (Lambda EZ-210) em modo de transmissão com uma cubeta de quartzo. As medidas foram realizadas ao longo de um intervalo de comprimento de onda de 200-1100nm. Pela análise do pico de energia no espectro de absorção UV-Vis foi possível estimar a energia de banda proibida ( $E_g$ ) dos QDs e estimar crescimento de AuNPs em dispersão coloidal. Também é possível estimar a distribuição de tamanho das nanopartículas. Para nanopartículas metálicas as medidas de UV-Vis tornam possível avaliar a síntese através do pico de absorção devido ao plasmon, e o estado de agregação das nanopartículas.

Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e medidas de potenciais zeta (ZP) foram realizadas nas dispersões coloidais utilizando um instrumento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation) com um comprimento de onda da luz laser de 659nm (laser de diodo vermelho de 35mW), ângulo de dispersão de 90,0°C, temperatura de  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  e tempo de execução de 5,0s. Essas medidas são necessárias para avaliar o tamanho das nanopartículas e seu estado de agregação, além de sua carga superficial.

A caracterização por fotoluminescência (PL) foi realizada com base em espectros de estado estacionário e mapeamento de contorno de emissão de excitação 3D adquirido usando um equipamento FluoroMax-Plus-CP (Horiba Scientific, Japão) medido à temperatura ambiente em uma cubeta de quartzo (excitação  $\lambda_{\text{exc}} = 200\text{-}400\text{ nm}$ ; emissão  $\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}700\text{ nm}$  e fenda = 2,5 nm). O rendimento quântico (QY) foi estimado pelo procedimento padrão comparativo usando bissulfato de quinina (Sigma-Aldrich, EUA) em ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, EUA, 95,0-98,0%) como referência padrão em  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{ nm}$ ; As medidas foram realizadas para avaliar a intensidade de luminescência das amostras de ZnS@CMC e das amostras de híbridos entre ZnS@CMC e AuNPs@CMC, e de Au@ZnS-CMC.

Medidas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de Refletância Difusa (DRIFTS, 4000-500cm<sup>-1</sup> 64 varreduras e uma resolução de 2cm<sup>-1</sup>). As amostras foram preparadas colocando 20µL de solução em pó de KBr, sendo a mistura seca à temperatura de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h.

### 4.3.2 Caracterização morfológica e estrutural

As características morfológicas, estruturais, distribuição de tamanhos, e as análises químicas das amostras de QDs, de nanopartículas metálicas e dos híbridos formados, foram caracterizadas por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), que foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-20, instalado no Centro de Microscopia da UFMG, usando grades de cobre com um filme contínuo de carbono padrão para microscopia, e uma tensão de aceleração de 200 kV acoplado a um espectrômetro de dispersão de energia de raio-X (EDX) e usando difração de elétrons com área selecionada (SAED). Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura quanta 200, instalado no Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram preparadas sobre uma grade MET (200 mesh com filme de carbono) com 20  $\mu$ L de dispersão coloidal. Para determinação da distribuição de tamanhos e tamanho médio das nanopartículas, foram medidas em média 100 partículas em cada amostra analisada, utilizando o software Digital Micrograph<sup>®</sup> (Gatan, Inc. USA). As incertezas foram aferidas por desvio padrão.

As medidas de AFM foram realizadas em um microscópio Multimode 8 fabricado pela Bruker e operando no modo ScanAsyst<sup>®</sup>, sendo essa uma técnica de otimização de imagem baseada no modo PeakForce Tapping<sup>®</sup>, e que permite a obtenção de imagens de AFM de alta resolução de forma aprimorada pelo sistema. A taxa de varredura foi 1,0Hz, e as imagens adquiridas com uma resolução de  $256 \times 256$  pixels, utilizando uma ponta de SiN, com constante  $K = 0,4\text{N/m}$  e frequência 70kHz, a temperatura da sala variou entre 19-22°C.

A análise estrutural foi realizada por difração de elétrons por área selecionada (SAED), juntamente com as análises de TEM e ainda por difração de raios-X (DRX), em um difratômetro de raios-X Philips-PANalytical PW 1710 utilizando comprimento de onda de 1,540598 angstroms (Cu-K $\alpha$ ). Foi utilizado o software Match para indexação dos picos e identificação elementar.

### **4.3.3 Caracterização química**

A caracterização química foi realizada utilizando detector (EDAX) de Si-Li para espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G2-20 e além por utilizando o sistema Quantum SE com filtro de energia Gatan (GIF), com detector para Espectroscopia de Perda de Energia de Elétrons (EELS) com resolução de até 1eV.

### **4.3.4 Caracterização de carga superficial e diâmetro hidrodinâmico**

O diâmetro hidrodinâmico ( $H_D$ ) foi caracterizado por espalhamento dinâmico de luz (DLS), e a carga superficial foi caracterizada por medidas de potencial zeta (ZP), utilizando um instrumento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation) com um comprimento de onda da luz laser de 659nm (laser de diodo vermelho de 35mW), ângulo de dispersão de 90,0°C, temperatura de  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  e tempo de execução de 5,0s.

### **4.3.5 Caracterização Biológica**

A citotoxicidade de AuNPs funcionalizadas com CMC com grau de substituição de 0,77 e 1,22 foi analisada através da metodologia MTT. As amostras foram avaliadas com base na análise da viabilidade celular de células embrionárias de rim humano (células HEK 293T) e de Glioma (células U87). No ensaio de MTT ('3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide'), as amostras foram preparadas seguindo as normas 10993-5:2009 ('Biological evaluation of medical devices: Tests for in vitro cytotoxicity') para o ensaio de contato direto. Foi utilizado o tempo de tratamento de 24hs, utilizados os seguintes controles:

- Controle referência = Células + meio de cultura + soro fetal bovino.
- Controle positivo = Triton x100 (1% v/v em PBS).
- Controle negativo = lascas de tubos Eppendorf (estéreis).

Metodologia MTT ('3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide')

Células HEK293T e U87 foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células/poço) em placas de 96 poços. As populações celulares foram sincronizadas em meio isento de soro durante 24 hs. Depois disso, o volume de meio foi aspirado e substituído por meio DMEM com 10% de SFB. Foram utilizados 50 $\mu$ l (50 $\mu$ l.0,2ml<sup>-1</sup> (v/v; amostra/meio de cultura) das AuNPs em cinco diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), para cada grau de substituição, denominadas de 77\_Au\_5, 77\_Au\_10, 77\_Au\_15, 77\_Au\_20, 77\_Au\_25, 122\_Au\_5, 122\_Au\_10, 122\_Au\_15, 122\_Au\_20 e 122\_Au\_25. Foram ainda realizados experimentos com CMC pura nos dois graus de substituição denominadas 77\_Pura e 122\_Pura, e por fim de amostras de AuNPs centrifugadas para remoção de possíveis resíduos da síntese, denominadas 77\_Au\_c e 122\_Au\_c.

Controles de células e DMEM com 10% de SFB foram utilizados como referência, como controle positivo Triton X-100 (1% v/v em tampão fosfato salino) e (PBS, Gibco BRL, Nova Iorque, EUA) e como controle negativo lascas estéreis de tubos de Eppendorf de polipropileno (1mg.mL<sup>-1</sup>, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após 24hs, o meio foi aspirado e substituído por 60 $\mu$ L de meio de cultura com soro, em cada poço e as células foram fotografadas utilizando microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED, Alemanha). Foram adicionados a cada poço 50 $\mu$ L de reagente MTT (5mg.mL<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubou-se durante 4h em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, 40 $\mu$ l de solução de Isopropanol/4% de HCl foram colocadas em cada poço. Em seguida, 100 $\mu$ L foram removidos de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços para quantificar a absorbância (Abs) em espectrofotômetro (I-Mark, Bio-Rad) com filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos como percentagem de células viáveis de acordo com a equação 4.4.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs (amostras)} \times 100}{\text{Abs (controle)}} \quad \text{eq: (4.4)}$$

Análise estatística: O software Prism (Software GraphPad, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análise dos dados. A análise estatística foi realizada considerando como significância o  $P < 0,05$  e os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  os desvios padrões. Os experimentos foram realizados com  $n = 6$  e o método foi o ‘one way’/ANOVA/Bonferroni.



## Capítulo 5 - Resultados e discussões

### 5.1 - Caracterização da CMC

O biopolímero CMC foi escolhido como base para nucleação e crescimento de nanopartículas em solução aquosa devido às suas interessantes propriedades físico-químicas, tais como ser um polímero aniônico dependente do pH, não tóxico e solúvel em água. Um importante parâmetro para aplicação da CMC é seu valor de pKa, uma vez que este parâmetro determina as condições em que os grupos COOH estão protonados ou desprotonados ( $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^-$ ), o que tem influência direta no mecanismo de nucleação e crescimento de nanocristais metálicos e semicondutores.

A determinação do pKa foi realizada aplicando a equação de Henderson-Hasselbalch estendida <sup>(160-161)</sup> (equação 5.1), onde  $[\text{A}^-]$  é referente à concentração total do substituinte dissociado, quantidade de (-CH<sub>2</sub>COOH) na cadeia polimérica (58g/mol para cada carboximetil substituído) e o  $[\text{HA}]$  é referente à concentração do substituinte não dissociado ( $\text{H}^+$ ). Nesta expressão, n é um parâmetro que depende da força iônica do meio, neste cálculo foi utilizado  $n = 1,4$  <sup>(160)</sup>.

$$pH = pK_a + n \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (5.1)$$

Na figura 5.1 é apresentado o resultado da titulação para as amostras CMC-77 e na figura 5.2 o resultado para a amostra CMC-122. Para a determinação do valor do pKa, os dados foram plotados de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch estendida, sendo feito um ajuste linear conforme demonstrado na figura 5.3 para a amostra CMC-77 e na figura 5.4 para a amostra CMC-122. Neste ajuste, o pKa será igual ao valor do pH para a situação em que o segundo termo da equação 5.1 seja igual à zero, ou seja, quando as quantidades de moléculas protonadas e desprotonadas são iguais  $[\text{A}^-]=[\text{HA}]$  <sup>(160)</sup>. O valor encontrado foi  $(4,3 \pm 0,1)$  para a CMC-77 e  $(4,2 \pm 0,1)$  para a CMC-122.

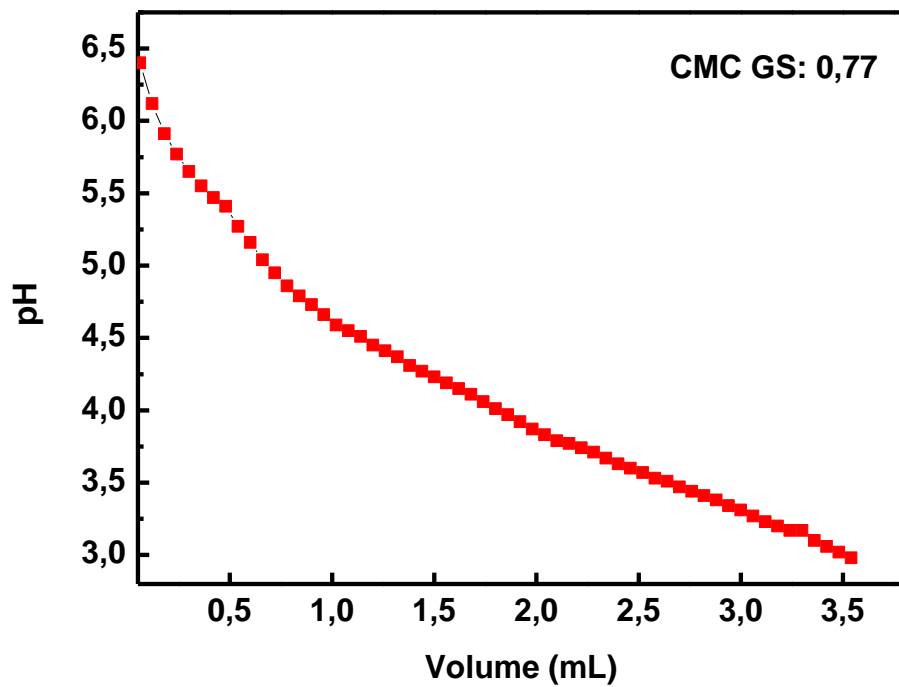


Figura 5.1 - Curva de titulação da CMC-77. Medidas realizadas no intervalo de pH entre  $(3,0 \pm 0,1)$  e  $(7,0 \pm 0,1)$ . pH ajustado com HCl 0,5 M.

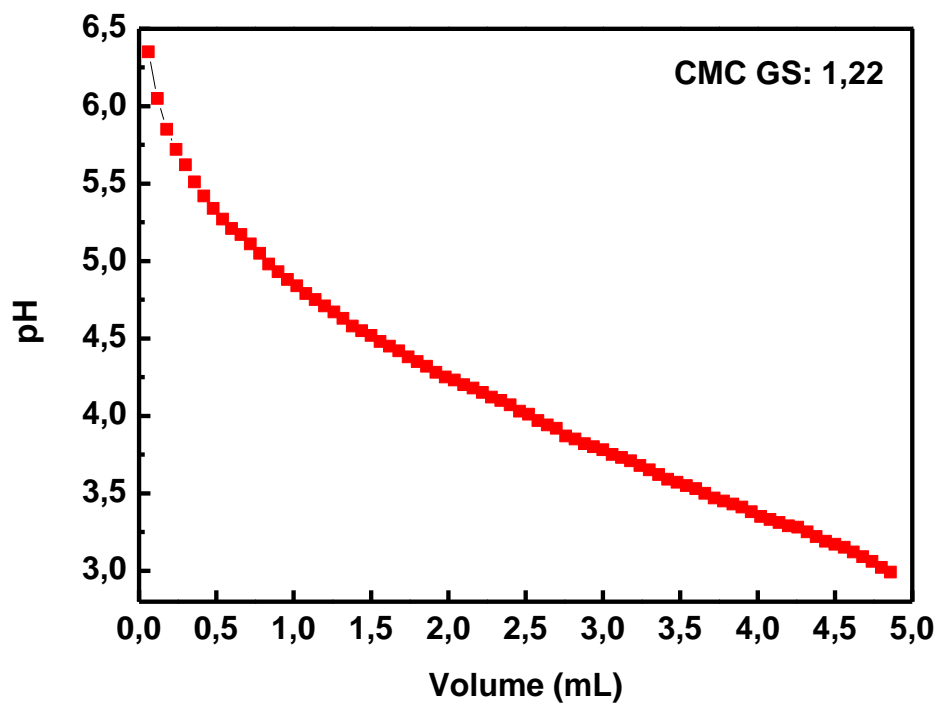


Figura 5.2 - Curva de titulação da CMC-122. Medidas realizadas no intervalo de pH entre  $(3,0 \pm 0,1)$  e  $(7,0 \pm 0,1)$ . pH ajustado com HCl 0,5 M.

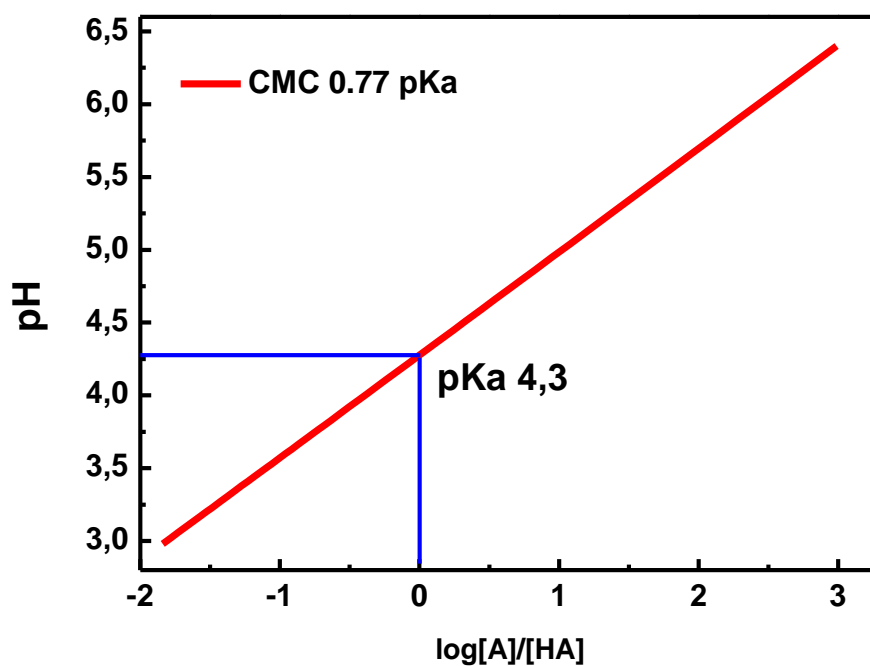


Figura 5.3 - Determinação do valor de pKa da CMC-77 de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch.

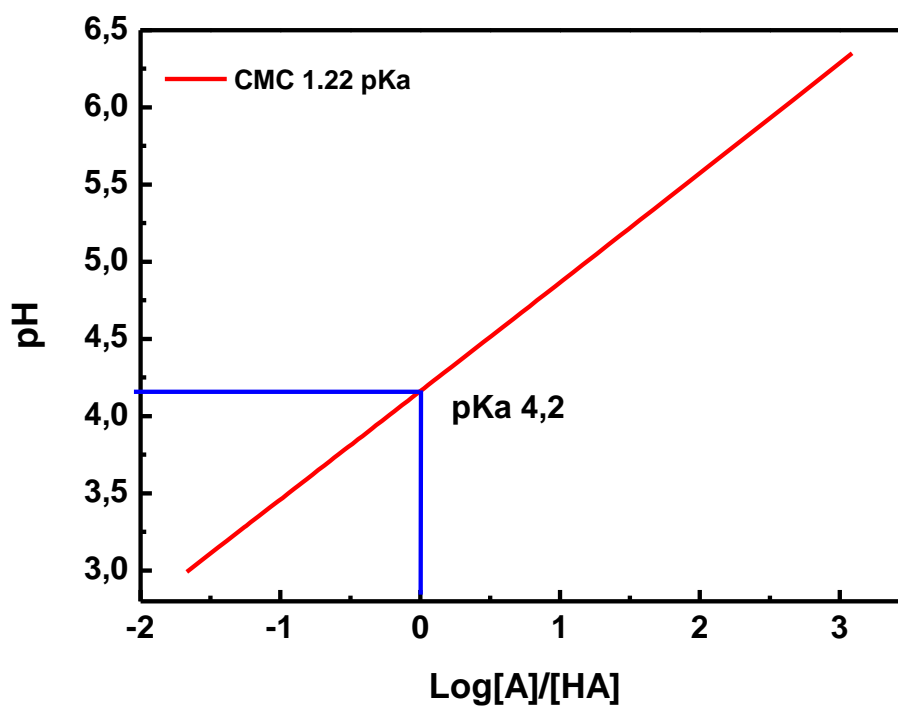


Figura 5.4 - Determinação do valor de pKa da CMC-122 de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch.

De acordo com os resultados obtidos, as amostras de CMC-77 e CMC-122 apresentam valores de pKa ligeiramente diferentes. Isso é atribuído aos diferentes GS das amostras de CMC. A CMC-122 tem mais grupos carboxílicos na cadeia (maior GS), desta forma, para que seja atingido o equilíbrio  $[A^-]=[HA]$ , é necessária uma maior quantidade de íons  $H^+$ , ou seja, pH mais ácido. Por outro lado, a CMC-77 com menor GS e, conseqüentemente, uma menor quantidade grupos carboxílicos na cadeia, uma quantidade menor de íons  $H^+$  são necessários para atingir o equilíbrio, ou seja, o equilíbrio é atingido em pH maior quando comparado a amostra CMC-122.

A caracterização do polímero CMC foi realizada ainda por medidas de potencial zeta, para determinar a carga superficial em dispersão coloidal e por medidas de FTIR, para determinar a presença dos grupos químicos essenciais para induzir a nucleação e crescimento de nanopartículas.

### **5.1.1 Caracterização por Potencial Zeta (ZP)**

A carga superficial da CMC é fundamentalmente influenciada pela protonação/desprotonação dos grupos ácido carboxílicos substituídos nas cadeias poliméricas ( $COOH \rightleftharpoons COO^-$ ), sendo dependente do pKa e conseqüentemente do pH da solução. Para  $pH < pKa$  os grupos  $COOH$  estão protonados, sendo assim esperado uma menor carga no polímero, por outro lado, para  $pH > pKa$  os grupos  $COOH$  estão desprotonados ( $COO^-$ ), sendo assim esperado uma maior carga no polímero. A carga superficial da CMC foi caracterizada por medidas de potencial Zeta (ZP) e os resultados são mostrados na figura 5.5 e resumidos na tabela 5.1. Como pode ser observado, ambas as amostras apresentam carga superficial negativa dependente do pH, sendo maior para pH neutro e alcalino ( $pH > pKa / COOH \rightarrow COO^-$ ) e menor para pH ácido ( $pH < pKa COOH$ ). Os grupos carboxilato ( $COO^-$ ) nas cadeias poliméricas são responsáveis pelas cargas negativas na CMC. Além disto, a CMC-122 apresenta carga superficial ligeiramente mais negativa quando comparado a CMC-77 devido à maior quantidade de grupos carboxilato ( $COO^-$ ) na cadeia polimérica (maior substituição).

Esse resultado é importante, porque essa carga superficial garante a estabilidade da dispersão coloidal e é um indicativo da disponibilidade de grupos carboxilato ( $COO^-$ ) para ligação de biomoléculas ou semicondutores.

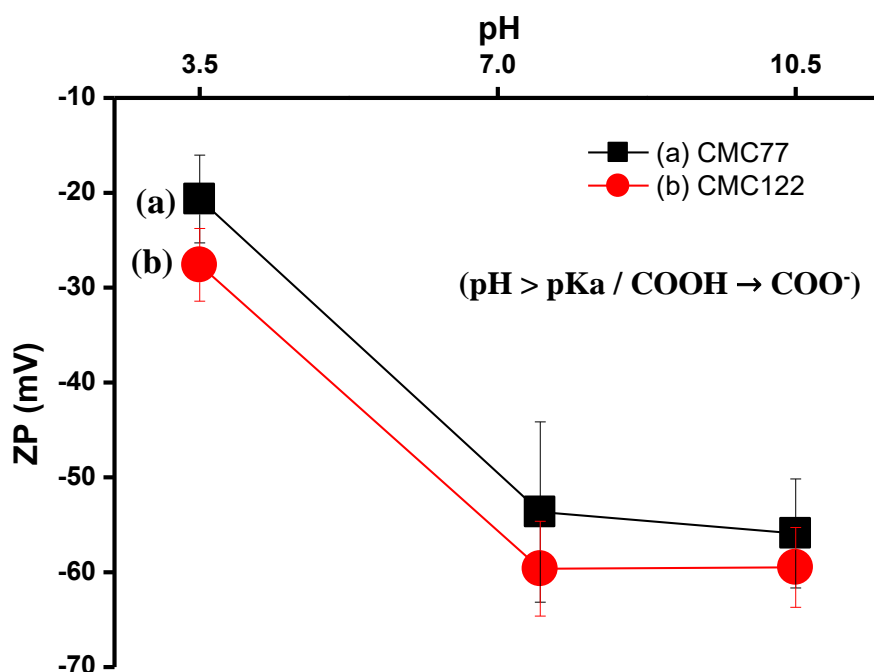


Figura 5.5 - Resultados de medidas de potencial zeta para amostras de CMC pura em (a) GS 0,77 (CMC-77) e (b) GS 1,22 (CMC-122).

pH	CMC-122	CMC-77
3,5 ± 0,1	-27,5±3,5	-20,5 ± 4,5
7,5 ± 0,1	-59,0±5,0	-53,5 ± 4,5
10,5 ± 0,1	-59,5±4,5	-60,0 ± 6,0

### 5.1.2 Caracterização por espectroscopia no infravermelho (FTIR).

A caracterização química da CMC foi realizada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier para identificação de seus grupos químicos principais, incluindo os grupos carboxilatos nas cadeias poliméricas <sup>(162)</sup>. Na figura 5.6 são apresentados os resultados das medidas de CMC-77 e CMC-122 em pH (7,5±0,1). Como observado, foi encontrada uma larga banda compreendida entre 3650 e 3050cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento O-H. Em torno de 2910cm<sup>-1</sup> há uma banda que é

atribuída ao estiramento do C-H. A deformação de estiramento assimétrico referente ao íon carboxilato  $\text{COO}^-$  está na região de  $1600\text{cm}^{-1}$ . Em  $1417\text{cm}^{-1}$  e  $1325\text{cm}^{-1}$  encontram-se os estiramentos simétricos do carboxilato  $\text{COO}^-$  e a banda em  $1060\text{cm}^{-1}$  é associada ao estiramento C-O do álcool secundário. Os resultados das medidas de espectroscopia de infravermelho em conjunto com os resultados de potencial zeta, confirmam a presença dos grupos carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ).

A Figura 5.7 mostra a influência do pH nos espectros de FTIR da CMC. A principal diferença entre os espectros foi associada ao comportamento sensível ao pH da CMC, principalmente devido à desprotonação e protonação de grupos carboxílicos ( $\text{R-COOH/R-COO}^-$ ). Em  $\text{pH} < \text{pKa}$  (isto é, ácido,  $\text{pH } 3,5 \pm 0,1$ ), a banda característica dos grupos  $\text{COOH}$  foi observada aproximadamente em  $1730\text{cm}^{-1}$  sendo atribuída à vibração de alongamento antissimétrico de  $\text{C} = \text{O}$ . Em  $\text{pH} > \text{pKa}$  ( $\text{pH } 7,5 \pm 0,1$  e  $\text{pH } 10,5 \pm 0,1$ ), quando os ácidos carboxílicos são totalmente desprotonados ( $\text{COO}^-$ ), a banda em aproximadamente  $1730\text{cm}^{-1}$  desapareceu e as bandas relacionadas aos carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) foram claramente detectadas em  $1650$  e  $1592\text{cm}^{-1}$  (alongamento assimétrico) e  $1416$  e  $1324\text{cm}^{-1}$  (alongamento simétrico). Além disso, as bandas dos álcoois primário (C6-OH a  $1028\text{cm}^{-1}$ ) e secundário (C2-OH a  $1112\text{cm}^{-1}$  e C3-OH a  $1060\text{cm}^{-1}$ ) e as vibrações de ligações glicosídicas ( $\beta$  1-4 em  $895\text{-}900\text{cm}^{-1}$ ) foram observados para todas as amostras.

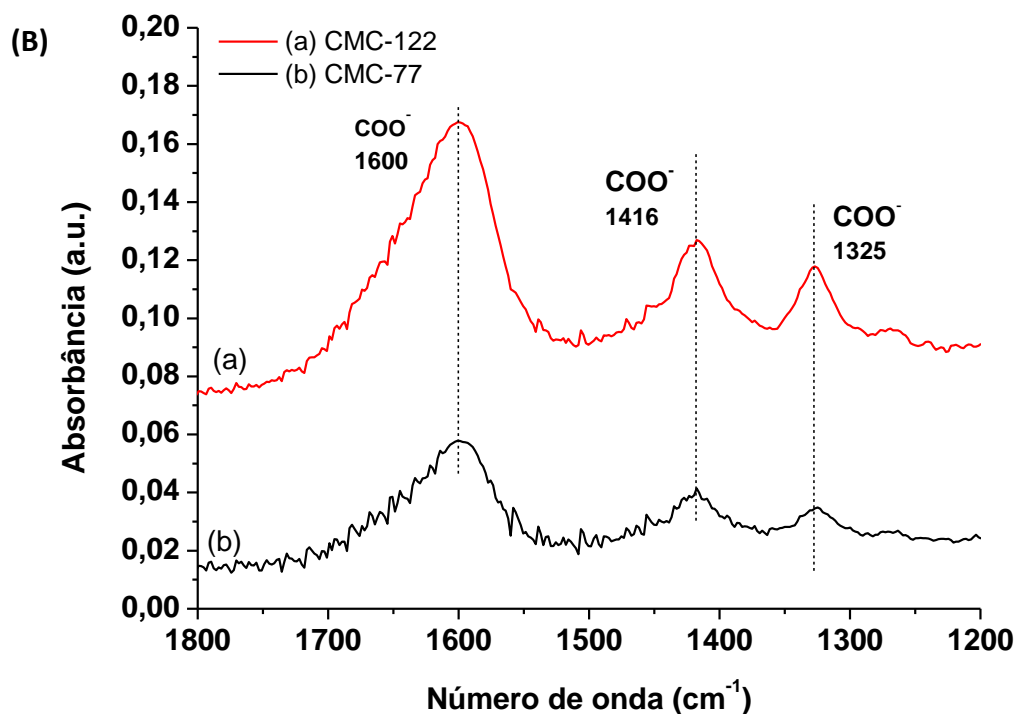
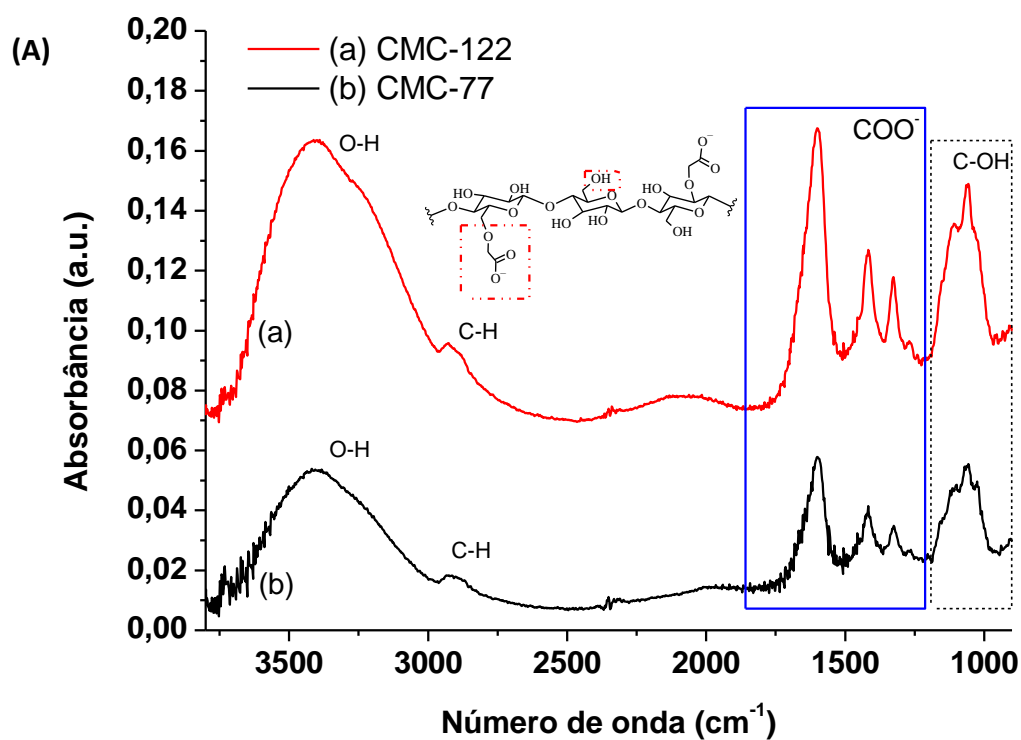


Figura 5.6 - (A) Espectros de FTIR na CMC (a) CMC-122 e (b) CMC-77. (B) Espectros de FTIR na CMC (a) CMC-122 e (b) CMC-77 para região espectral 1800-1200  $\text{cm}^{-1}$ , para identificação dos grupos carboxilato (pH  $7,5 \pm 0,1$ ).

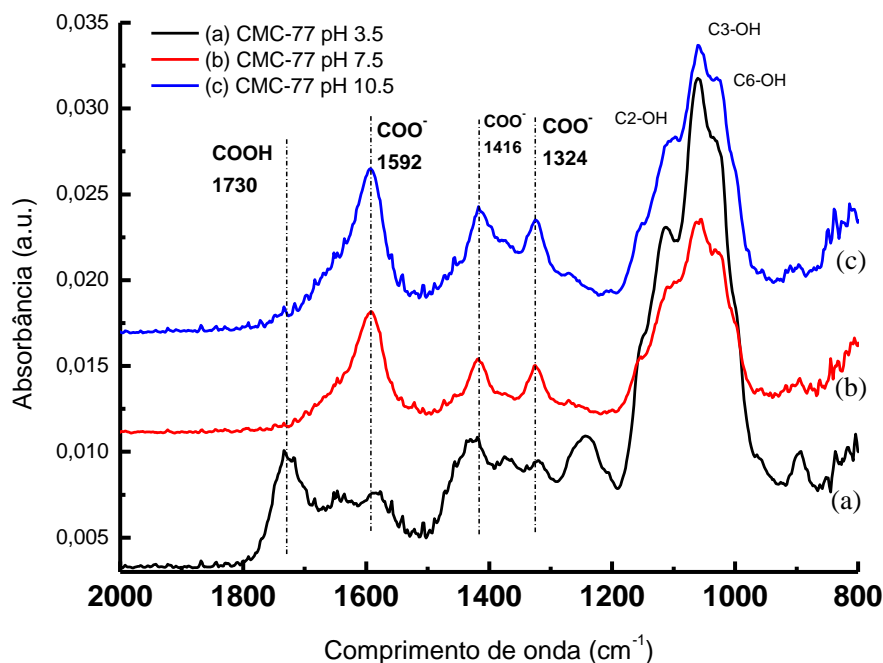


Figura 5.7 - Espectros de FTIR na CMC-77 em função do pH para identificação da protonação/desprotonação dos carboxilatos. (a) ( $3,5 \pm 0,1$ ), (b) ( $7,5 \pm 0,1$ ) e (c) ( $10,5 \pm 0,1$ ).

## 5.2 - Nucleação e crescimento de AuNPs mediado por CMC

AuNPs são normalmente produzidas pelos métodos clássicos de Turkevich com base no uso de citrato, ácido ascórbico ou outras rotas químicas baseadas em sementes<sup>(163-166)</sup>. Essas rotas de síntese são baseadas na redução *in situ* de íons metálicos precursores pelo uso de reagentes de sal metálico solúveis em água, um agente de redução e um agente de estabilização para restringir o crescimento e evitar a aglomeração. Os processos baseados em biopolímeros para a preparação de AuNPs são preferidos em comparação com rotas usando solventes perigosos e com alta toxicidade. Por essa razão, a síntese de AuNPs usando polissacarídeos (tais como, celulose, quitosana, amido e derivados), por métodos aquosos diretos *in situ* em temperatura ambiente, sem exigir um agente de redução externo ou outro agente estabilizador, tem sido cada vez mais relatada na literatura<sup>(167-172)</sup>.

A CMC, sendo um biopolímero dependente do pH e com cadeias poliméricas variando em função de GS, pode ter grande influência na nucleação e crescimento de



AuNPs. Foram avaliados os parâmetros GS e pH, sendo a síntese utilizando CMC com GS de 0,77 e 1,22 e pH ácido ( $3,5 \pm 0,1$ ), neutro ( $7,5 \pm 0,1$ ) e alcalino ( $10,5 \pm 0,1$ ). As amostras sintetizadas com CMC GS 0,77 e GS 1,22, foram nomeadas de AuNPs@CMC-77 e AuNPs@CMC-122, respectivamente.

### 5.2.1 Avaliação da influência do GS na síntese de AuNPs estabilizadas por CMC

Inicialmente, o processo de síntese foi avaliado pela observação da dinâmica da reação com o tempo. Nas figuras 5.8 e 5.9 são apresentadas fotografias ilustrando o processo de síntese da amostra AuNPs@CMC-77 e AuNPs@CMC-122, respectivamente, em pH ( $7,0 \pm 0,5$ ). Como pode ser observado, a síntese ocorreu com diferentes dinâmicas para as duas amostras. A síntese utilizando CMC-77 apresenta uma rápida mudança de coloração ( $\sim 1,5$ h), indicando maior velocidade de redução dos íons de ouro. Por outro lado, a síntese utilizando CMC-122, apresentou uma redução dos íons de ouro mais lenta, resultando em várias horas do processo de síntese ( $\sim 10$ h). Isso pode ser justificado analisando a interação entre a CMC e os íons de ouro ( $\text{Au}^{+3}$ ). O processo de síntese segue o mecanismo ilustrado na figura 5.10. Nesta reação, os grupos hidroxila (-OH) da CMC atuam como agente redutor, reduzindo os íons de ouro ( $\text{Au}^{+3}$ ) para átomos de ouro neutros ( $\text{Au}^0$ ), permitindo assim o crescimento de AuNPs. A interação dos grupos carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ) da CMC com as AuNPs crescidas, faz o polímero atuar como agente de estabilização, garantindo a estabilidade da dispersão coloidal. A CMC-77 é mais abundante em grupos hidroxila (-OH), resultando em uma maior quantidade de sítios de redução e, conseqüentemente, uma rápida redução do ouro. Com o aumento do grau de substituição, ocorre uma redução da quantidade de hidroxilas (-OH) disponíveis para redução do ouro, resultando em um processo mais lento.

A dissolução da CMC em água em pH próximo a 7, provoca a desprotonação dos grupos carboxila (-COOH) formando carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ). Quando é adicionado o ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), este se dissolve nos íons  $[\text{Au}^{3+}\text{Cl}_4^-]$  e  $\text{H}^+$ , abaixando o pH da solução. Com o aquecimento acontece a reação entre a CMC e o ouro, onde os grupos hidroxila (-OH) da CMC atuam como agente redutor, reduzindo os íons de ouro ( $\text{Au}^{+3}$ ) para átomos de ouro neutros ( $\text{Au}^0$ ), permitindo o crescimento de AuNPs. A

interação eletrostática entre os grupos carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ) com a superfície das AuNPs gera uma força de atração do tipo adsorção intermolecular  $\text{COO}-\text{Au}$ , com uma força típica de  $2 \text{ kcal/mol}$  <sup>(173-174)</sup>, garantindo a estabilidade da dispersão coloidal.

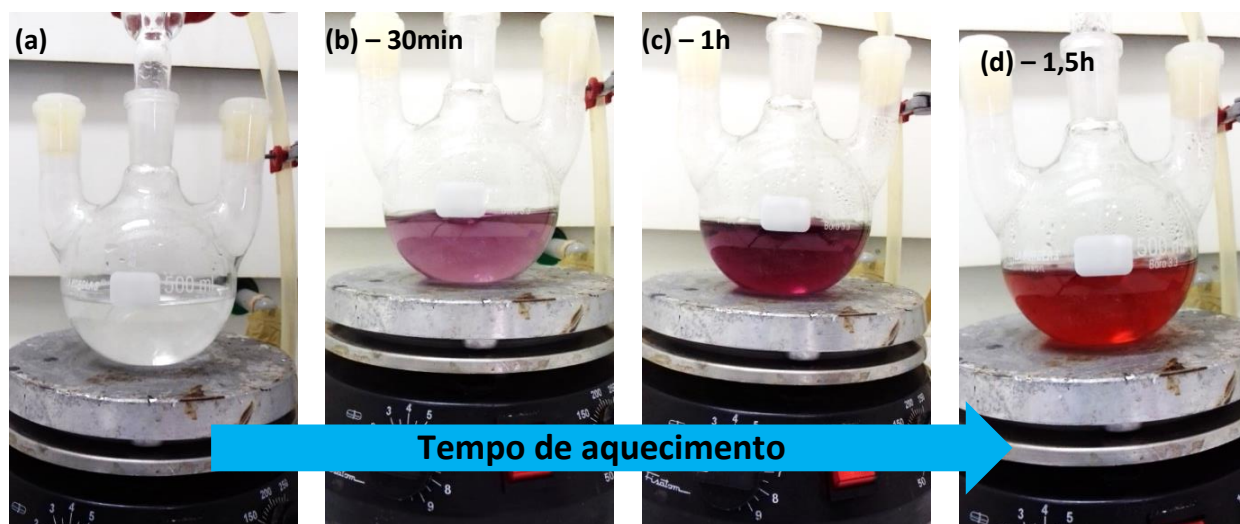


Figura 5.8 - Fotografias mostrando o andamento do processo de síntese utilizando CMC-77. (a) Início do aquecimento, (b) 30min de aquecimento, (c) 1h de aquecimento, (d) 1,5h de aquecimento.

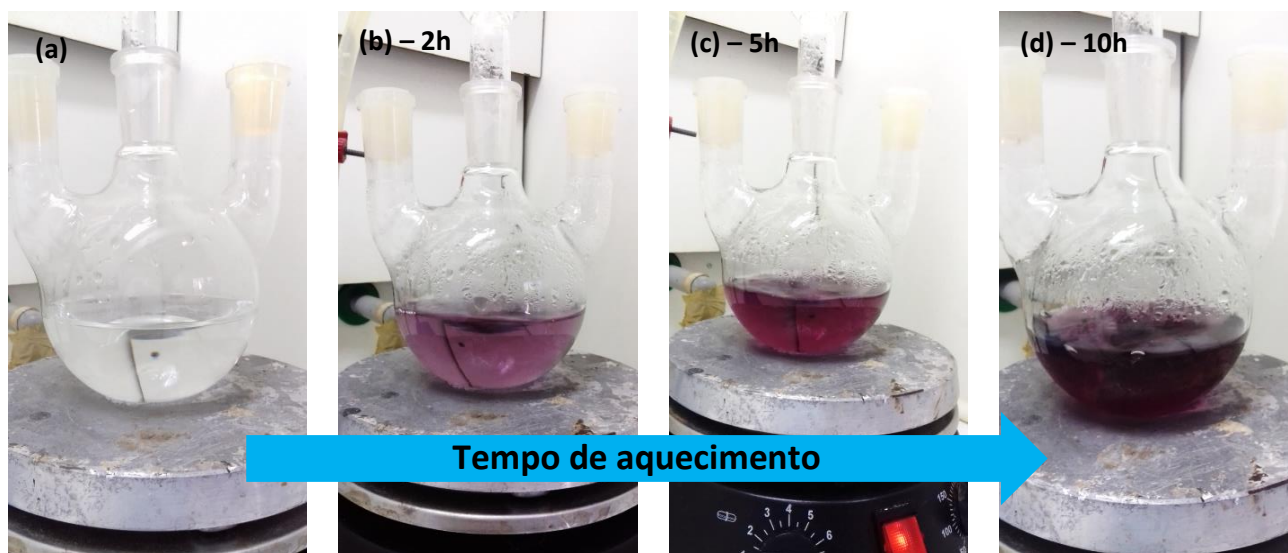


Figura 5.9 - Fotografias mostrando o andamento do processo de síntese utilizando CMC-122. (a) Início do aquecimento, (b) 2h de aquecimento, (c) 5h de aquecimento, (d) 10h de aquecimento.

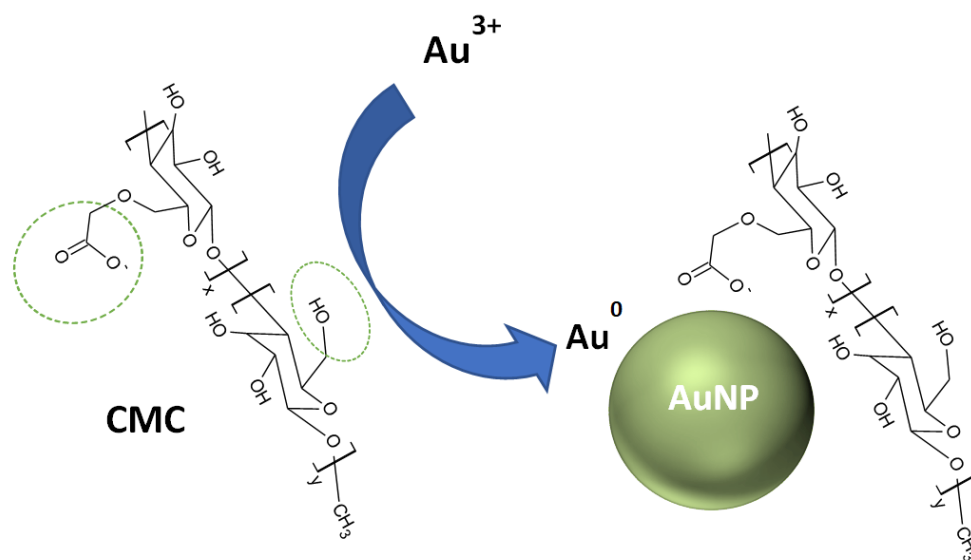


Figura 5.10 - Ilustração do mecanismo de síntese de AuNPs utilizando CMC simultaneamente como agente redutor e agente de estabilização.

### 5.2.2 Caracterização das AuNPs@CMC por espectroscopia UV-Vis

A caracterização óptica foi realizada por espectroscopia UV-Vis. Na figura 5.11 estão apresentados os resultados das medidas de cinética de crescimento das AuNPs utilizando CMC-77. Os espectros são referentes à (a) CMC pura, e (b), (c), (d) e (e) para o processo de síntese com 1h, 2h, 3h e 4h de reação, respectivamente.

A região compreendida entre 450 e 600 nm, apresenta absorção centrada em 520nm devido à absorção de energia causada pela oscilação coletiva dos elétrons de condução na superfície das AuNPs@CMC. Essa oscilação dos elétrons de condução é causada pelas pequenas dimensões das nanoestruturas metálicas, menor que o comprimento de onda de excitação. Nesta condição, o campo elétrico será uniforme em torno das nanopartículas, sendo induzido um deslocamento uniforme da densidade eletrônica e uma forte força de restauração em relação aos núcleos positivos, resultando em uma oscilação característica dos elétrons de condução, fenômeno conhecido como ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR) <sup>(25-27)</sup>.

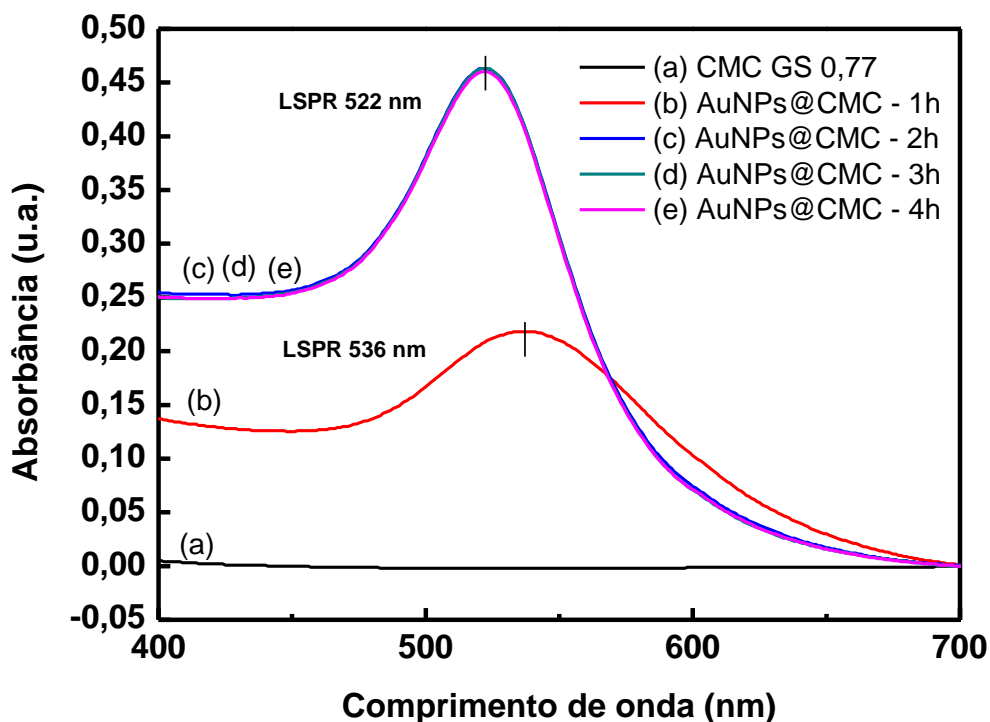


Figura 5.11 - Espectros UV-Vis para as medidas de cinética de crescimento das AuNPs na amostra AuNPs@CMC-77. (a) CMC-77, (b) AuNPs@CMC 1h, (c) AuNPs@CMC 2h, (d) AuNPs@CMC 3h, (e) AuNPs@CMC 4h.

Na figura 5.11, a medida com uma hora (b) resultou em um espectro muito alargado e com pico de ressonância em 536nm típico de nanopartículas com maiores dimensões ou aglomerados, sendo explicado principalmente pela presença de largos clusters no processo de nucleação e crescimento das nanopartículas <sup>(6-7)</sup>. Neste estado, as AuNPs ainda não têm a morfologia esférica completamente formada, provocando uma não uniformidade na oscilação da densidade de carga, devido a isso, o espectro de energia sofre um deslocamento para o vermelho. Isso pode ser explicado ainda não formação das AuNPs e pela morfologia ainda não completamente esférica nesta etapa do processo de nucleação e crescimento. Como observado, o processo de crescimento tem duração de cerca de 2 horas, não sendo mais observadas mudanças no espectro. Após o crescimento completo das AuNPs@CMC elas apresentam o pico de absorção máximo em 522nm, o que comprova a presença das AuNPs@CMC na dispersão coloidal. Esse pico de absorção óptica é devido às oscilações coletivas dos elétrons de condução na superfície das AuNPs (LSPR).

Na figura 5.12 é apresentado o resultado das medidas de cinética de crescimento das AuNPs utilizando CMC-122. Nesta figura, pode ser observado que a medida com uma hora (a) resultou em um espectro muito alargado e com pico de ressonância em 547nm. Da mesma forma que na amostra com CMC-77, esse alargamento é típico de nanopartículas grandes ou aglomerados, sendo explicado principalmente pela presença de largos clusters no processo de formação das nanopartículas. Porém, neste processo de síntese foi observado que a dinâmica de crescimento é significativamente mais lenta, quando comparada com a amostra com CMC-77, sendo que após 10 horas (g) de aquecimento, a pico das AuNPs@CMC se manteve em 537nm, indicando AuNPs não perfeitamente esféricas e/ou uma distribuição irregular de morfologias e tamanhos (6,14,50,83).

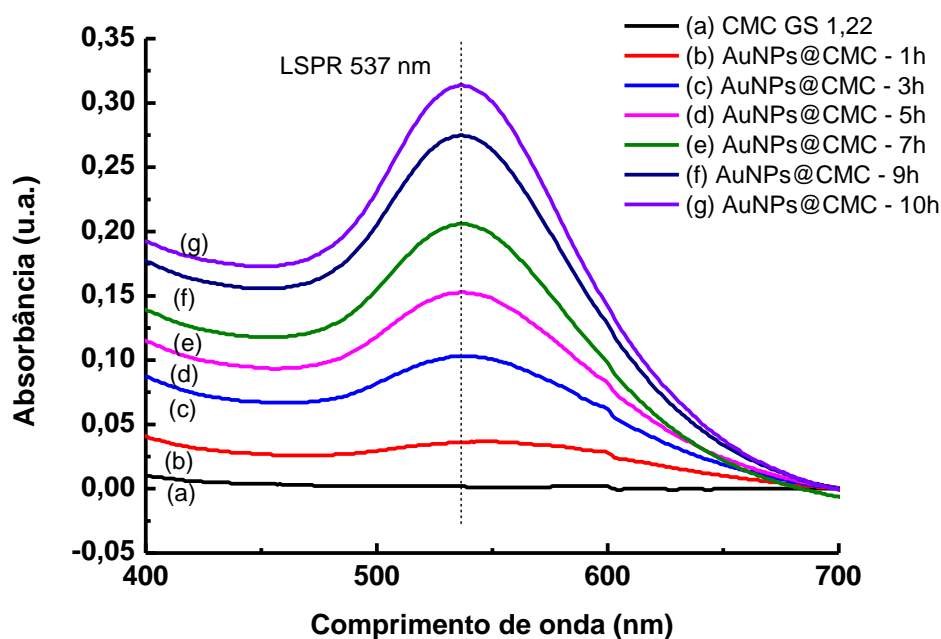


Figura 5.12 - Espectros UV-Vis para as medidas de cinética de crescimento das AuNPs na amostra AuNPs@CMC-122. (a) CMC-122, (b) AuNPs@CMC 1h, (c) AuNPs@CMC 3h, (d) AuNPs@CMC 5h, (e) AuNPs@CMC 7h, (f) AuNPs@CMC 9h, (g) AuNPs@CMC 10h.

O espectro UV-Vis foi utilizado para estimar o diâmetro, a concentração e a densidade de nanopartículas na dispersão coloidal, aplicando a metodologia proposta por Haiss *et al* <sup>(175)</sup>. Neste estudo os autores sistematicamente estudaram a dependência

do diâmetro das AuNPs com a taxa entre a absorvância na ressonância de plasmon ( $A_{LSPR}$ ) e na absorvância em 450nm ( $A_{450}$ ), e a relação entre a absorvância e a concentração inicial de ouro, derivando a equação 5.2 para o diâmetro médio, onde as constantes foram determinadas teórica e experimentalmente como sendo,  $B_1 = 3,55$  e  $B_2 = 3,11$

$$d = e^{(B_1 \frac{A_{SPR}}{A_{450}} - B_2)} \quad (5.2)$$

Já a expressão para a concentração é derivada da lei de Beer-Lambert, sendo bem conhecido e tabelado os valores para o coeficiente de absorvidade molar de AuNPs na absorvância de 450nm<sup>(175)</sup>. O cálculo da concentração pode ser realizado pela equação 5.3, para um caminho óptico de 10mm.

$$c = \frac{A_{450}}{\epsilon_{450}} \quad (5.3)$$

Os resultados estão apresentados na tabela 5.2. Conforme os resultados calculados, as AuNPs na amostra AuNPs@CMC-122 têm em média ( $17,0 \pm 2,0$ )nm de diâmetro, com uma concentração de ( $0,53 \pm 0,05$ )nM para uma densidade de nanopartículas de  $1,35 \times 10^{10}$  partículas por  $\text{cm}^3$ , sendo que a amostra AuNPs@CMC-77 as AuNPs têm em média ( $24,5 \pm 2,5$ )nm de diâmetro, com uma concentração de ( $0,17 \pm 0,01$ )nM para uma densidade de nanopartículas de  $0,80 \times 10^{10}$  partículas por  $\text{cm}^3$ .

<b>Tabela 5.2 - Diâmetro, concentração e densidade de nanopartículas na dispersão coloidal calculados pelo espectro UV-Vis</b>		
	AuNPs@CMC-122	AuNPs@CMC-77
Diâmetro das AuNPs (nm)	$17,0 \pm 2,0$	$24,5 \pm 2,5$
Concentração de AuNPs (nM)	$0,53 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,01$
Densidade de AuNPs (partículas por $\text{cm}^3$ )	$13,5 \times 10^{11}$	$8,0 \times 10^{11}$

Como observado nos espectros e nos valores calculados, as duas amostras são diferentes em relação às medidas de espectroscopia UV-Vis. Essa diferença está associada, principalmente, a velocidade de redução dos íons de ouro ( $\text{Au}^{3+}$ ).

### 5.2.3 Caracterização da carga superficial por medidas de potencial Zeta (ZP).

A carga superficial das AuNPs foi caracterizada por medidas de potencial Zeta (ZP) e os resultados estão resumidos na tabela 5.3. Em  $\text{pH} > \text{pK}_a$ , os grupos carboxila (COOH) da CMC estão desprotonados, originando os grupos carboxilato ( $\text{COO}^-$ ). A interação destes grupos com a superfície das AuNPs gera uma força de atração do tipo adsorção intermolecular  $\text{COO}-\text{Au}$ . Os grupos carboxilato ( $\text{COO}^-$ ), não interagentes com o ouro e disponíveis na superfície são responsáveis pelo aparecimento de uma carga negativa nas AuNPs. A medida de potencial zeta da dispersão coloidal das AuNPs da amostra AuNPs@CMC-122, apresenta uma carga negativa de  $\xi = - (62 \pm 1)\text{mV}$ , e na dispersão coloidal das AuNPs da amostra AuNPs@CMC-77, apresenta uma carga negativa de  $\xi = - (60 \pm 3)\text{mV}$ . A superfície das AuNPs@CMC em ambas as amostras têm carga negativa elevada, o que é um indicativo da cobertura de CMC. Como apresentado na figura 5.5 e na tabela 5.1, a carga da CMC-122 é menor que a carga da CMC-77, e isso se refletiu na carga da dispersão coloidal de AuNPs@CMC, com valores de ZP próximos devido ao maior consumo de  $\text{COO}^-$  nas amostras de AuNPs@CMC-122 pela interação com a superfície do ouro. Esse resultado é importante, porque essa carga superficial garante a estabilidade da dispersão coloidal e é um indicativo da disponibilidade de grupos carboxilato ( $\text{COO}^-$ ).

### 5.2.4 Caracterização do tamanho por medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O tamanho médio das partículas foi caracterizado por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e os resultados estão resumidos na tabela 5.3. O diâmetro médio medido por DLS da amostra AuNPs@CMC-122 foi de  $(22,7 \pm 1,5)\text{nm}$ , maior que o resultado obtido pelo espectro UV-Vis. Isso é devido ao fato de que o DLS determina o diâmetro hidrodinâmico ( $H_D$ ) das nanopartículas, sendo que como as AuNPs sintetizadas tem a cobertura de CMC, a interação desta camada com a água causa um maior  $H_D$  do que seria encontrado com AuNPs sem cobertura. Além disto, no espectro UV-Vis, a camada de CMC causa principalmente um deslocamento do comprimento de onda da ressonância plasmônica, tendo pouco efeito nos valores de absorbância que são utilizados nos cálculos de diâmetro. Esse resultado demonstra que as AuNPs estão na

faixa de tamanhos esperada, e, além disto, é um indicativo da presença da camada de CMC. O  $H_D$  medido por DLS da amostra AuNPs@CMC-77 foi de  $(92,5 \pm 1,5)$ nm, maior que o resultado obtido pelo espectro UV-Vis e maior que a amostra AuNPs@CMC-122. Como pode ser observado, as AuNPs na amostra sintetizada com CMC-77 apresentam um  $H_D$  médio maior que as sintetizadas com CMC de maior grau de substituição. Esse resultado corrobora com as medidas e conclusões feitas a partir dos resultados de espectroscopia UV-Vis. Porém, foi observado uma diferença significativa entre as duas estimativas, que pode ser explicada pela conformação da CMC na superfície das AuNPs. Com maior grau de substituição, existe uma maior interação entre as cadeias de CMC favorecendo um menor crescimento das AuNPs, ao mesmo tempo em que as cadeias ficam mais próximas da superfície do ouro, devido às interações eletrostáticas entre os grupos carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ) e os átomos de ouro. Nas AuNPs sintetizadas com CMC-77 existe uma menor interação entre as cadeias, permitindo que elas fiquem mais abertas na superfície do ouro, aumentando assim o  $H_D$  das AuNPs.

**Tabela 5.3 – Potencial zeta (mV) e  $H_D$  (nm)**

	AuNPs@CMC-122	AuNPs@CMC-77
ZP	$-62 \pm 1$	$-60 \pm 3$
DLS ( $H_D$ )	$22,7 \pm 1,5$	$92,5 \pm 1,5$

### 5.2.5 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As características morfológicas e estruturais foram caracterizadas por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e imagens de microscopia de força atômica (AFM), com estimativa da distribuição dos tamanhos das nanopartículas. A análise estrutural foi realizada por difração de elétrons por área selecionada (SAED), para verificar a cristalinidade das AuNPs. A caracterização química foi realizada por espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (EDS).

Nas figuras 5.13 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de transmissão e na figura 5.14 são apresentadas imagens de alta resolução e padrão SAED da amostra AuNPs@CMC-77, demonstrando a estrutura cristalina e o padrão em forma de anel, característica de AuNPs policristalinas. Estes anéis podem ser indexados nos planos (111), (200), (220) e (311) do ouro com célula unitária do tipo cúbica de face



centrada (cfc). Pelas imagens de MET é observado que as AuNPs@CMC sintetizadas têm morfologias aproximadamente esféricas e aproximadamente com distribuição de diâmetros homogênea. Na figura 5.15 é apresentada a distribuição de tamanhos aferida através de imagens de MET. O diâmetro médio medido foi  $20\pm 1\text{nm}$ , compatível com o esperado pelos resultados de UV-Vis. A figura 5.16 apresenta o resultado de EDS das AuNPs. Pelo espectro medido são observados os picos referentes ao ouro nas energias de  $\text{AuM}_\alpha - 2,1\text{keV}$ ,  $\text{AuM}_\beta - 2,2\text{keV}$ ,  $\text{AuL}_\alpha - 9,7\text{keV}$  e  $\text{AuL}_\beta - 11,4\text{keV}$ , que estão de acordo com os valores já publicados na literatura <sup>(82-83)</sup>.

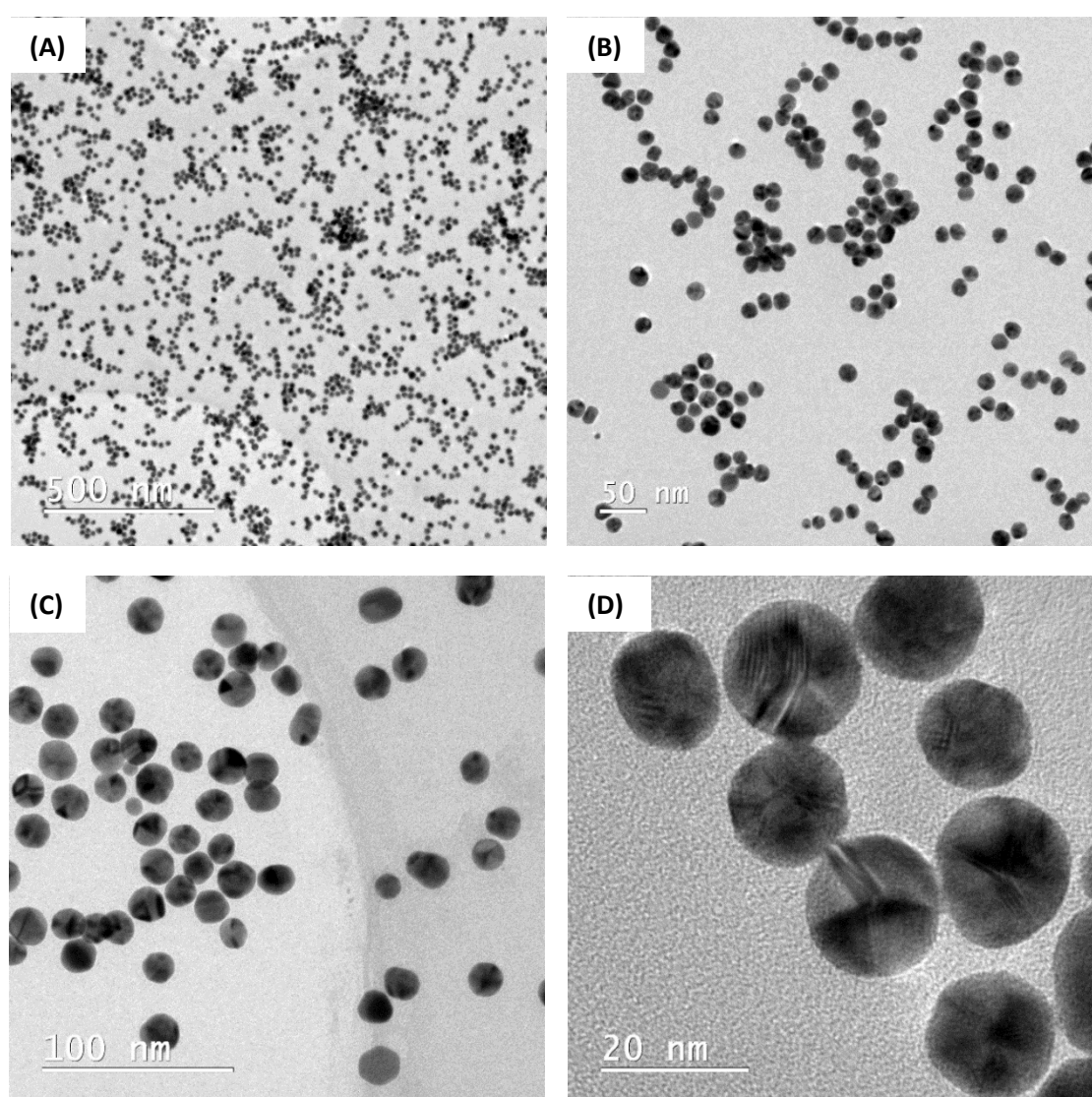


Figura 5.13 – (A-D) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de AuNPs@CMC-77 em diferentes magnificações.

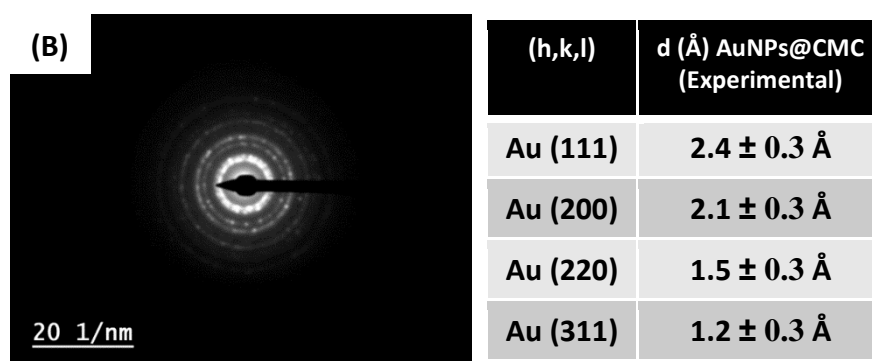
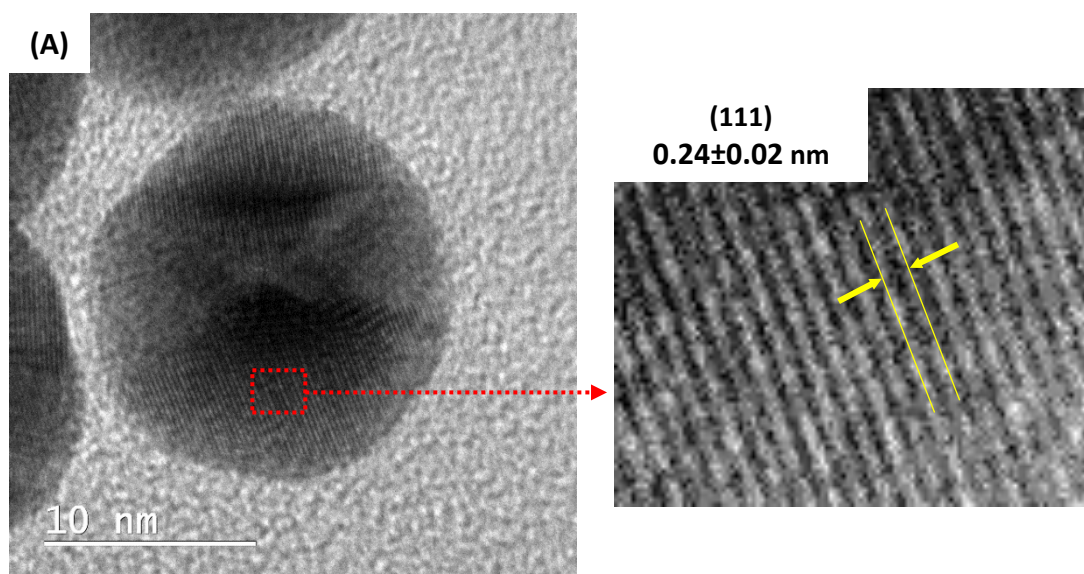


Figura 5.14 – (A) imagem de alta resolução de AuNPs@CMC-77, destacando medidas de distância interplanar e (B) imagem com padrão SAED e tabela de distâncias interplanares medidas.

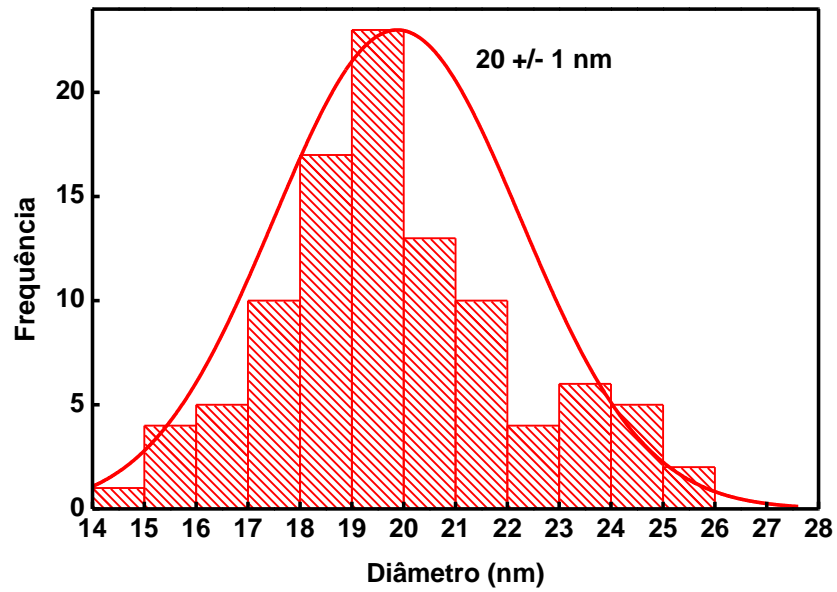


Figura 5.15 – Histograma de distribuição de tamanhos da amostra AuNPs@CMC-77 medido por MET.

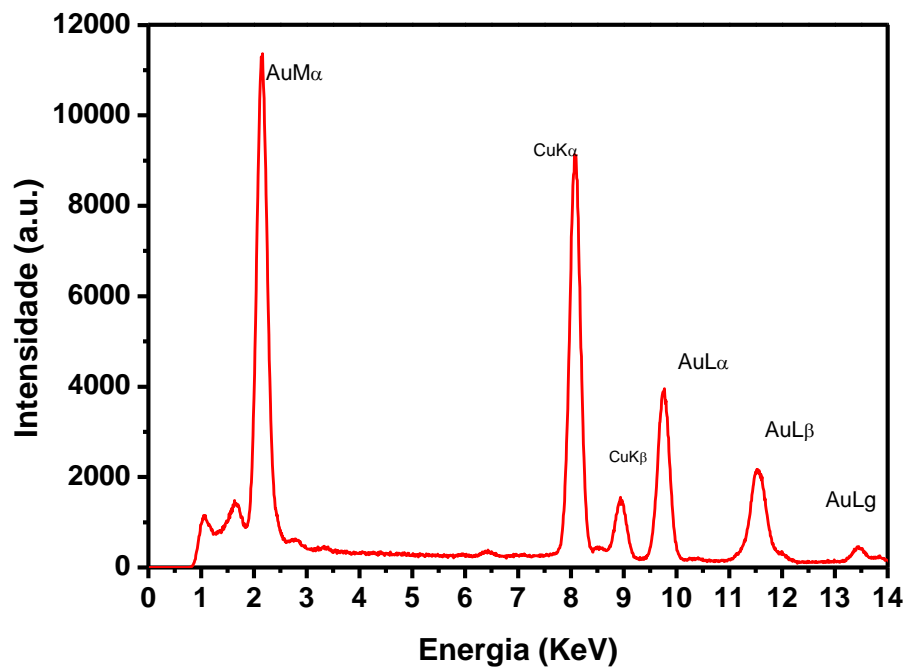


Figura 5.16 – Espectro de EDS das amostras de AuNPs@CMC-77

Nas figuras 5.17 são apresentadas as imagens de MET e na figura 5.18 são apresentadas imagens de alta resolução e padrão SAED da amostra AuNPs@CMC-122, demonstrando a estrutura cristalina e o padrão em forma de anel, característica de AuNPs policristalinas. A figura 5.19 mostra o padrão de difração para um grupo de AuNPs, demonstrando a estrutura em forma de anel, característica de nanopartículas de ouro policristalinas. Estes anéis podem ser indexados nos planos (111), (200), (220) e (311) do ouro com célula unitária do tipo cúbica de face centrada (cfc). A figura 5.20 apresenta o resultado de EDS onde foi observado os picos referentes ao ouro nas energias de  $AuM_{\alpha} - 2,1\text{keV}$ ,  $AuM_{\beta} - 2,2\text{keV}$ ,  $AuL_{\alpha} - 9,7\text{keV}$  e  $AuL_{\beta} - 11,4\text{keV}$  <sup>(82-83)</sup>. Como pode ser observado, AuNPs@CMC-122 apresentam maior distribuição de tamanhos e morfologias, quando comparado a AuNPs@CMC-77. Isso explica as diferenças observadas nas análises por UV-vis, sendo associado a maior substituição das cadeias de CMC, com efeito na nucleação e crescimento das AuNPs.

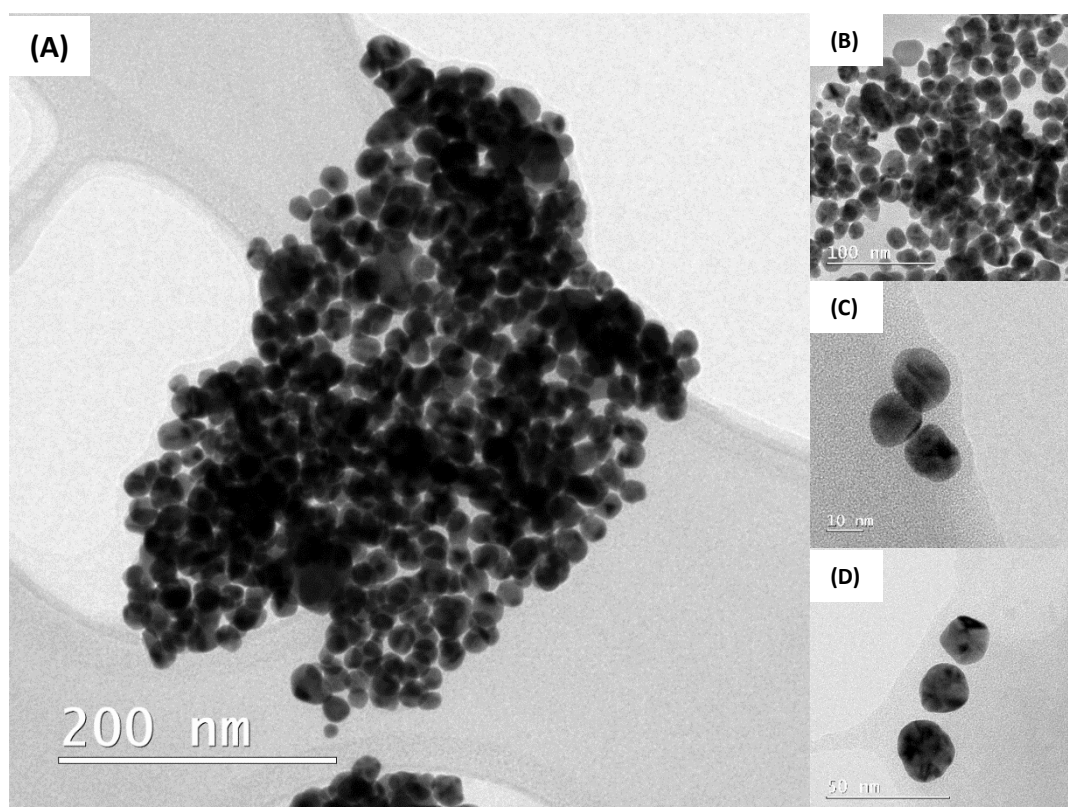


Figura 5.17 - (A-D) Imagens de MET de AuNPs@CMC-122 em diferentes magnificações.

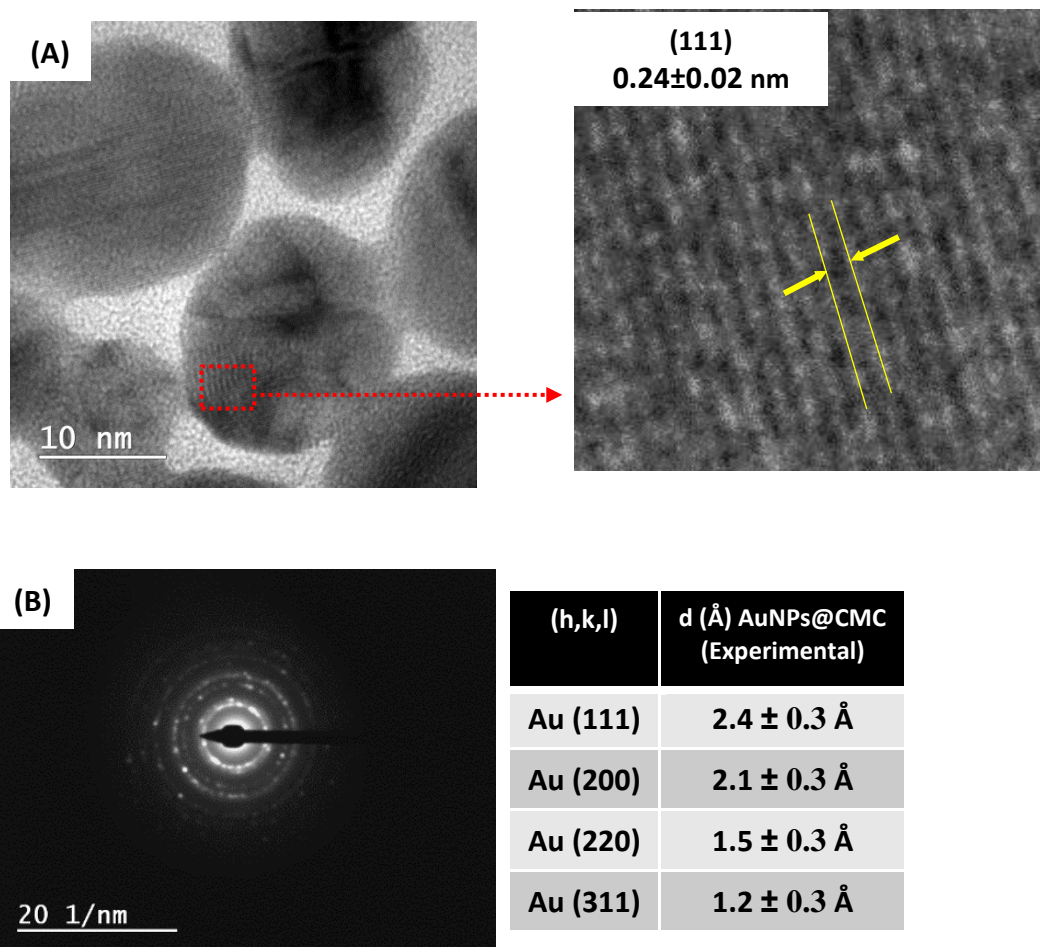


Figura 5.18 – (A) imagem de alta resolução de AuNPs@CMC-122, destacando medidas de distância interplanar e (B) imagem com padrão SAED e tabela de distâncias interplanares medidas.

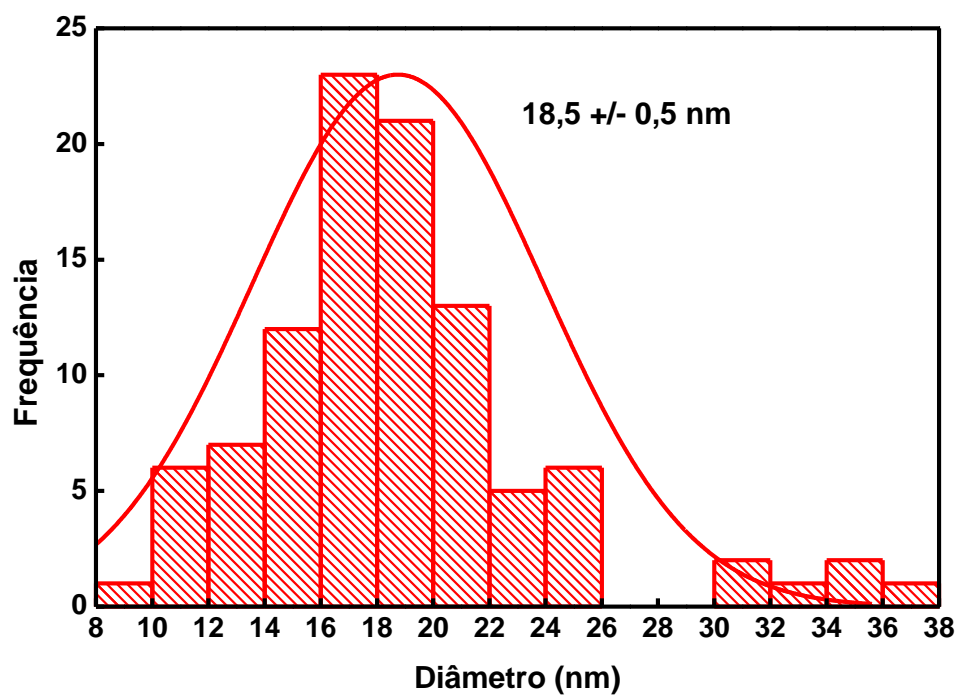


Figura 5.19 – Histograma de distribuição de tamanhos da amostra AuNPs@CMC-122 medido por MET.

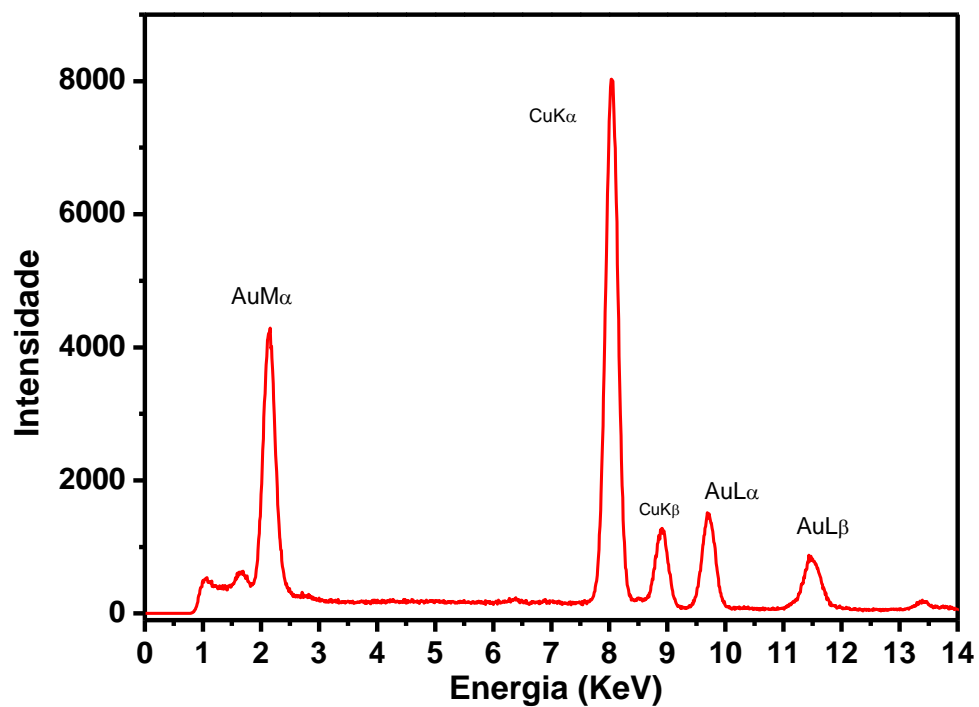


Figura 5.20 – Espectro de EDS da amostra AuNPs@CMC-122

### 5.2.6 Caracterização por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Pelas imagens de microscopia de força atômica (AFM) apresentadas na figura 5.21, para amostras AuNPs@CMC-122, foi observado uma polidispersão de tamanhos e morfologias, sendo que os diâmetros médios, medidos pela altura em Z, são da ordem de 12nm. Para a amostra AuNPs@CMC-77 as imagens são apresentadas na figura 5.22, onde foi observada morfologia aproximadamente esférica, com pouca distribuição de tamanhos, como já constatadas pelas imagens de MET, os diâmetros médios medidos pela altura em Z, são da ordem de 17nm (Fig. 5.22 (II)).

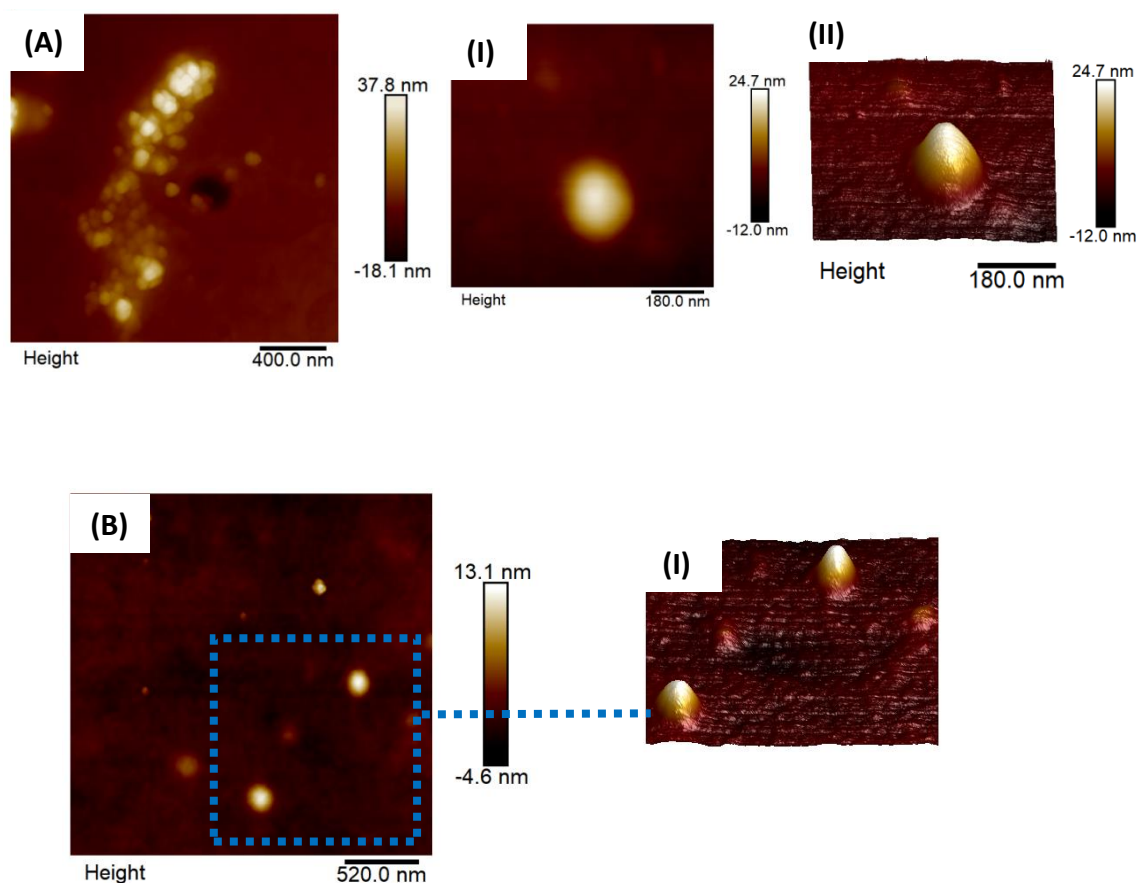


Figura 5.21 – (A-B) Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da amostra AuNPs@CMC-122 depositadas em uma superfície de mica.

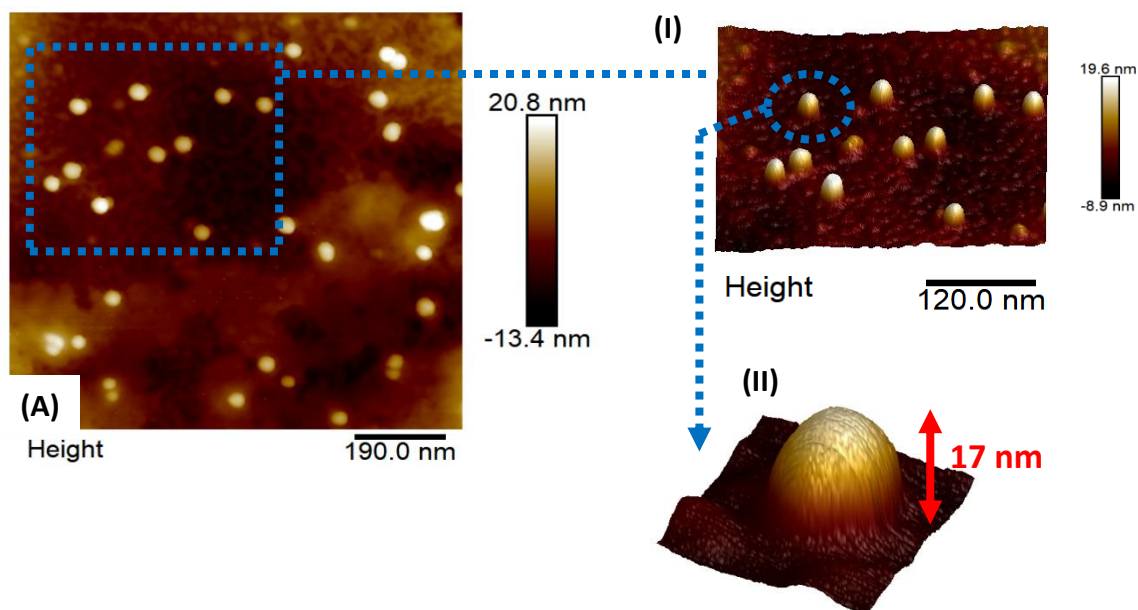


Figura 5.22 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da amostra AuNPs@CMC-77 depositadas em uma grid de MET.

### 5.2.7 Caracterização por Difração de Raios-X

A análise estrutural das AuNPs@CMC foi realizada por medidas de difração de raios-X, sendo comparada com trabalhos já reportados na literatura<sup>(176-178)</sup> e nas tabelas cristalográficas. Bart Goris *et al*<sup>(176)</sup> e Carbó-Argibay, E. *et al*<sup>(178)</sup> estudaram a estrutura atômica para o caso de AuNPs. AuNPs podem apresentar diversas organizações cristalográficas diferentes, sendo em geral são observados cinco picos de difração em nanoestruturas de ouro que podem ser indexados como (111), (200), (220), (311) e (222), com a estrutura cúbica de face centrada (cfc) sendo a mais comum. Mesmo sendo um material altamente cristalino, sua caracterização por difração de raios-X é dificultada devido a suas dimensões.

Na figura 5.23 é mostrado o resultado da difração de raios-X da amostra AuNPs@CMC-122, onde são observados picos correspondentes aos ângulos  $38,21^\circ$  ( $d=2,35\text{\AA}$ ),  $44,37^\circ$  ( $d=2,04\text{\AA}$ ),  $64,79^\circ$  ( $d=1,43\text{\AA}$ ) e  $77,59^\circ$  ( $d=1,22\text{\AA}$ ) que podem ser indexados como os planos (111), (200), (220) e (311) do ouro. No difratograma é ainda observado um pico alargado ( $\sim 25^\circ$ ) devido a componente amorfa da CMC. Os



difratogramas obtidos estão de acordo com as referências encontradas na literatura <sup>(176-178)</sup> e as tabelas cristalográficas (JCPDS 04-0784).

Adicionalmente o tamanho médio dos nanocristalitos de ouro foi determinado, para a amostra AuNPs@CMC-122, utilizando a fórmula de Debye-Scherrer (equação 5.4).

$$d = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (5.4)$$

Onde  $d$  é o tamanho do cristalito,  $\lambda$  comprimento de onda de da radiação de raios-X (1,54 angstroms (Cu-K $\alpha$ )),  $K$  é uma constante de valor 0,89,  $2\theta$  é o angulo de Bragg do pico Au (111) e  $\beta$  é a largura a meia altura, após a subtração do background do equipamento. O tamanho médio de cristalito de AuNPs foi determinado como sendo  $15,2\pm 0,2\text{nm}$ .

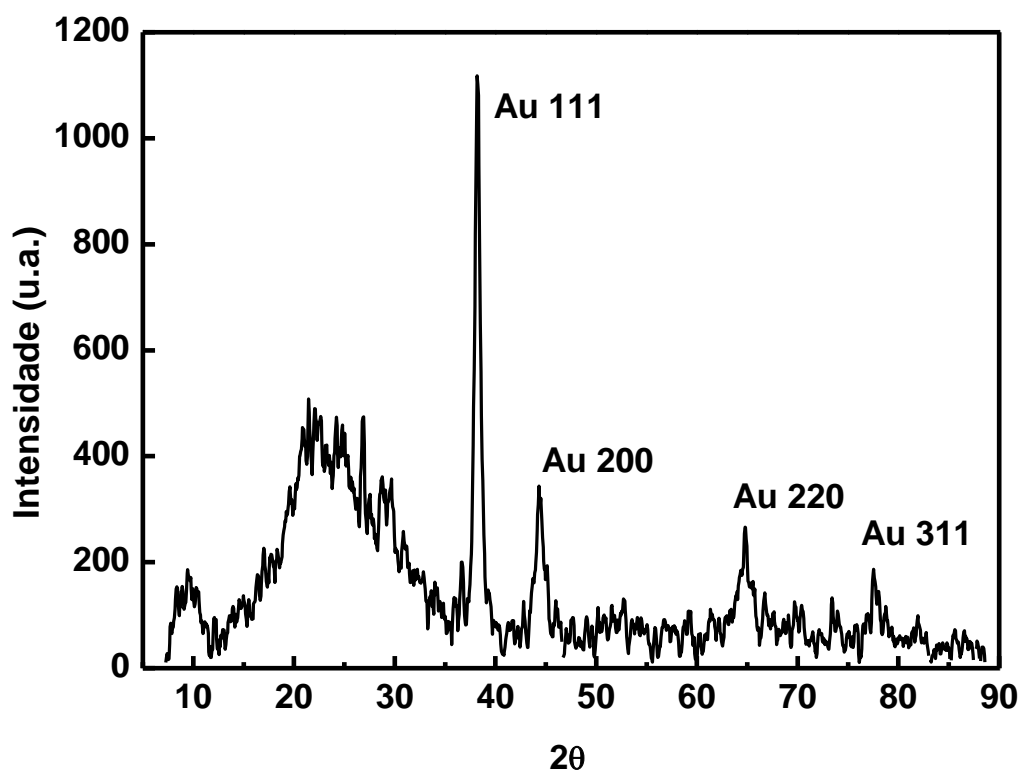


Figura 5.23 - Difratograma referente à amostra AuNPs@CMC-122

### 5.2.8 Caracterização por espectroscopia de infravermelho (FTIR).

A caracterização química superficial foi realizada para identificação da presença dos grupos carboxilatos na superfície das AuNPs, através da técnica de espectroscopia por transformada de Fourier por refletância difusa. Na figura 5.24a é apresentado o resultado da medida de CMC-77 pura, e na figura 5.24b o resultado da medida da amostra AuNPs@CMC-77. Como observado, na amostra de AuNPs foi encontrada uma larga banda compreendida entre 3650 e 3050 $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento O-H. Em torno de 2910 $\text{cm}^{-1}$  há uma banda que é atribuída ao estiramento do C-H. A deformação de estiramento assimétrico referente ao íon carboxilato  $\text{COO}^-$  está na região de 1600 $\text{cm}^{-1}$ . Em 1417 $\text{cm}^{-1}$  e 1325 $\text{cm}^{-1}$  encontram-se os estiramentos simétricos do carboxilato  $\text{COO}^-$  e a banda em 1060 $\text{cm}^{-1}$  é associada ao estiramento C-O do álcool secundário. Esse resultado está de acordo com a medida da CMC pura (figura 5.24a) (162).

Na figura 5.25a o resultado da medida de CMC-122, e na figura 5.25b o resultado da medida da amostra AuNPs@CMC-122. Como observado na figura, na amostra de AuNPs@CMC foi encontrada uma larga banda compreendida entre 3650 e 3050 $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento O-H. Em torno de 2930 $\text{cm}^{-1}$  está banda atribuída ao estiramento do C-H. A deformação de estiramento assimétrico referente ao íon carboxilato  $\text{COO}^-$  está na região de 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Em 1417 $\text{cm}^{-1}$  e 1325 $\text{cm}^{-1}$  encontram-se os estiramentos simétricos do carboxilato  $\text{COO}^-$  e a banda em 1062 $\text{cm}^{-1}$  é associada ao estiramento C-O do álcool secundário. Esse resultado está de acordo com a medida da CMC pura. Os resultados das medidas de espectroscopia de infravermelho em conjunto com os resultados de potencial zeta, confirmam a presença dos grupos carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) associados a CMC, na superfície das AuNPs.

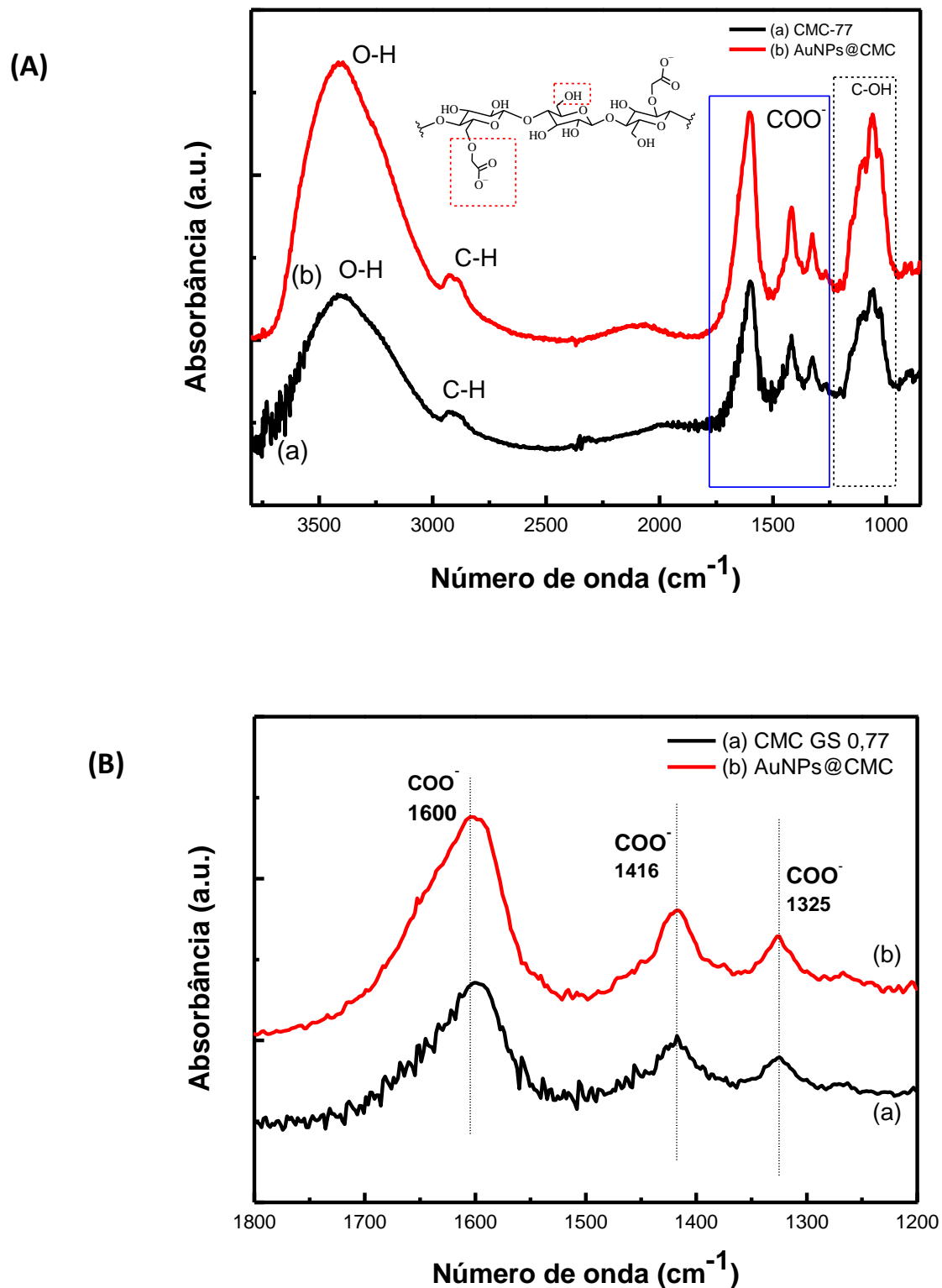


Figura 5.24 – (A) (a) Resultados das medidas de FTIR na amostra CMC-77 (b) e na amostra AuNPs@CMC-77. (B) Destaque da região 1800 a 1200 cm<sup>-1</sup> de (A).

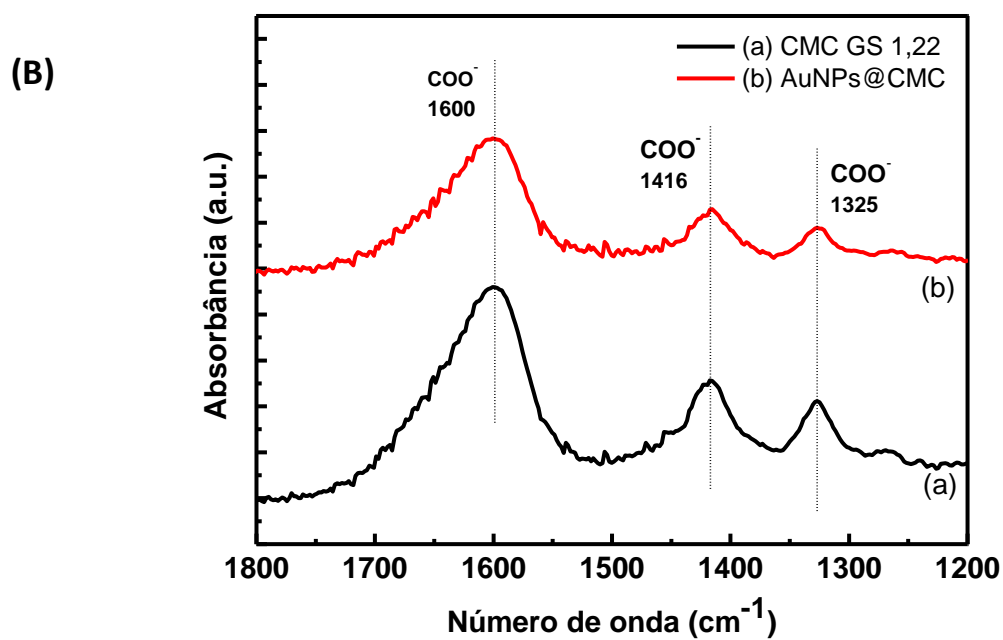
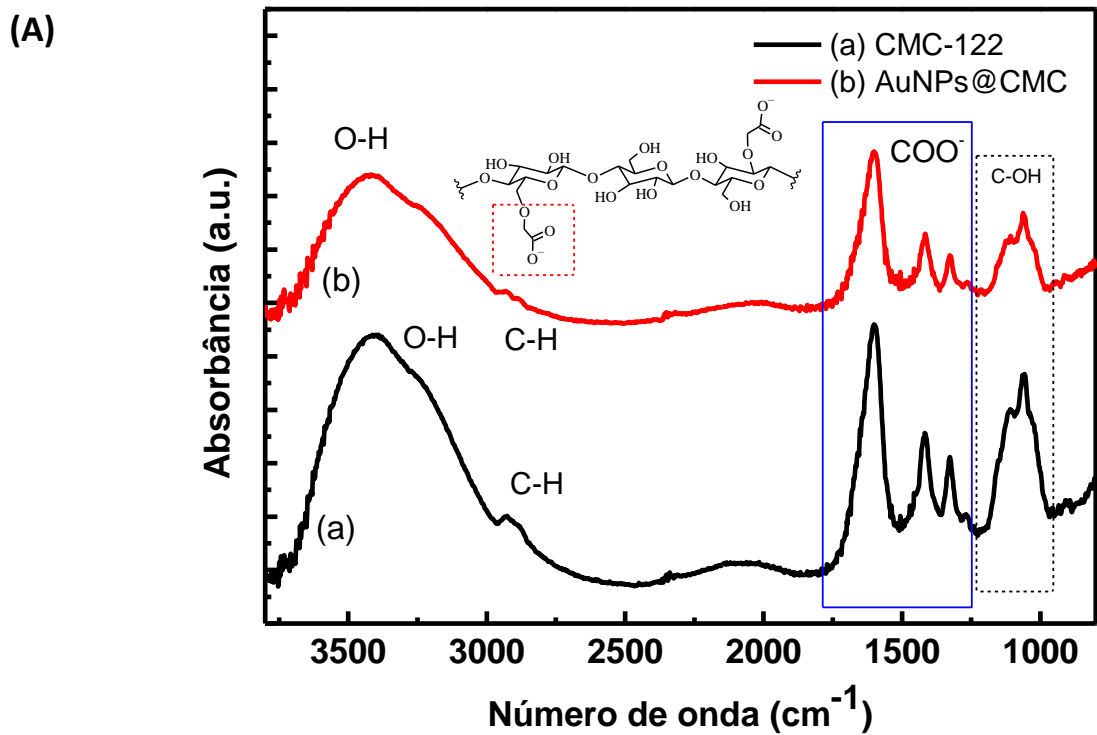


Figura 5.25 – (A) (a) Resultados das medidas de FTIR na CMC 1.22 pura (a) e na amostra AuNPs@CMC-122. (B) Destaque da região 1800 a 1200 cm<sup>-1</sup> de (A).

## 5.2.9 Avaliação da influência do pH na dispersão coloidal de AuNPs@CMC

Para a avaliação da influência do pH, foi utilizada a amostra de AuNPs sintetizadas com CMC de grau de substituição 0,77 (AuNPs@CMC-77). O pH da dispersão coloidal foi ajustado utilizando HCl (0,1M) e NaOH (0,1 M), sendo medidos valores de pH na faixa de 4 a 11. Em todos os valores de pH foram realizadas medidas de espectroscopia UV-Vis, para avaliação da influência do pH na absorbância, e por espalhamento dinâmico de luz (DLS), para avaliação do  $H_D$  e de potencial zeta, para determinação de sua carga superficial.

### 5.2.9.1 Influência do pH na absorbância das AuNPs

Na figura 5.26 são apresentados espectros de UV-Vis das AuNPs medidos na faixa de pH de 4 a 11. Como pode ser observado na figura, a variação do pH, na faixa selecionada, não provocou alterações nas medidas de LSPR das AuNPs, ou variação de intensidade de absorbância nas dispersões coloidais. Isso demonstra que a variação de concentrações de íons na solução e/ou nas características da cadeia polimérica de cobertura não tem influência no LSPR. Esse resultado demonstra que as nanopartículas são estáveis nesta faixa de pH, não sendo observada agregação ou alterações no valor de ressonância plasmônica.

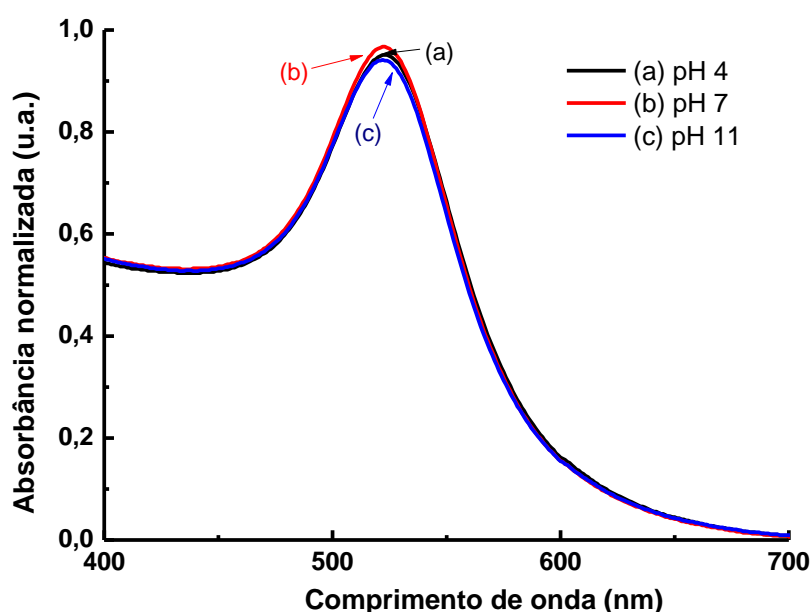


Figura 5.26 - Medidas de UV-Vis das AuNPs medidos na faixa de pH de 4 a 11

### 5.2.9.2 Influência do pH no diâmetro hidrodinâmico das AuNPs

O  $H_D$  foi caracterizado por DLS. Na figura 5.27 é a apresentado um gráfico com a variação do valor do  $H_D$  médio das AuNPs@CMC em função do pH da dispersão coloidal. Como pode ser observado, o  $H_D$  apresentou uma dependência com o valor do pH. Em pH 4, situação em que os grupos carboxilas da CMC estão protonados (COOH), o  $H_D$  das AuNPs@CMC apresentou um menor valor quando comparado a dispersão coloidal em  $pH > pK_a$ , associado a desprotonação dos carboxilatos (COO<sup>-</sup>/COOH). Esse resultado demonstra que o  $H_D$  das AuNPs é dependente do pH da dispersão coloidal, sendo explicado principalmente pela variação de conformação da CMC em torno das superfícies das AuNPs, com a mudança protonação/desprotonação dos carboxilatos (COO<sup>-</sup>/COOH).

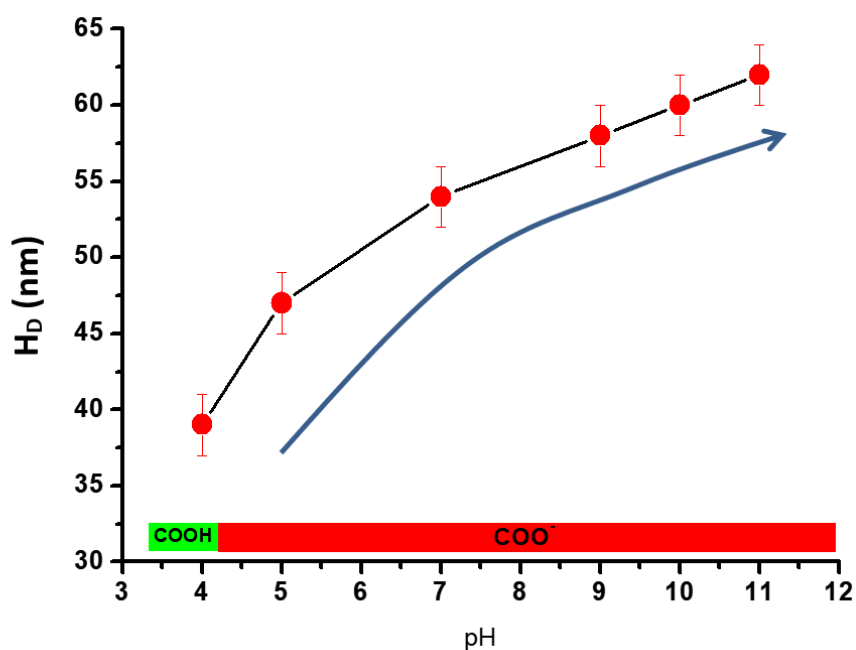


Figura 5.27 - Medidas de DLS na faixa de pH de 4 a 11, mostrando a variação do  $H_D$  das AuNPs em função do pH. (barra de erro: desvio padrão,  $n \geq 3$ )

### 5.2.9.3 Influência do pH na carga superficial das AuNPs

A carga superficial das AuNPs@CMC foi caracterizada por medidas de potencial Zeta (ZP). Na figura 5.28 são apresentados os resultados das medidas de potencial zeta das dispersões coloidais das AuNPs na faixa de pH de 4 a 10. Como pode ser observado, a carga superficial das soluções coloidal de AuNPs@CMC tem tendência a diminuir com a diminuição do pH, devido a protonação dos carboxilatos ( $\text{COO}^-$  /  $\text{COOH}$ ). Em pH 4 ( $\text{pH} < \text{pKa}$ ), situação em que os grupos carboxilas da CMC estão protonados ( $\text{COOH}$ ), a carga superficial apresentou um valor mínimo de  $-35 \pm 2 \text{ mV}$ . A carga superficial, contudo, fica mais negativa com o aumento do pH devido à desprotonação dos grupos carboxilas, originando os grupos carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ), atingido o valor de  $-65 \pm 2 \text{ mV}$  em pH alcalino  $\text{pH} = 10$ .

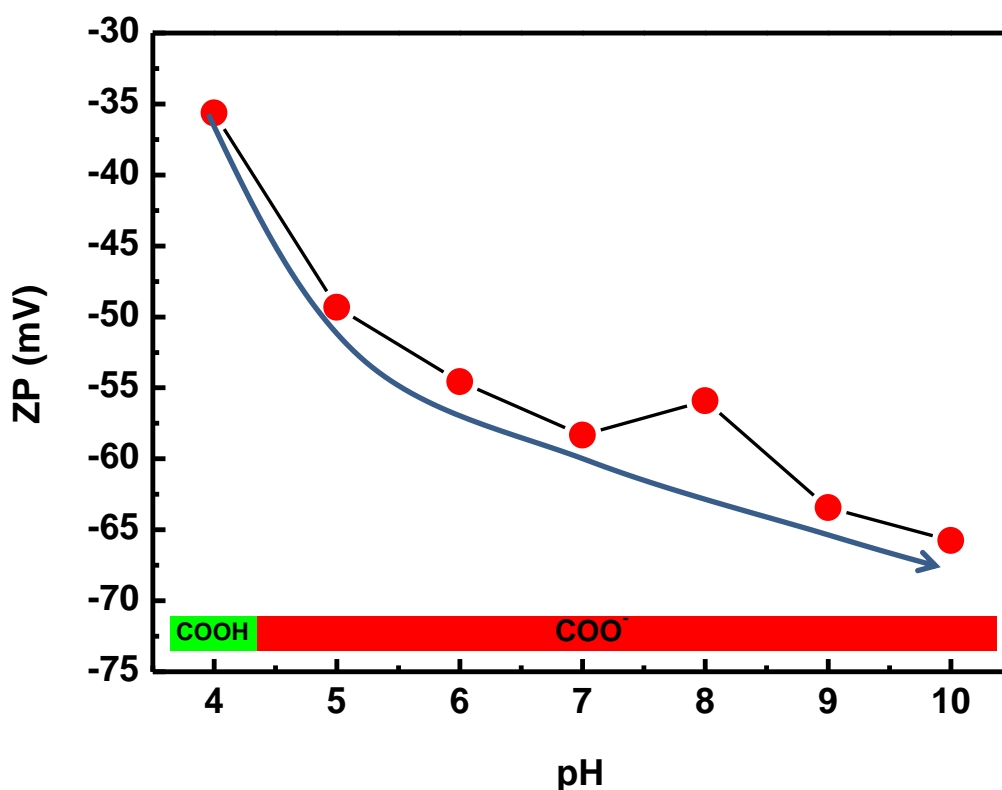


Figura 5.28 - Medidas de potencial zeta na faixa de pH de 4 a 10, mostrando a variação da carga superficial das AuNPs em função do pH.

### 5.2.10 Influência do pH na nucleação e crescimento de AuNPs@CMC.

Para avaliar a influência do pH na nucleação e crescimento das AuNPs, foi realizada a síntese em três diferentes valores de pH. Como parâmetro foi utilizado a valores de pKa da CMC, determinado por titulação potenciométrica como sendo  $(4,3 \pm 0,1)$  (CMC-77), abaixo deste valor os ácidos carboxílicos da CMC estão protonados (COOH), e acima são desprotonados, originando os grupos carboxilatos (COO<sup>-</sup>). Foram escolhidos os valores de pH de  $(3,5 \pm 0,1)$  (pH < pHa, ácido),  $(7,5 \pm 0,1)$  (pH > pHa, neutro) e  $(10,5 \pm 0,1)$  (pH > pHa, alcalino). Na figura 5.29 é apresentada uma foto das dispersões coloidais resultante da síntese nestes valores de pH. A síntese realizada em pH  $(3,5 \pm 0,1)$ , abaixo do pKa, apresentou um resultado completamente diferentes dos outros valores de pH, associado protonação dos carboxilatos (COOH), com diminuição da carga superficial e, conseqüentemente, a interação entre a CMC e os íons de ouro, fato que afeta a dinâmica de nucleação e crescimento das AuNPs. Isso pode ter causado um crescimento anormal das nanopartículas e/ou uma morfologia diferente da esférica.

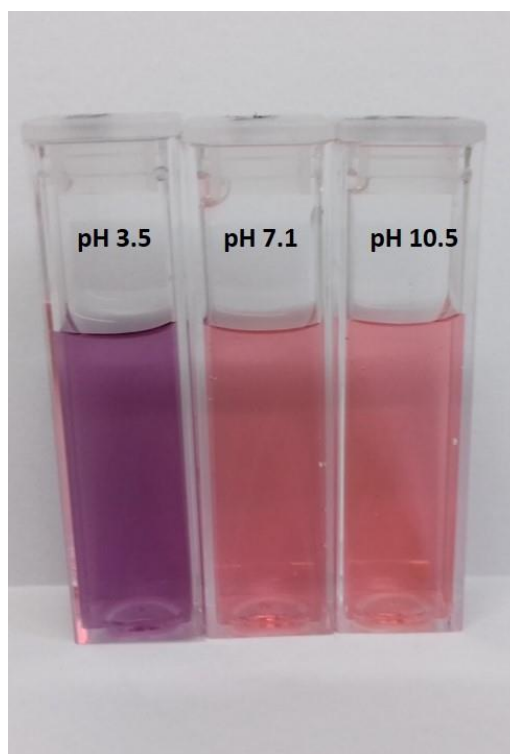


Figura 5.29 - Foto das dispersões coloidais resultante da síntese em diferentes valores de pH.



Nas figuras 5.30, 5.31 e 5.32 estão apresentados os resultados das medidas de espectroscopia UV-Vis da cinética química da síntese nos pHs ( $3,5 \pm 0,1$ ), ( $7,5 \pm 0,1$ ) e ( $10,5 \pm 0,1$ ), respectivamente. Como observado nestes resultados, a síntese em pH ( $3,5 \pm 0,1$ ) resultou em espectros largos e com ressonância de plasmons muito deslocada para o vermelho ( $\sim 544\text{nm}$ ), indicando que as AuNPs@CMC não são perfeitamente esféricas. Já a síntese em pH ( $7,5 \pm 0,1$ ) e ( $10,5 \pm 0,1$ ) apresentou espectros estreitos e com ressonância plasmônica em torno de  $522\text{nm}$ , o que indica AuNPs de excelente qualidade e aproximadamente esféricas. A síntese em pH ( $10,5 \pm 0,1$ ) apresentou uma dinâmica significativamente mais rápida, sendo a condição de síntese ideal para as AuNPs@CMC.

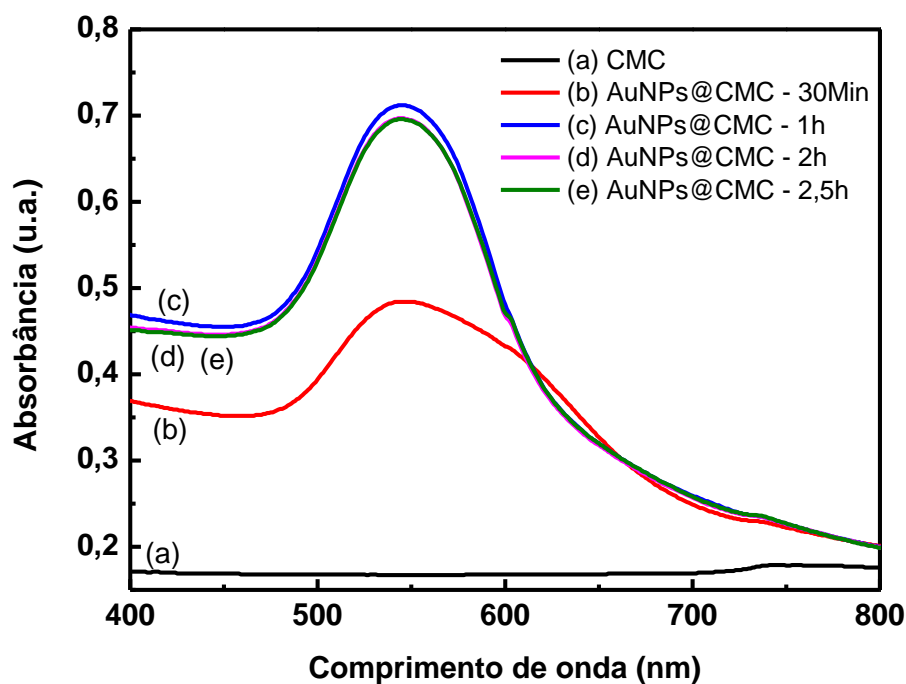


Figura 5.30 - Resultados de espectroscopia UV-Vis da dinâmica de crescimento das AuNPs em pH ( $3,5 \pm 0,1$ ).

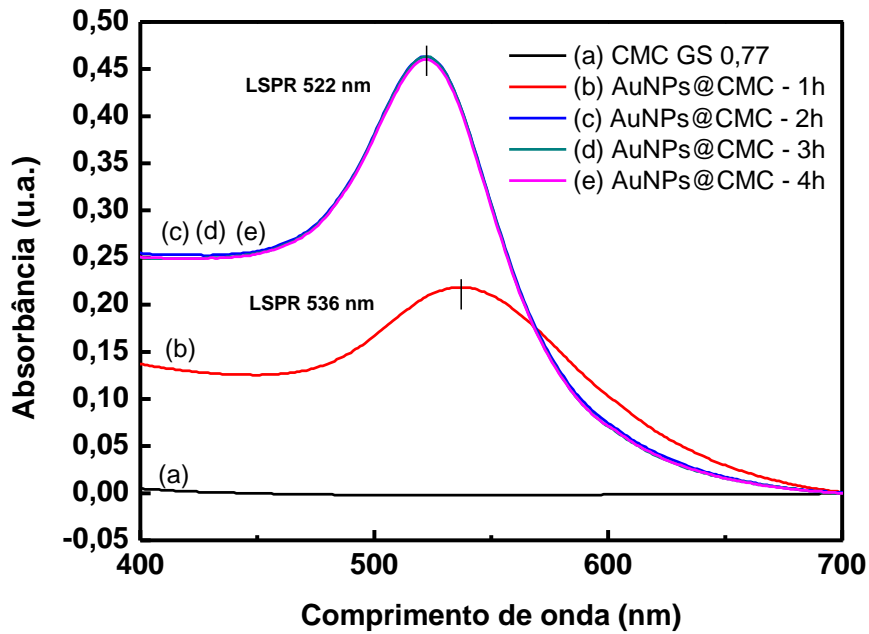


Figura 5.31 - Resultados de espectroscopia UV-Vis da dinâmica de crescimento das AuNPs em pH ( $7,1 \pm 0,1$ ).

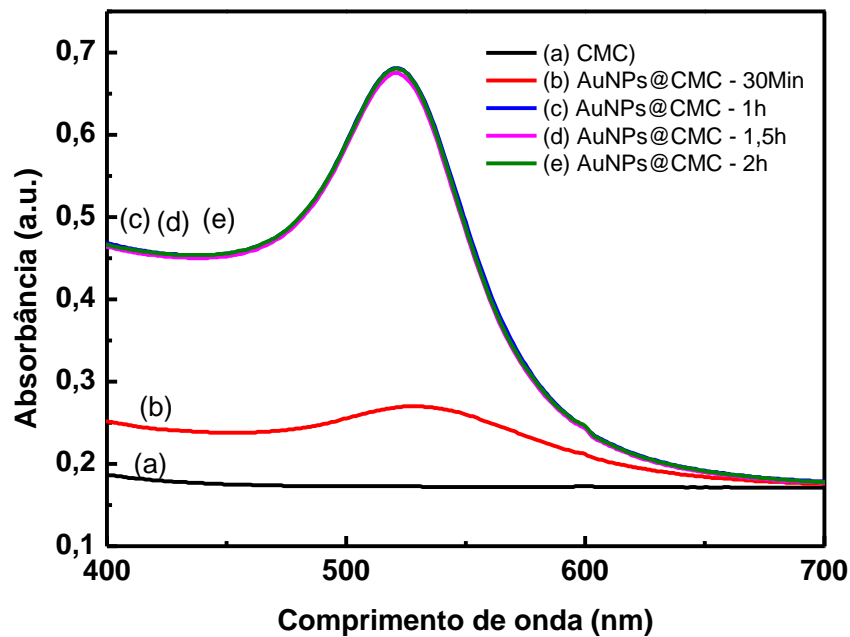


Figura 5.32 - Resultados de espectroscopia UV-Vis da dinâmica de crescimento das AuNPs em pH ( $10,5 \pm 0,1$ ).

Na figura 5.33 é apresentada uma comparação dos resultados no tempo de 2 horas. Como observado, a dispersão coloidal de AuNPs apresenta características de

absorbância completamente diferentes quando sintetizadas em meio ácido, neutro e alcalino. Essa diferença é devido à protonação ou desprotonação dos grupos carboxila da CMC.

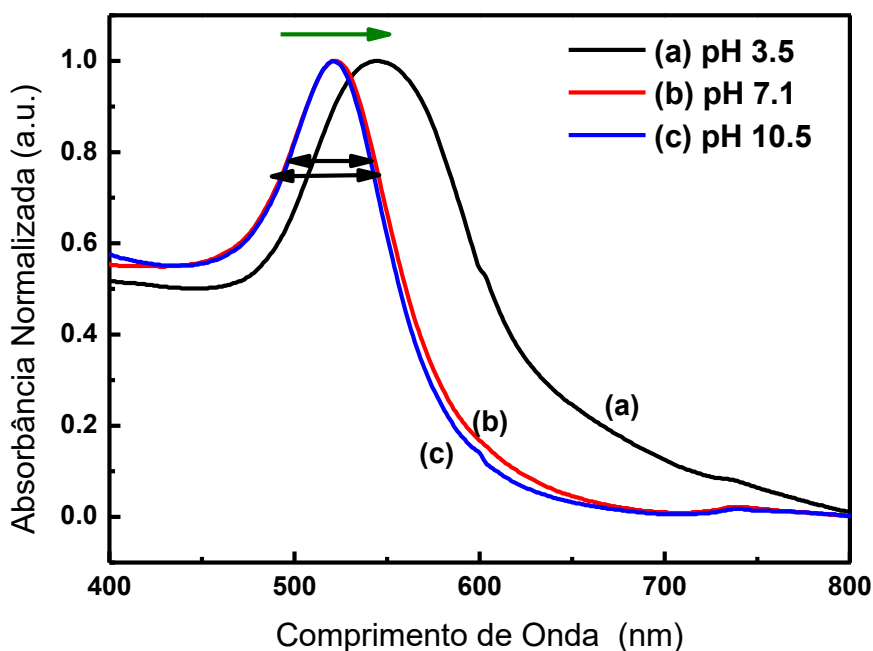


Figura 5.33 - Resultados de espectroscopia UV-Vis normalizados de AuNPs em três diferentes valores de pH. (a)  $(3,5 \pm 0,1)$ , (b)  $(7,5 \pm 0,1)$ , e (c)  $(10,5 \pm 0,1)$ .

Para avaliar o efeito do pH nas propriedades das AuNPs sintetizadas em diferentes valores de pH, foram realizadas medidas de potencial zeta e DLS. Na figura 5.34 é apresentado a comparação dos resultados de carga superficial para os três diferentes valores de pH de síntese. Como observado, a menor carga superficial foi encontrada na síntese em pH  $(3,5 \pm 0,1)$ , isso já era esperado observando que neste pH as carboxilas estão protonadas, resultando em uma diminuição da carga da CMC e ainda uma menor interação com a superfície das AuNPs@CMC.

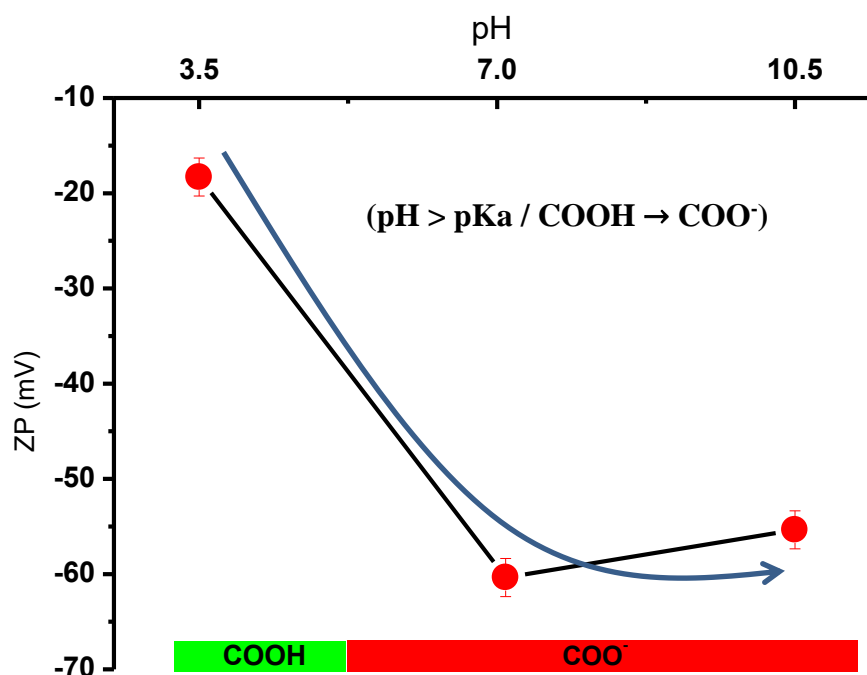


Figura 5.34 - Resultados de potencial zeta apresentado os valores de carga superficial para a síntese em três diferentes valores de pH. (barra de erro: desvio padrão,  $n \geq 10$ ).

Na figura 5.35 é apresentado a comparação dos resultados de  $H_D$  para os três diferentes valores de pH de síntese. Como observado, o menor  $H_D$  foi encontrado na síntese em pH ( $3,5 \pm 0,1$ ), isso já era esperado observando que neste pH as carboxilas estão protonadas, resultando em uma conformação fechada das cadeias de CMC, nos outros pHs a maior carga superficial resulta em maior separação entre as cadeias e, conseqüentemente, maiores valores de  $H_D$ .

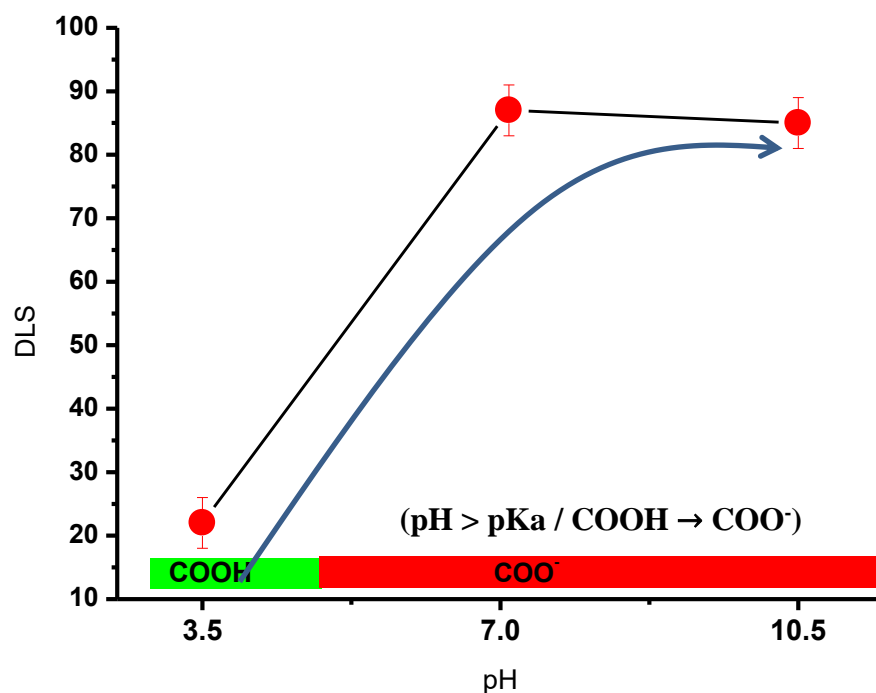


Figura 5.35 - Resultados de DLS apresentado os valores de  $H_D$  para a síntese em três diferentes valores de pH. (barra de erro: desvio padrão,  $n \geq 3$ ).

Na figura 5.36 são apresentadas as imagens de MET para síntese em (a) pH 3,5, (b) pH 7,1 e (c) pH 10,5, respectivamente, utilizando CMC-77. Como pode ser observado, as AuNPs@CMC sintetizadas em pH neutro e alcalino apresentam morfologia esférica, com distribuição de tamanhos uniformes. Por outro lado, as amostras sintetizadas em pH ácido, apresenta em sua maioria, AuNPs@CMC anisotrópicas e com significativa distribuição de tamanhos e geometrias. Esses resultados confirma a influência da protonação/desprotonação sobre o mecanismo de nucleação e crescimento das AuNPs@CMC.

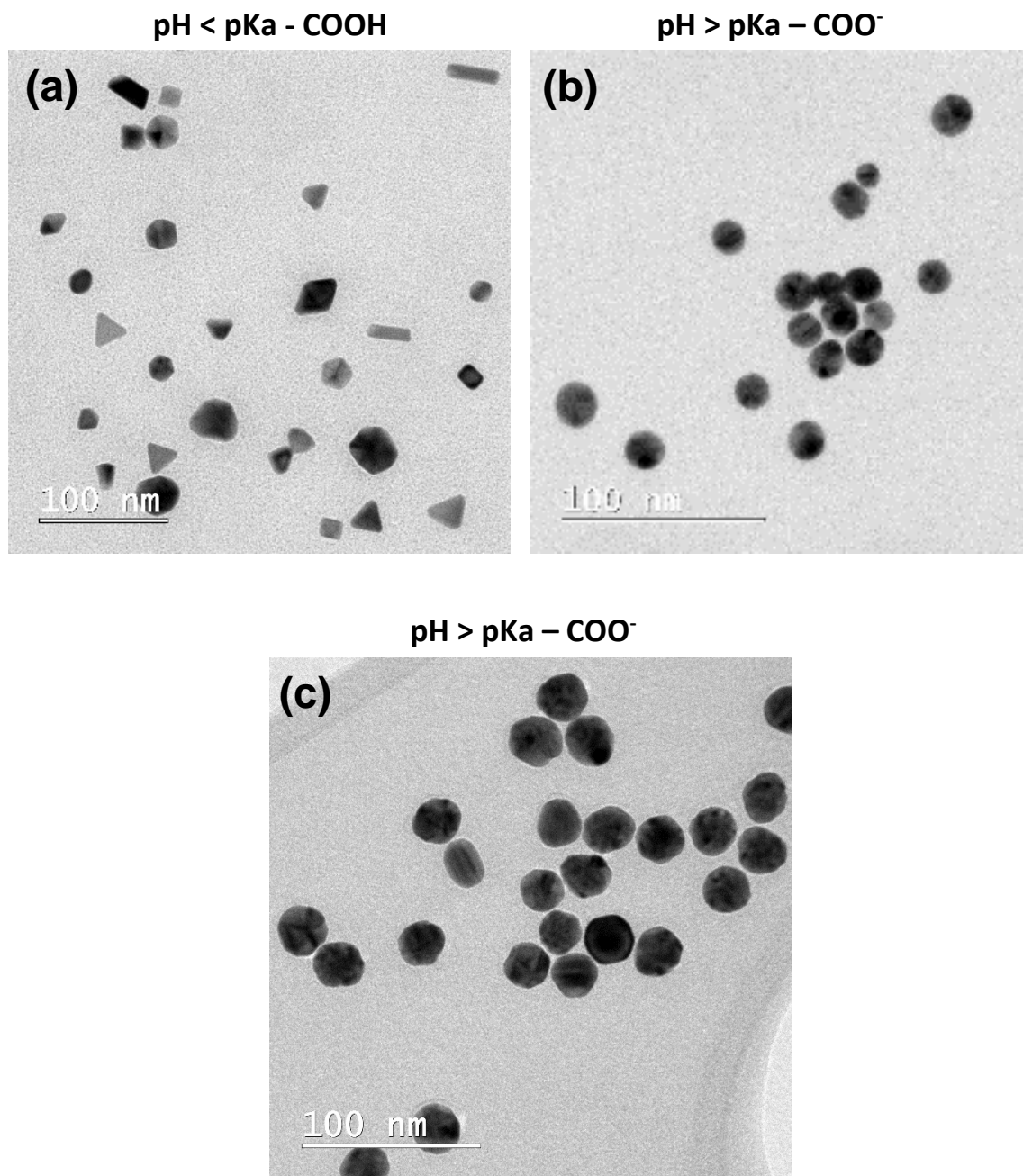


Figura 5.36 - Imagens MET para síntese de AuNPs@CMC em, (a) pH 3,5, (b) pH 7,1 e (c) pH 10,5, utilizando CMC-77.

### 5.2.11 Modelo para nucleação e crescimento de AuNPs@CMC

Seguindo o modelo de nucleação e crescimento <sup>(179-180)</sup> apresentado na figura 5.37, o polímero CMC atua mediando o crescimento do núcleo metálico e assumindo uma conformação em volta das AuNPs@CMC. Pelo procedimento experimental e pelos resultados apresentados no capítulo 5.1, a CMC apresenta carga negativa em suas cadeias poliméricas, atribuída aos grupos  $\text{COO}^-$ , como demonstrado pelos resultados de ZP com variação de protonação/desprotonação dos grupos ácido carboxílico substituídos nas cadeias poliméricas ( $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^-$ ). No procedimento experimental para crescimento de AuNPs@CMC, os íons de  $\text{Au}^{3+}$  interagem com os grupos  $-\text{OH}$ , nas cadeias poliméricas de CMC, sendo reduzidos para  $\text{Au}^0$  ( $\text{Au}^{3+} + e \rightarrow \text{Au}^0$ ) (Fig. 5.37 a-b), formando núcleos ao longo da cadeia (Fig. 5.37 b). Em seguida, ocorre o processo de crescimento destes núcleos ( $\text{Au}^0 + \text{Au}^0_n \rightarrow \text{Au}^0_{n+1}$ ) (Fig. 5.37 b-c), com posterior interação entre os átomos de ouro  $\text{Au}^0$ , formando um núcleo que crescerá mediado pela conformação da CMC até o ponto de estabilização (Fig. 5.37 d-e-f).

A morfologia das AuNPs@CMC crescidas, dependerá da carga e da conformação das cadeias poliméricas de CMC. Quanto maior a substituição, maior será densidade de carga, e conseqüentemente as interações repulsivas de natureza eletrostática são mais intensas, devido à presença de carboxilatos ao longo das cadeias, contribuindo para uma conformação mais estendida e assim favorecendo a expansão das cadeias poliméricas. No modelo proposto, essa condição favorece o crescimento de AuNPs com maior grau de polidispersão, com significativa variação de morfologia, como demonstrado pelos resultados de AuNPsCMC-122 (Fig. 5.17). Por outro lado, para cadeias poliméricas menos substituídas (GS 0,77), as interações eletrostáticas repulsivas são minimizadas, favorecendo uma conformação enovelada das cadeias, com interações fracas e de curto alcance entre os segmentos poliméricos <sup>(70-74)</sup> (Fig. 5.37 g), isso tende a favorecer AuNPs homodispersas, sem variação significativa de morfologia. O efeito do pH nas cadeias poliméricas é relacionado, principalmente, a distribuição de carga, devido a protonação/desprotonação dos grupos substituídos ao longo das cadeias. Para pH abaixo do pKa, os grupos carboxílicos são protonados ( $\text{R}/\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{R}/\text{COOH}$ ), diminuindo a carga das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a quantidade de sítios de nucleação, isso favorece o crescimento de AuNPs anisotrópicas. Por outro lado, para pH

acima do pKa, os grupos carboxílicos são desprotonados ( $R/COOH \rightarrow R/COO^- + H^+$ ), aumentando a distribuição de carga das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a quantidade de sítios para nucleação, com crescimento de AuNPs simétricas e estáveis. Esse modelo foi comprovado pelos resultados de MET mostrados na Figura 5.36.

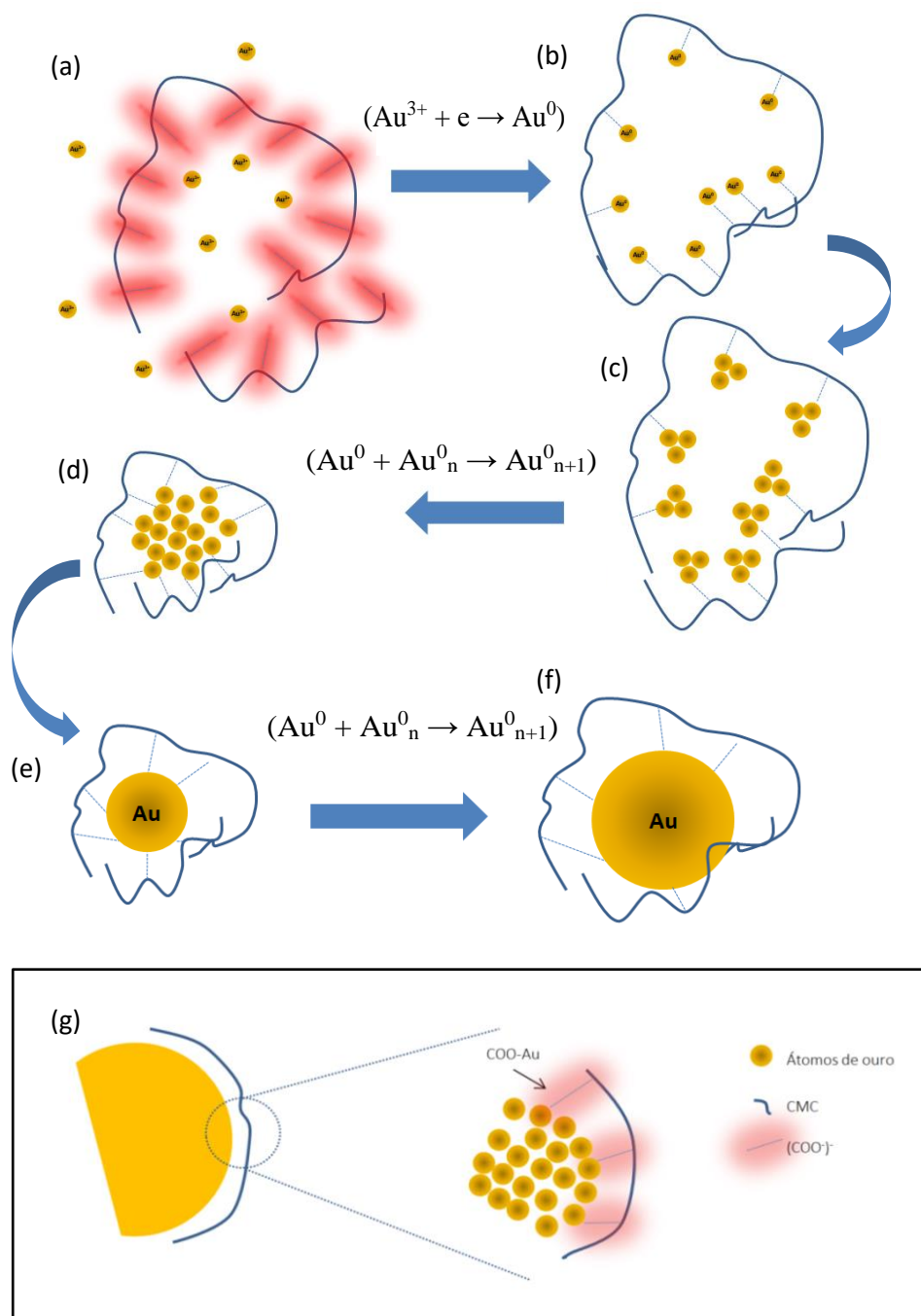


Figura 5.37 - Modelo de nucleação e crescimento de AuNPs mediado por CMC (Fonte: próprio autor).



### 5.2.12 Ensaios Biológicos

A Figura 5.38 apresenta o gráfico do ensaio de MTT das células HEK293T em 24 horas de contato com a amostra AuNPs@CMC-77 e na figura 5.39 com 24 horas de contato com a amostra AuNPs@CMC-122. Observa-se que os valores apresentados nos controles referência foram similares ao controle negativo e que o controle positivo sempre esteve abaixo de 50%. As células HEK293T em contato por 24 horas com as amostras 77\_Au\_5, 77\_Au\_10, 77\_Au\_15, 77\_Pura, 122\_Au\_10 e 122\_Pura não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Os conjugados 77\_Au\_20, 77\_Au\_25, 77\_15\_C, 122\_Au\_5, 122\_Au\_15, 122\_Au\_20, 122\_Au\_25 e 122\_15\_C apresentaram diminuição da viabilidade de  $14,70 \pm 3,50$ ;  $19,70 \pm 4,90$ ;  $20,90 \pm 3,70$ ;  $11,50 \pm 6,40$ ;  $12,50 \pm 4,50$ ;  $21,70 \pm 5,50$ ;  $27,20 \pm 4,20$  e  $24,70 \pm 3,20\%$  respectivamente em relação ao grupo controle sem tratamento. Entretanto, considerando-se que mesmo a amostra de maior concentração apresentou viabilidade celular de cerca de 80%, foi avaliado que as amostras apresentaram baixa citotoxicidade em meio biológico.

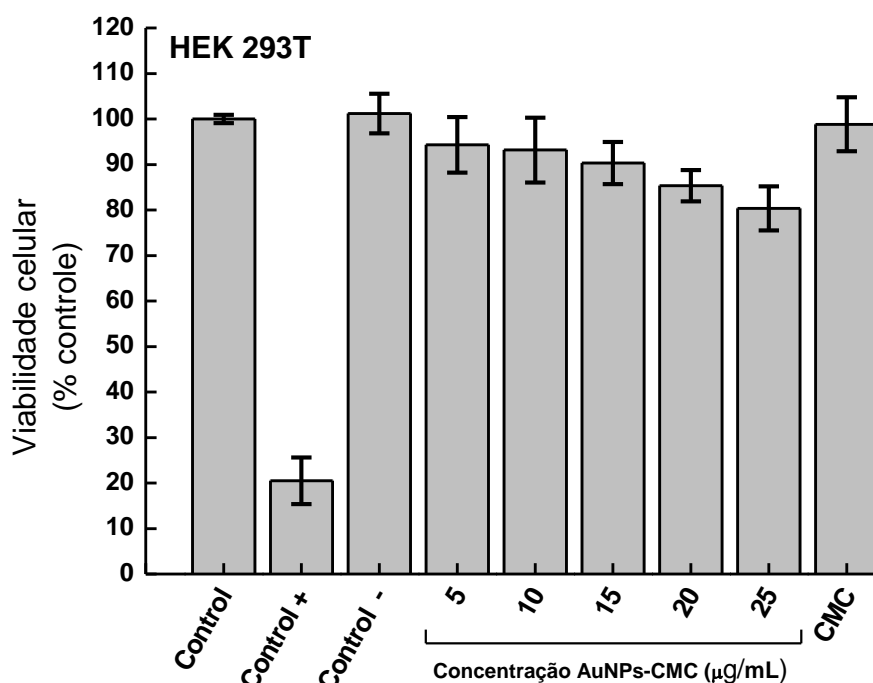


Figura 5.38 - Gráfico MTT após 24 horas de tratamento da amostra AuNPs@CMC-77 em contato com as células HEK293T.

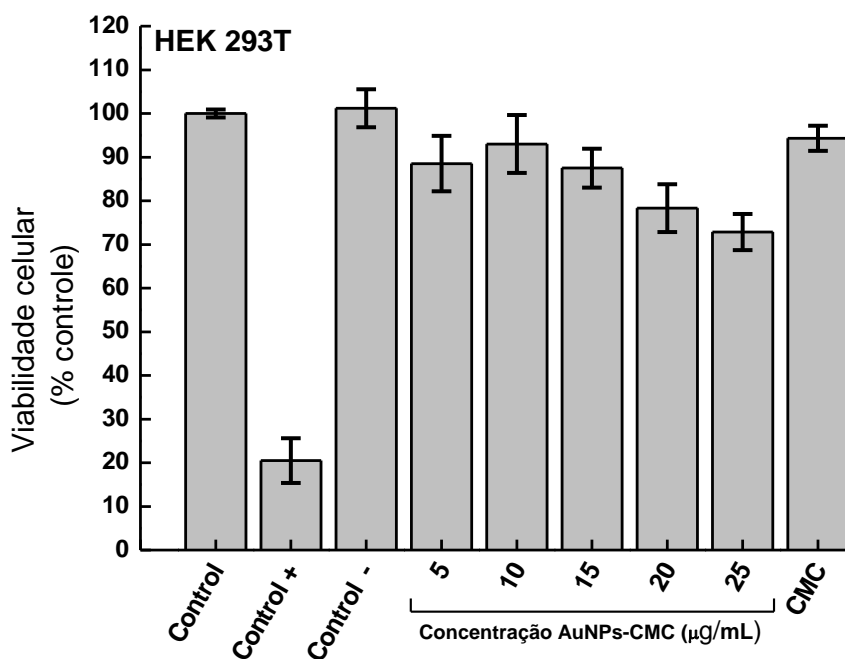


Figura 5.39 - Gráfico MTT após 24 horas de tratamento da amostra AuNPs@CMC-122 em contato com as células HEK293 T.

A figura 5.40 demonstra a morfologia das células HEK 293T após o contato de 24 horas com os conjugados desenvolvidos. Observa-se na condição controle sem tratamento que as células apresentam confluência de 100%, típicas de células HEK293 T; células arredondadas e aderidas. As células HEK293 T tratadas com os conjugados 77\_Au\_5, 77\_Au\_10, 77\_Au\_15, 77\_Au\_20, 77\_Au\_25, 77\_15c, 77\_pura, 122\_Au\_5, 122\_Au\_10, 122\_Au\_15, 122\_Au\_20, 122\_Au\_25, 122\_15c e 122\_pura apresentam confluências de 98, 90, 90, 75, 75, 70, 99, 95, 100, 100, 90, 90, 70 e 100% respectivamente, em relação ao grupo controle. Como observado apenas as amostras de maior concentração apresentam os menores valores de confluência, contudo, mesmo essas amostras apresentam valores considerados bons (75 para a amostras CMC-77-AuNP e 90 para a amostras AuNPs@CMC-122).

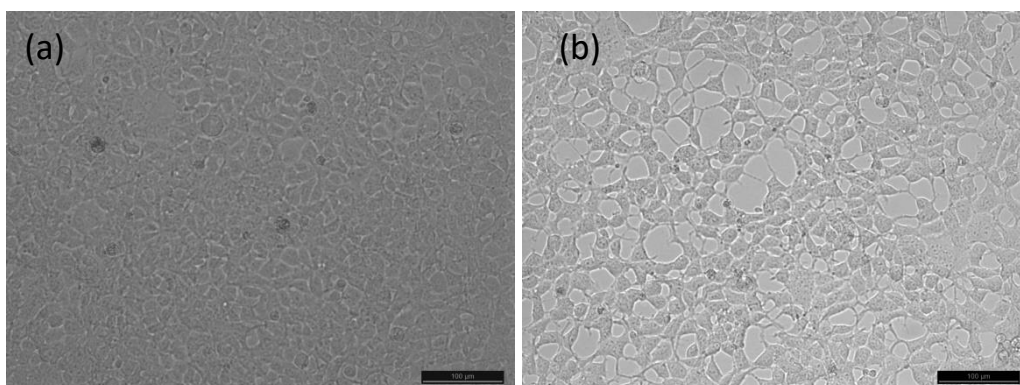


Figura 5.40 - Imagens de microscopia de células HEK 293 T. (a) sem tratamento (condição controle) e após 6 horas de tratamento com amostras de conjugados (b) AuNPs@CMC-77 25 µg/mL.

A Figura 5.41 apresenta o gráfico do ensaio de MTT das células U87 em 24 horas de contato com a amostra AuNPs@CMC-77 e na figura 5.42 com 24 horas de contato com a amostra AuNPs@CMC-122. Observa-se que os valores apresentados nos controles referência foram similares ao controle negativo e que o controle positivo sempre esteve abaixo de 50%. As células u87 em contato por 24 horas com as amostras 77\_Au\_5, 77\_Au\_10, 77\_Au\_15, 77\_Au\_25, 77\_Pura e 122\_Pura não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Os conjugados 77\_Au\_20, 77\_15\_C, 122\_Au\_5, 122\_Au\_10, 122\_Au\_15, 122\_Au\_20, 122\_Au\_25 e 122\_15\_C apresentaram diminuição da viabilidade de  $18,40 \pm 4,20$ ;  $23,70 \pm 9,30$ ;  $18,90 \pm 7,70$ ;  $22,50 \pm 11,30$ ;  $20,80 \pm 4,50$ ;  $2,70 \pm 5,50$ ;  $19,20 \pm 8,00$ ;  $22,0 \pm 3,20$  e  $32,80 \pm 2,00\%$  respectivamente, em relação ao grupo controle sem tratamento. Entretanto, nenhuma amostra causou toxicidade nas células de glioma.

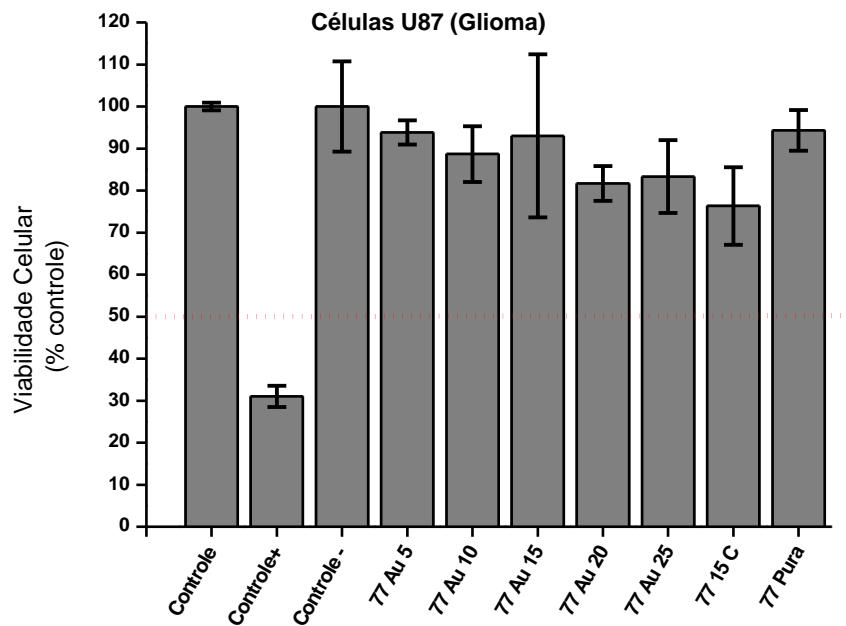


Figura 5.41 - Gráfico MTT após 24 horas de tratamento da amostra AuNPs@CMC-77 em contato com as células U87.

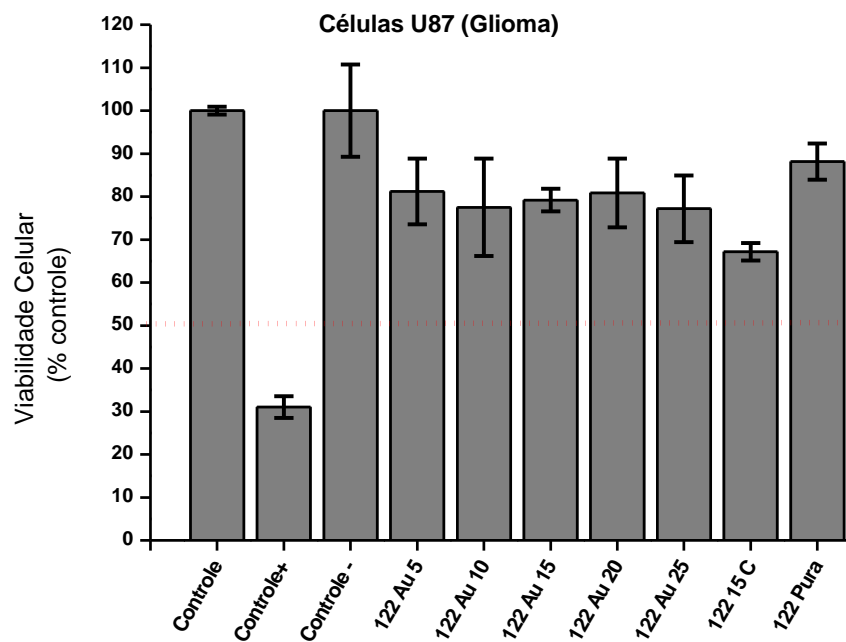


Figura 5.42 - Gráfico MTT após 24 horas de tratamento da amostra AuNPs@CMC-122 em contato com as células U87.

A figura 5.43 apresenta as microfotografias das células U87, após o contato por 24 h com conjugados desenvolvidos. Observa-se que na condição controle sem tratamento as células apresentaram confluência de aproximadamente 70% e características de células de glioblastoma, ou seja, a presença de astrócitos em graus variados de diferenciação de tamanhos e formas (atipias celulares). As células U87 tratadas com as amostras 77\_Au\_5, 77\_Au\_10, 77\_Au\_15, 77\_Au\_20, 77\_Au\_25, 77\_pura, 122\_Au\_5, 122\_Au\_10, 122\_Au\_15, 122\_Au\_20, 122\_Au\_25, 122\_15c e 122\_pura apresentam confluências e características semelhantes ao grupo controle.

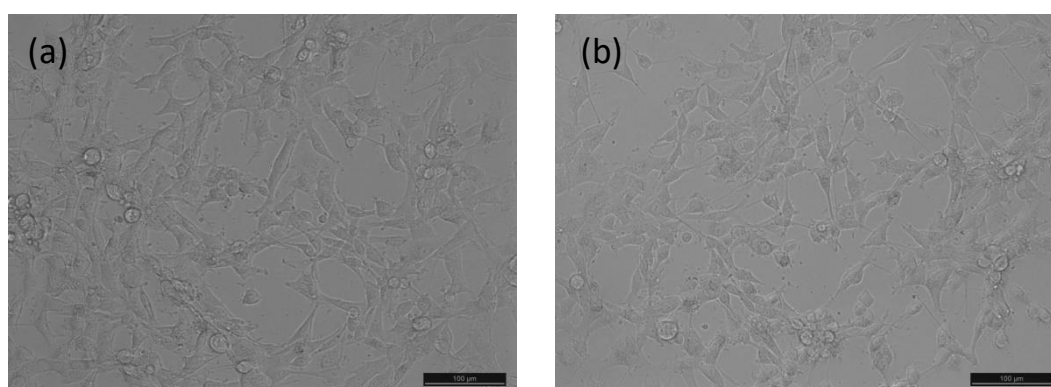


Figura 5.43 - Imagens de microscopia de células U87. (a) sem tratamento (condição controle) e após 24 horas de tratamento com amostras de conjugados (b) AuNPs@CMC-122 - 25µg/mL.

---

## 5.3 – Desenvolvimento de um nano biossensor para HIV-1

AuNPs são caracterizadas pelo seu forte espalhamento de luz, dependente do diâmetro e ressonante com comprimento de onda de excitação. A agregação de várias AuNPs em dispersão coloidal, modifica a dinâmica do movimento browniano, e consequentemente, o  $H_D$ , amplificando assim o espalhamento de luz pela solução.

A síntese de AuNPs utilizando CMC como agente de redução e estabilização, tem a vantagem de apresentar os grupos funcionais ( $\text{COO}^-$ ) do polímero em sua superfície. Essa característica torna as AuNPs@CMC potencialmente funcionalizáveis, na medida em que é possível a ligação química de outras moléculas em sua superfície. Neste estudo, essa característica foi aplicada para o desenvolvimento de um nano biossensor, projetado e desenvolvido com base no conceito de um ensaio inovador referido neste trabalho como *Light Scattering Immunoassay* (LIA). Este método de detecção foi usado pela primeira vez para a detecção *in vitro* de anticorpo monoclonal do HIV tipo 1, usando o método de espalhamento dinâmico de luz (DLS) como sonda. Essencialmente, a conveniência da técnica DLS reside em sua capacidade de distinguir nanopartículas individuais, nanoconjugados, dimers, oligômeros ou agregados em suspensões coloidais por causa de suas diferenças de tamanho, que é comumente referida como o "diâmetro hidrodinâmico" ( $H_D$ )<sup>(180-182)</sup>. A interação entre nanopartículas devido a ligações entre antígenos e anticorpos altera o  $H_D$ , sendo detectado pelo espalhamento de luz em dispersão coloidal.

### 5.3.1 Funcionalização da CMC com PolyArginina (PolyArg)

Para aplicação das AuNPs@CMC produzidas como nano biossensor pela técnica de LIA, foi necessário à indução de ligação de duas ou mais AuNPs@CMC, de forma que alterações em seu  $H_D$  sejam perceptíveis pelo espalhamento de luz. Para isso, desenvolvemos um sistema complementar ao sistema AuNPs@CMC, pela introdução de grupos químicos com carga positiva na cadeia polimérica da CMC, tornando possível assim, a ligação de biomoléculas complementares as ligadas ao sistema AuNPs@CMC. Como molécula complementar, escolhemos o aminoácido arginina (através do polipeptídeo poliarginina), devido à presença de grupos químicos  $\text{NH}$  e  $\text{NH}_3$ , adequados à ligação com anticorpos.

Neste estudo, as cadeias poliméricas de CMC foram covalentemente modificadas, pela introdução de aminoácidos arginina, através da mediação de EDS/NHS como descrito na sessão 4.2.2 de materiais e métodos, formando o polímero nomeado de CMC\_PolyArg, como ilustrado na Figura 5.44, sendo, (a) estrutura química da CMC; (b) polimerização de L-Arginina na presença de EDC (polipeptídeo, PolyArg) e (c) funcionalização da CMC com PolyArginina (PolyArg) na presença de EDC (polipeptídeo, PolyArg).

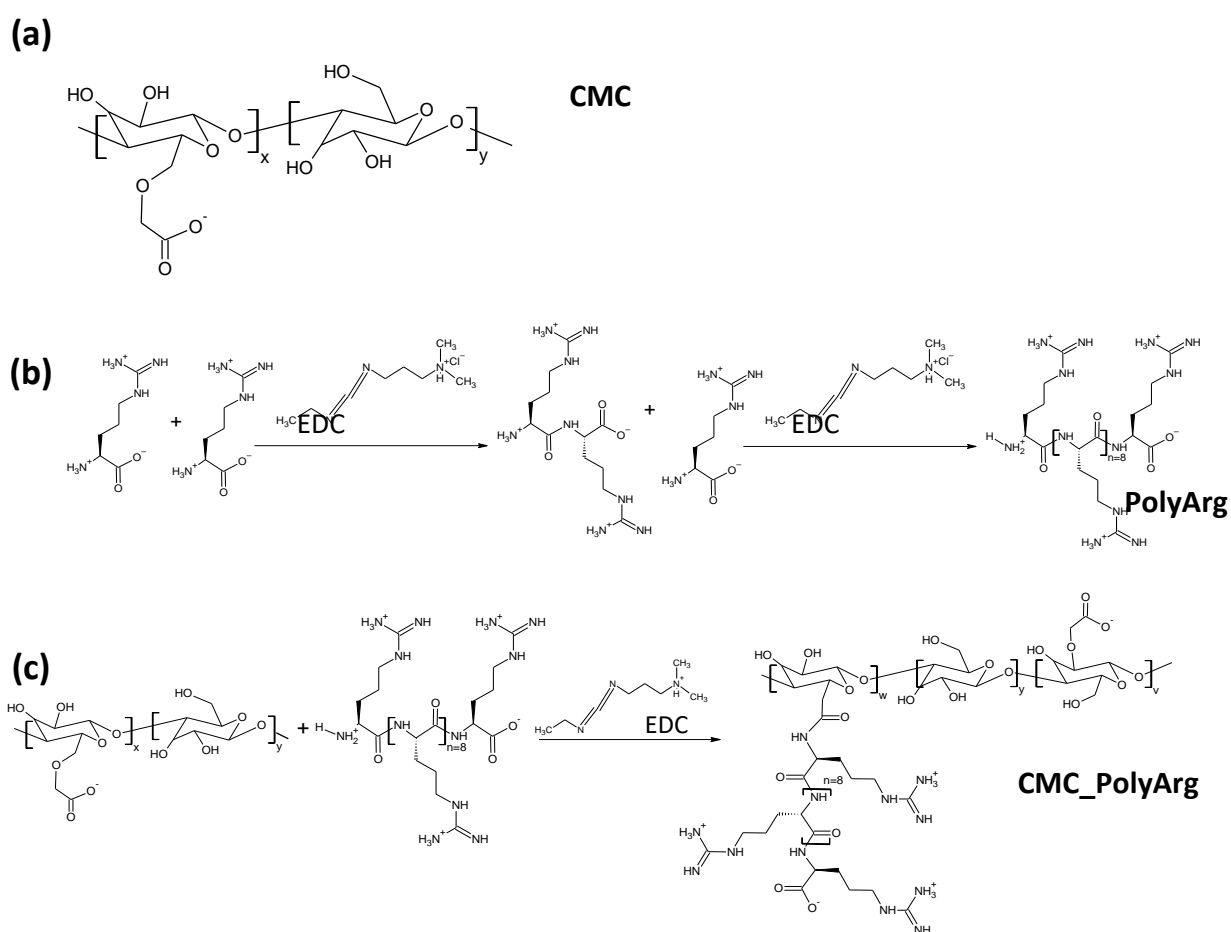


Figura 5.44 - (a) Estrutura química da CMC; (b) Polimerização de L-Arginina na presença de EDC (polipeptídeo, PolyArg) e (c) Funcionalização da CMC com PolyArginina (PolyArg) na presença de EDC (polipeptídeo, PolyArg) ( $x$  = anel anidroglicose substituído com carboximetil,  $y$  = anel anidroglicose não substituído;  $w$  = PolyArg anel anidroglicose substituído com carboximetil;  $v = x-w$ );  $n=8$ , número de unidade de repetição de L-arginina em PolyArg).

### 5.3.2 Síntese de AuNPs- CMC\_PolyArg

Antes da síntese, o biopolímero (CMC) e a conjugação da CMC com poliarginina (CMC\_PolyArg) foram caracterizados por espectroscopia FTIR, para comprovar a ligação da poliarginina nas cadeias poliméricas da CMC. Foram identificados os principais grupos funcionais da CMC e da poliarginina, com a conjugação predominantemente covalente, sendo observada através das bandas de amido, como apresentado na figura 5.45.

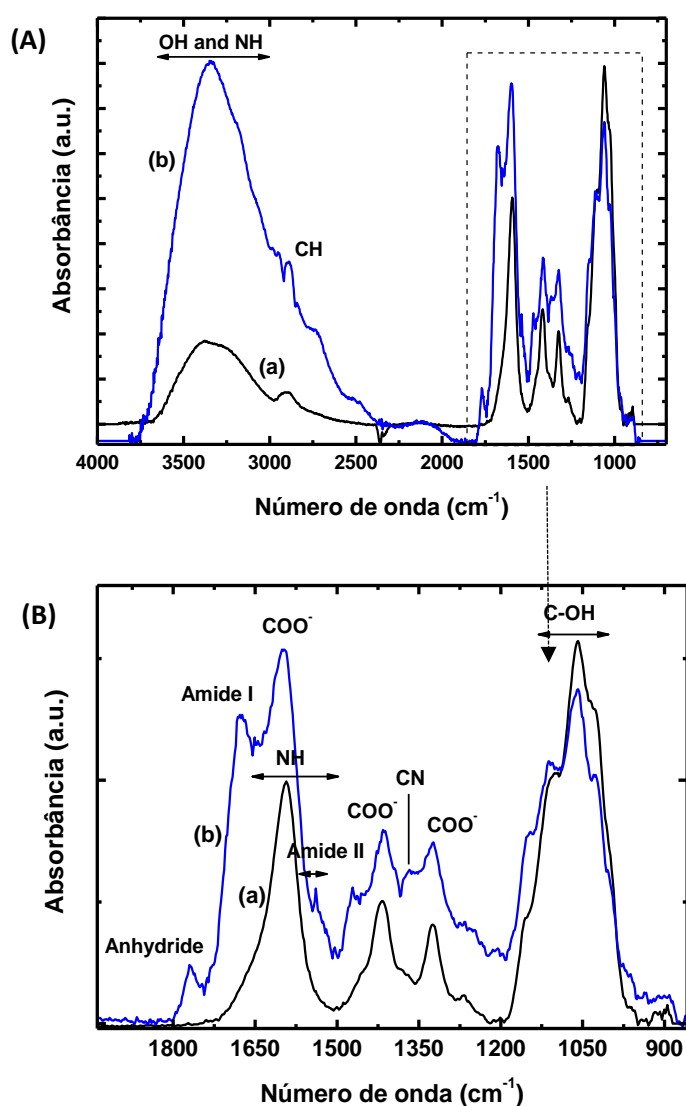


Figura 5.45 - Espectros de FTIR de (a) CMC e (b) CMC\_PolyArg.



A poliarginina usada como molécula de ligação para a construção dos conjugados, consiste em uma sequência de resíduos de arginina ligados por ligações amida, entre os grupos amina e carboxila, através da mediação do reticulador EDC de comprimento zero. Os espectros de FTIR indicaram a ocorrência da funcionalização de cadeias CMC com moléculas de poliarginina, principalmente por alterações nas bandas relacionadas a L-arginina (unidades moleculares) e formação de ligações amidas, tipicamente variando de  $1500\text{cm}^{-1}$  a  $1700\text{cm}^{-1}$ . Além disso, com base na formação de anidrido, em  $1770\text{cm}^{-1}$ , os espectros evidenciaram que a conjugação ocorreu devido à reação entre aminas e ácidos carboxílicos na presença de EDC <sup>(162)</sup>.

### 5.3.3 Síntese de AuNPs@CMC-PolyArg

O polímero CMC-PolyArg (CMC modificado por poliarginina) foi utilizado para síntese de AuNPs, atuando tanto como agente redutor, ou seja, reduzindo os íons  $\text{Au}^{3+}$  para  $\text{Au}^0$ , quanto como agente de estabilização da dispersão coloidal, em pH neutro ( $\text{pH}=7,2 \pm 0,1$ ). Os grupos hidroxila dos polissacarídeos, como na CMC, desempenham um papel fundamental no mecanismo de redução de AuNPs e sua estabilização. A mudança na estrutura da CMC, com a adição de grupos amina tem assim influência na nucleação e crescimento das AuNPs@CMC-PolyArg.

### 5.3.4 Caracterização das soluções de AuNPs@CMC e AuNPs@CMC-PolyArg

A espectroscopia UV-Vis foi utilizada para monitorar a formação e estabilização das AuNPs em dispersão coloidal, sendo os resultados apresentados na figura 5.46. Após a estabilização ( $\sim 4\text{h}$ ), os picos com absorção máxima em aproximadamente  $\lambda=521\text{nm}$  são claramente observados, com espectros similares para as amostras de AuNPs@CMC (a) e para as amostras de AuNPs@CMC\_PolyArg (b) (figura 5.46). Estes picos com intensa absorção nos espectros UV-Vis são devido às oscilações coletivas dos elétrons de condução na superfície das AuNPs, conhecido como LSPR. Os resultados evidenciam que a dispersão coloidal de AuNPs@CMC apresenta um FWHM relativamente estreito (49nm) em comparação com AuNPs sintetizado com CMC\_PolyArg (55nm), o que indicou uma distribuição de tamanho de AuNPs mais monodispersa nas amostras sintetizadas com CMC <sup>(183-186)</sup>. Isso pode ser atribuído à

adição de arginina nas cadeias poliméricas da CMC, que inseriu grupos amino com cadeia lateral para o sistema, levando à formação de macromoléculas de peptídeos de polímero (ou *seja*, CMC-PolyArg). Essa funcionalização da CMC alterou o equilíbrio das cargas e as interações gerais entre os grupos funcionais químicos (por *exemplo*, OH, COO<sup>-</sup>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) com íons de ouro na solução, o que afetou significativamente a reação química e estabilização durante a síntese das AuNPs em dispersão coloidal. Esse mecanismo está de acordo com o modelo apresentado na Fig. 5.37, levando em consideração a quantidade de grupos -OH, e a interação eletrostática das cargas positivas e negativas nas cadeias poliméricas. Essa configuração favorece a menor repulsão entre as cadeias e, conseqüentemente, maior proximidade com os núcleos de ouro, limitando assim o tamanho das AuNPs@CMC\_PolyArg, conforme comprovado por imagens de MET (Figura 5.47).

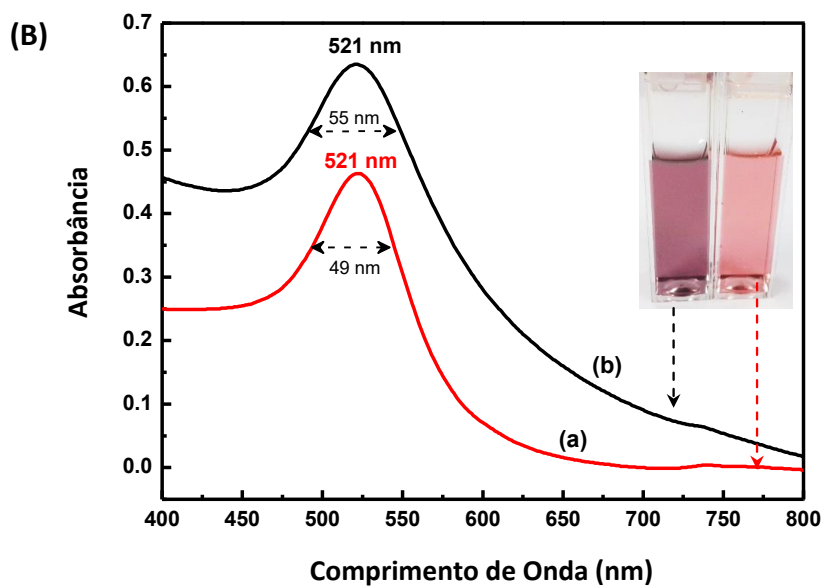
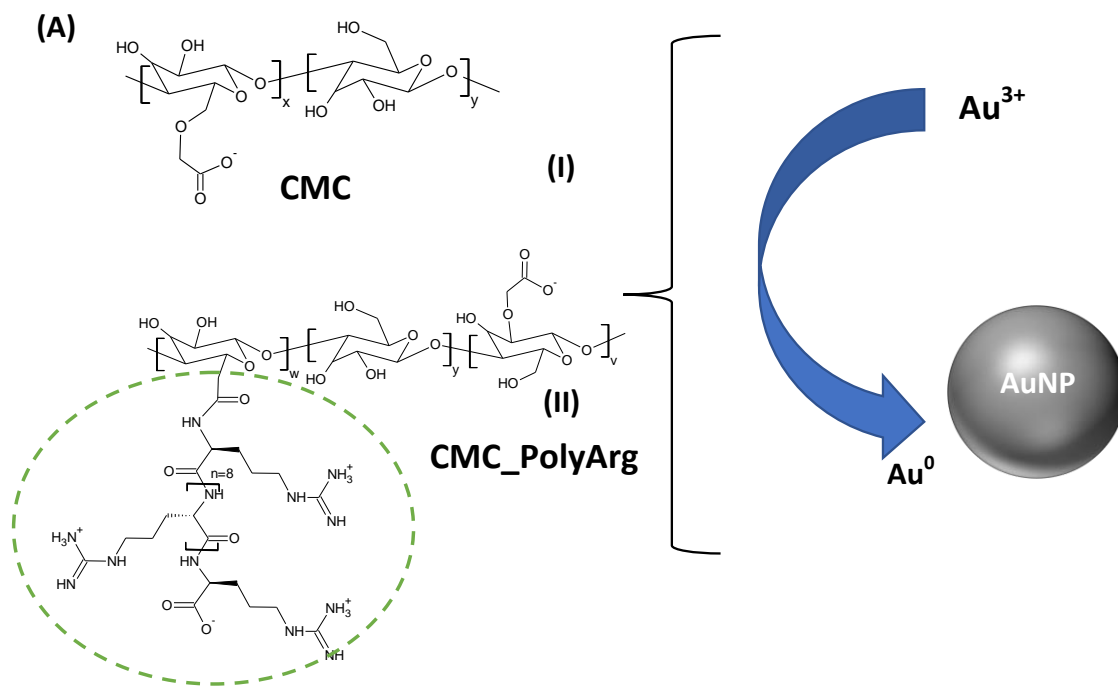


Figura 5.46 - (A) Representação esquemática da síntese de AuNPs com CMC (I) e CMC\_PolyArg (II); ( $x$  = anel anidroglicose substituído com carboximetil,  $y$  = anel anidroglicose não substituído;  $w$  = PolyArg anel anidroglicose substituído com carboximetil;  $v = x-w$ ). (B) Espectros de UV-Vis para coloides de AuNPs sintetizado com (a) CMC (linha vermelha) e (b) CMC\_PolyArg (linha preta). Inserção: Imagem digital das dispersões coloidais AuNPs@CMC (direita, a) e AuNPs@CMC\_PolyArg (esquerda, b).

### 5.3.5 Análises morfológicas e de composição química

As características morfológicas e de composição química das AuNPs@CMC\_PolyArg foram analisadas, pois desempenham um papel crítico nas propriedades gerais dos sistemas, incluindo absorção óptica, espalhamento de luz, e nano toxicidade. Imagens de MET, histograma da distribuição de tamanhos, espectro EDX e padrões de difração SAED são apresentados na Figura 5.47 para AuNPs@CMC\_PolyArg.

Como tendência geral, pode-se afirmar com base nas imagens MET que AuNPs foram efetivamente sintetizadas pela redução química *in situ* direta de Au<sup>3+</sup> usando CMC modificada com poliarginina (CMC\_PolyArg), que atuou simultaneamente como agente de redução e de estabilização, apresentando morfologia esférica, com um diâmetro médio de 12nm e uma distribuição larga quando comparado a AuNPs@CMC. Esses resultados indicam que as moléculas de poliarginina adicionadas nas cadeias poliméricas de CMC afetou a nucleação e a cinética de crescimento das AuNPs no meio aquoso, em comparação com o sistema AuNPs@CMC, possivelmente devido à combinação de interações químicas e eletrostáticas dos grupos de amino e carboxilatos com os íons Au<sup>3+</sup> durante o processo de redução/estabilização.

Os resultados de MET estão de acordo com os resultados de UV-Vis discutidos nas seções precedentes. O espectro EDS é mostrado na Figura 5.47, onde os picos em 2,1keV, 9,7keV e 11,4keV correspondem às energias de transição vinculadas a AuM<sub>α</sub>, AuL<sub>α</sub> e AuL<sub>β</sub>, respectivamente, confirmando a formação de AuNPs. Além disso, o padrão de difração de elétrons com os anéis de difração concêntrica SAED demonstram a formação de AuNPs cristalinas. Os raios dos anéis correspondem as distâncias interplanares de d=2,35Å, d=2,03Å, d=1,44Å e d=1,23Å, que foram indexados como (111), (200), (220) e (311), planos de ouro metálico com estrutura cúbica de face centrada (cfc) (JCPDS 04-0784).

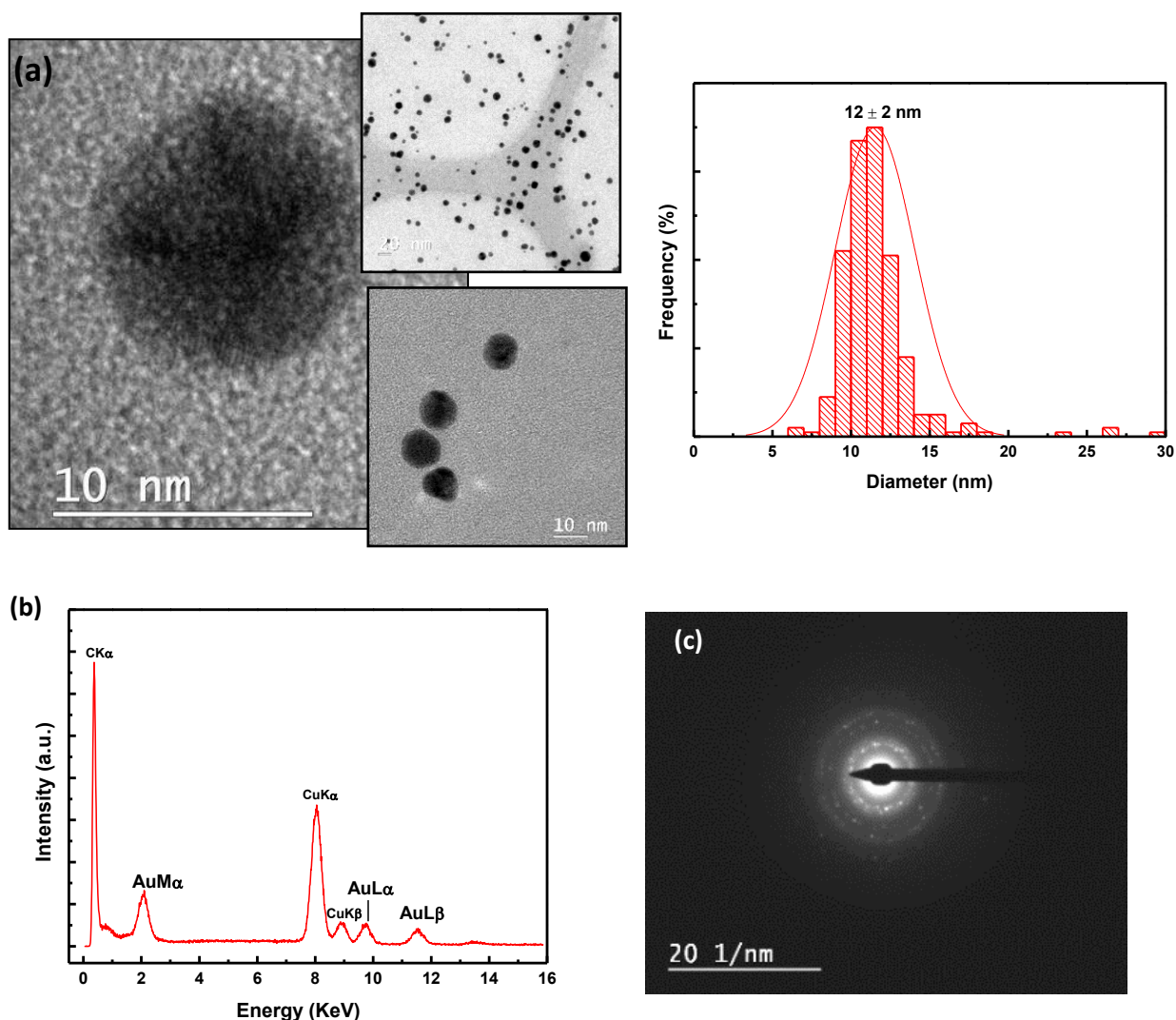


Figura 5.47 - Caracterização morfológica, estrutural e química de AuNPs@CMC\_PolyArg: (a) imagens MET e histograma da distribuição de tamanho. (b) espectro EDS e (c) padrão SAED.

### 5.3.6 Análises de carga superficial

Os resultados de ZP apresentados na Figura 5.48, indicam a formação de AuNPs carregadas negativamente devido a estabilização pela CMC e pela CMC\_PolyArg em  $pH=(7,2\pm 0,2)$ , com valores médios de  $-(60\pm 3)mV$  e  $-(19\pm 3)mV$ , respectivamente, demonstrando que as AuNPs foram formadas e predominantemente estabilizadas pelos grupos carboxilatos de CMC por repulsão eletrostática <sup>(187-188)</sup>. O maior valor encontrado nas amostras AuNPs@CMC é associado a maior quantidade de grupos

carboxilatos (espécies aniônicas) na cadeia polimérica em comparação com CMC\_PolyArg, que foram produzidos pela conjugação covalente de grupos carboxílicos (CMC) com grupos de amino (poliarginina). Portanto, a adição de poliarginina ao polímero CMC, não só reduziu a quantidade total de espécies carregadas negativamente ( $R-COO^-$ ) da macromolécula CMC, mas também acrescentou grupos amino positivamente carregados, que representaram a redução significativa dos valores de ZP (67%). Essas mudanças significativas no equilíbrio de cargas dos sistemas macromoleculares (polímero-polipeptídio) afetaram o tamanho médio dos AuNPs formados, conforme verificado pelas imagens de MET.

As AuNPs@CMC\_PolyArg foram ainda caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS); os  $H_D$  das amostras de AuNPs@CMC\_PolyArg foram avaliados para acessar o tamanho dos nano coloides em meio aquoso e no pH fisiológico ( $7,2 \pm 0,2$ ). Os valores de  $H_D$  dos AuNPs foram significativamente afetados pelos ligantes, onde a dispersão coloidal de AuNPs@CMC apresentou um tamanho médio de  $(78 \pm 3)$ nm em comparação com  $(32 \pm 3)$ nm para a dispersão coloidal de AuNPs@CMC\_PolyArg. Como observado nos resultados de ZP (Figura 5.48), a adição de poliarginina nas cadeias de CMC, causou a redução da repulsão de grupos carboxilatos carregados negativamente, levando a uma contração significativa da estrutura supramolecular composta pelo ligante em torno do núcleo inorgânico de AuNPs.

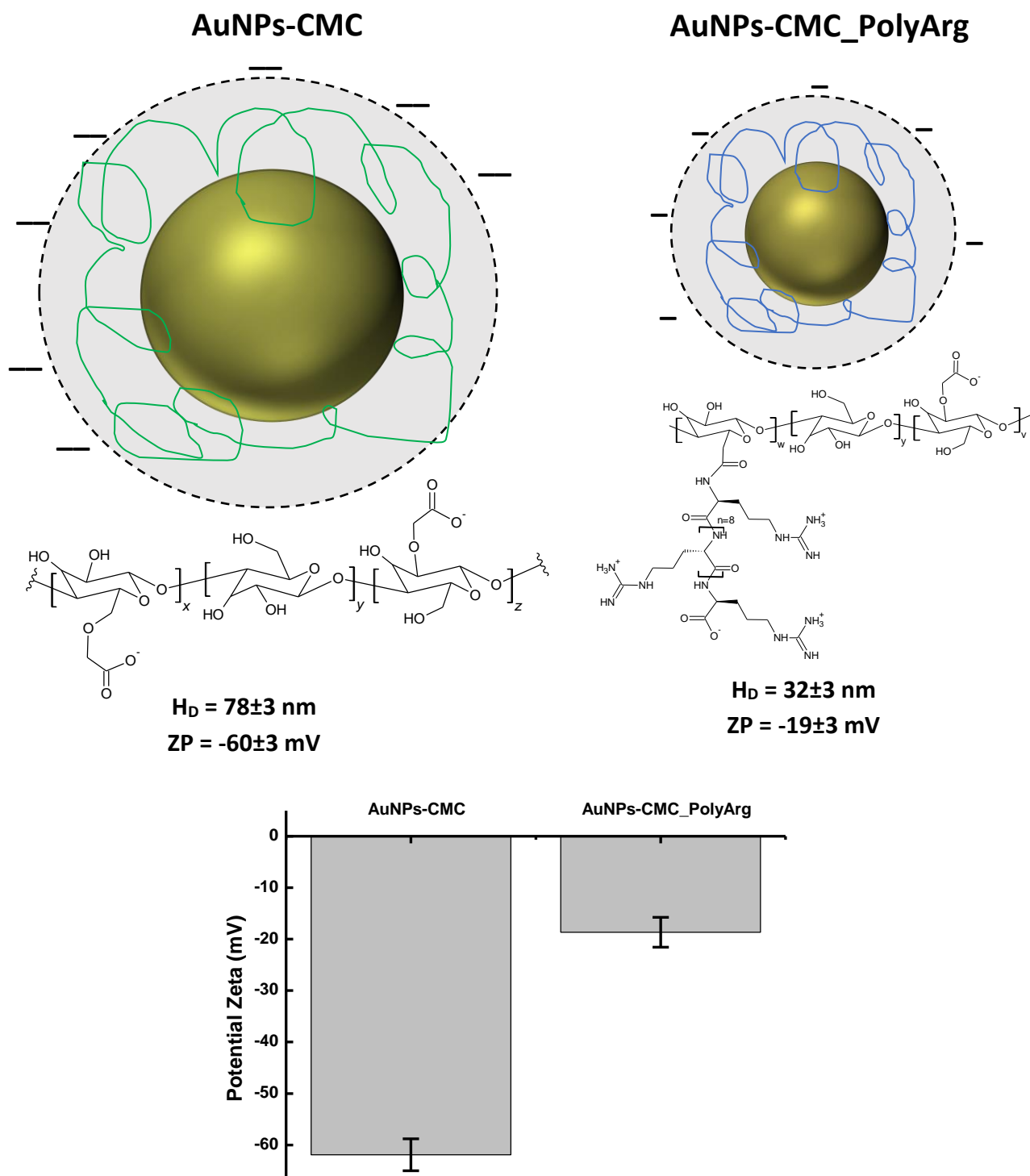


Figura 5.48 - Resultados de DLS e ZP: (a) Representação esquemática das nanoestruturas de casca de núcleo de AuNPs@CMC (esquerda) e AuNPs@CMC\_PolyArg (direita). (b) Medidas de ZP de conjugados AuNPs@CMC, antes e depois da adição de poliarginina para a cadeia polimérica da CMC (barra de erro: desvio padrão, n=10).

### 5.3.7 Caracterização biológica - Ensaio de viabilidade celular

A citocompatibilidade das amostras de AuNPs@CMC foram avaliadas por ensaio MTT *in vitro* usando linhas celulares HEK 293T e U87 MG, que correspondem a células normais e cancerosas, respectivamente. Esses ensaios são fundamentalmente importantes para as aplicações propostas neste trabalho, uma vez que a aplicação dos nanomateriais desenvolvidos em meio biológico, mesmo *in vitro*, requerem ampla regulação e comprovação de sua segurança.

Os resultados da viabilidade celular apresentados na figura 5.49, demonstraram que as AuNPs@CMC, não apresentam diferenças significativas entre as linhas celulares (dentro da variação estatística), em concentrações de 1,25/2,50/3,75/5,00/6,25 e 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Mesmo com a maior concentração de 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , nenhuma toxicidade foi verificada, com respostas de viabilidade celular acima de 70%. A redução da viabilidade celular em torno de 30% é considerada como material não citotóxico de acordo com a norma internacional (ISO 10933-5, Avaliação Biológica de dispositivos médicos). O IC50 foi determinado a partir das curvas de resposta à concentração e os valores das células normais e cancerosas foram de (27,6 $\pm$ 6,0) e (32,1 $\pm$ 6,0) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, indicando nenhuma diferença estatística significativa em relação aos tipos celulares testados. Portanto, esses resultados provaram que os nanoconjugados AuNPs@CMC foram sintetizados estritamente por um processo aquoso não tóxico, sendo adequados para potenciais aplicações biomédicas.



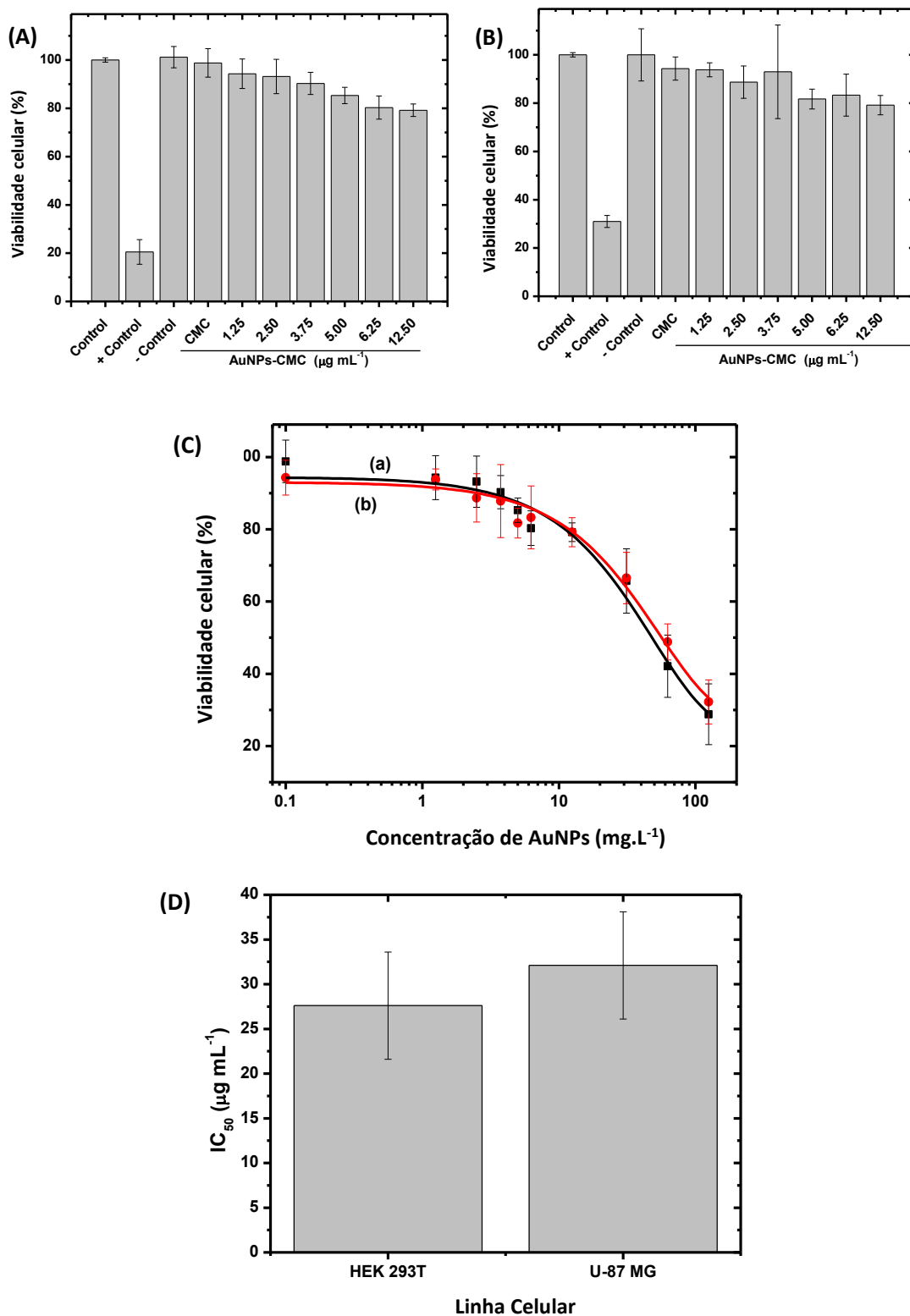


Figura 5.49 - (A) Resposta da viabilidade celular das linhas celulares (A) HEK 293T e (B) U87 MG com base no ensaio MTT após 24h de incubação com AuNPs@CMC. (C) Curvas de concentração-resposta para (a) linhas de células HEK 293T e (b) U87 MG e (D) valores de  $\text{IC}_{50}$ . (barra de erro: desvio padrão (SD),  $n = 6$ ).

### 5.3.8 Projeto e construção de um nano biossensor para HIV-1

Para o desenvolvimento do nano biossensor utilizando AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg, elaboramos o design apresentado nas figuras 5.50 e 5.51. Na metodologia proposta, foram desenvolvidas duas dispersões coloidais independentes, a saber, nano coloides AuNPs@CMC, covalentemente conjugados com o receptor de glicoproteína gp41 (antígeno) (Figura 5.50(A), AuNPs@CMC-gp41) e uma segunda solução de nano coloides AuNPs@CMC\_PolyArg, covalentemente conjugados ao anticorpo monoclonal HIV-1 (Figura 5.50(B), AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV). As dispersões coloidais foram então misturadas e a ligação específica da glicoproteína gp41 (antígeno) com o anticorpo monoclonal HIV-1, atua formando ligações entre as AuNPs@CMC e as AuNPs@CMC\_PolyArg, que são perceptíveis pela técnica de DLS, pelo significativo aumento do  $H_D$  e do espalhamento de luz, como ilustrado na figura 5.51.

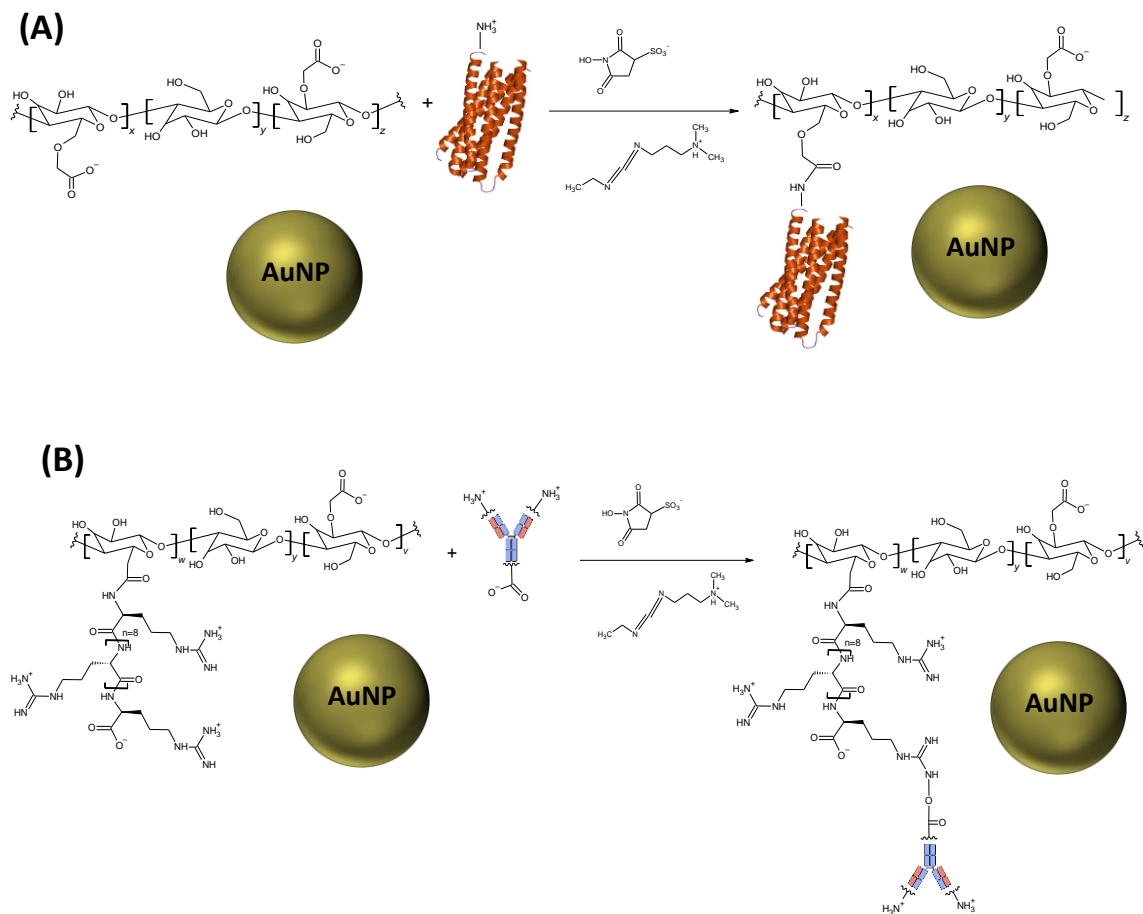


Figura 5.50 - (a) Funcionalização da CMC com a glicoproteína gp41 e (b) Funcionalização da CMC\_PolyArg com o anticorpo abHIV, respectivamente, na presença do EDC/NHS.

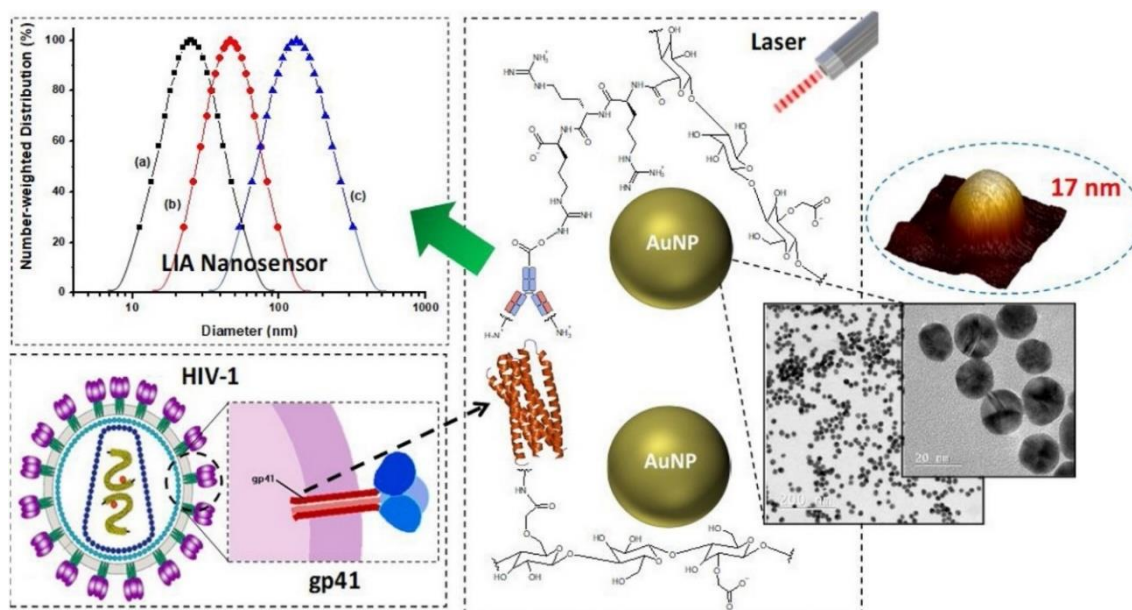


Figura 5.51 - Ilustração da metodologia proposta para o desenvolvimento de nanobiosensors utilizando AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg. As duas dispersões coloidais independentes, AuNPs@CMC-gp41 e AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV, são misturadas, e a ligação específica da glicoproteína gp41 (antígeno) com o anticorpo monoclonal HIV-1, atua formando ligações entre as AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg que são perceptíveis pela técnica de DLS pelo significativo aumento do  $H_D$  e do espalhamento de luz.

### 5.3.9. Caracterização dos nanoconjugados por FTIR

A formação de ligações covalentes entre as moléculas biológicas (ou *seja*, antígeno e anticorpos) e AuNPs@CMC e AuNPs@CMC-PolyArg, foi confirmada por espectroscopia FTIR, sendo os resultados apresentados na figura 5.52<sup>(189-190)</sup>. Após a bioconjugação do receptor de glicoproteína gp41 nas AuNPs@CMC (Figura 5.52(A)) e do anticorpo abHIV para nanopartículas de AuNPs@CMC-PolyArg (Figura 5.52(B)), alterações na estrutura macromolecular do polímero de CMC foram observadas. Após a reação mediada por EDC-NHS, os espectros de FTIR dos bioconjugados (Figuras 5.52 (b, d)), mostraram diminuição significativa das bandas vibracionais de carboxilatos em 1590, 1415 e 1325 $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, as bandas de amida (1660, 1540 e 1230 $\text{cm}^{-1}$ ) apareceram (AuNPs@CMC-gp41) ou aumentaram (AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV) nos espectros, devido ao acoplamento covalente dos grupos carboxílicos do anticorpo AuNPs@CMC ou abHIV aos grupos amina disponíveis presentes no peptídeo gp41 ou AuNPs@CMC\_PolyArg.

Ao calcular a razão da absorvância da banda de carboxilatos em 1590 $\text{cm}^{-1}$  (A1590) e a banda de referência da ligação glicosídeo em 897 $\text{cm}^{-1}$  (A897), figura 5.52(B), foi possível avaliar o consumo relativo de grupos carboxilatos das AuNPs@CMC devido a reação mediada por carbodiimida (razão = A1590/A897). Além disso, a proporção da banda amida II e da banda de referência (A1540/A897) aumentou como resultado da incorporação do receptor da glicoproteína (gp41) e da formação de novas ligações amida entre a proteína e o polímero CMC (Figura 5.52).

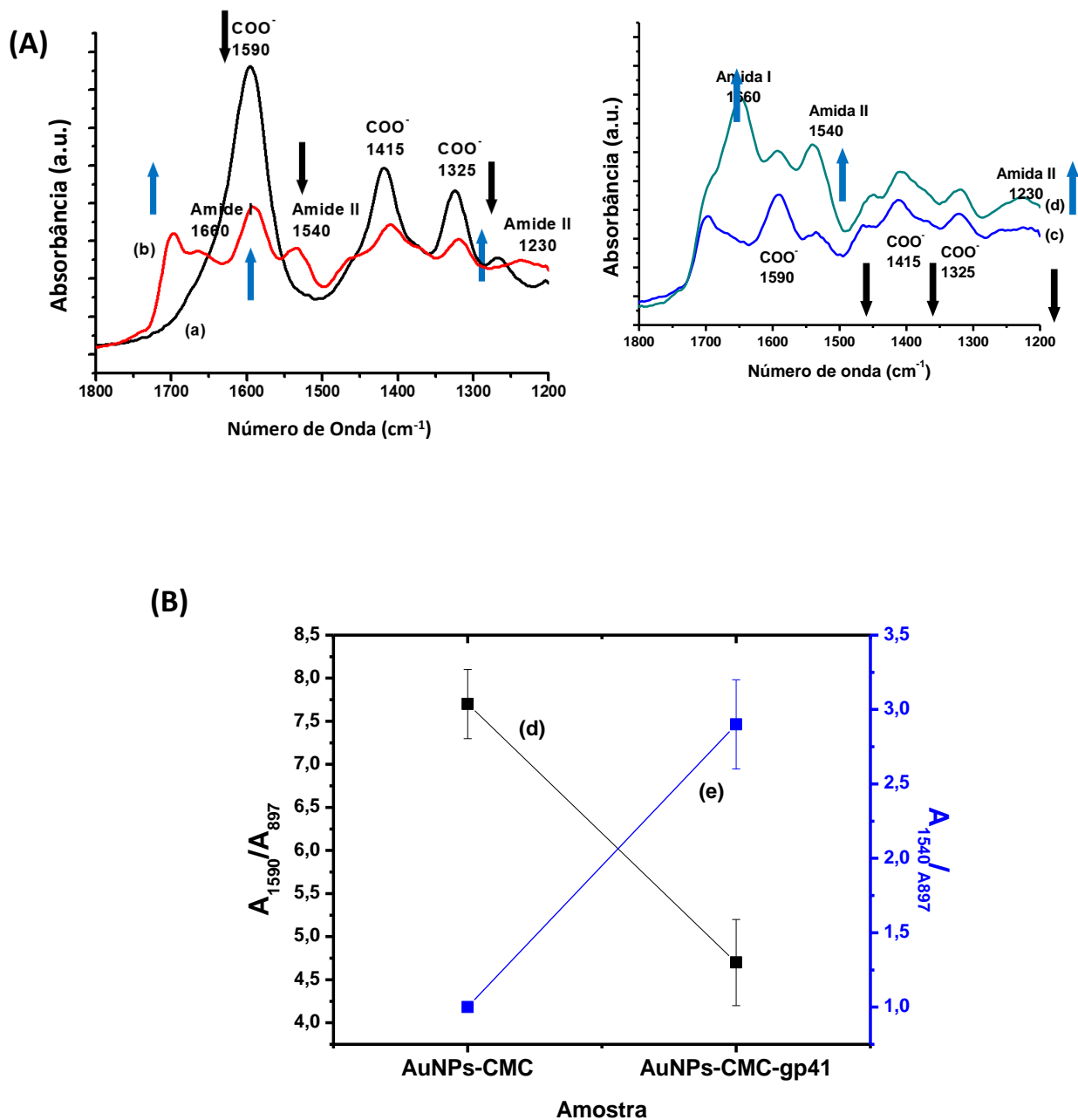


Figura 5.52 - (A) Espectros de FTIR de nanoconjugados baseados em AuNPs@CMC antes e depois da ligação covalente com antígeno (gp41) ou anticorpo (abHIV): (a) AuNPs@CMC; (b) AuNPs@CMC-gp41; (c) AuNPs@CMC\_PolyArg; e (d) AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV. (B) Evolução das bandas vibracionais de (d) carboxilatos (COO<sup>-</sup>) e (e) Amida II a 1590 cm<sup>-1</sup> e 1540 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, associadas à formação de ligações covalentes entre o polímero CMC e o peptídeo gp41 (barra de erro: DP, n = 3).

### 5.3.10 Caracterização dos nanoconjugados por DLS

As distribuições de tamanho dos nanoconjugados foram avaliadas por medidas de DLS e os valores médios de  $H_D$  são apresentados na Figura 5.53. Verificou-se que os nanoconjugados AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg, utilizados como referências, apresentam valores  $H_D$  de  $(20 \pm 2)\text{nm}$  e  $(22 \pm 2)\text{nm}$ , respectivamente. Esses valores são consistentes com as medidas de ZP e DLS apresentados no capítulo 5.1, pois as soluções foram dispersas em meio tampão MES com  $\text{pH}=5,5\pm 0,2$  antes da conjugação com gp41 e abHIV, causando a protonação de carboxilatos ( $\text{RCOO}^- \rightarrow \text{RCOOH}$ ). Portanto, a diminuição da repulsão de grupos carregados negativamente levou à contração dos valores  $H_D$  em comparação com os valores anteriores observados em  $\text{pH}=(7,2\pm 0,2)$ . Além disso, após a conjugação covalente com a glicoproteína gp41 (AuNPs@CMC-gp41, figura 5.53(A)) ou anticorpo HIV1 (AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV, figura 5.53(B)), os valores  $H_D$  foram  $(25 \pm 2)\text{nm}$  e  $(47 \pm 4)\text{nm}$ , respectivamente. Como esperado, os valores de  $H_D$  para os conjugados de AuNPs@CMC e de AuNPs@CMC\_PolyArg são relativamente menores do que os valores de  $H_D$  medidos para ambos os conjugados com o antígeno ou o anticorpo ligado às estruturas macromoleculares. Esses resultados podem ser atribuídos ao "volume excluído" relativamente maior dos imunconjugados biopolímero-polipeptídios (CMC-antígeno ou anticorpo-CMC\_PolyArg) em comparação com o polímero puro, formando uma casca em torno do núcleo.

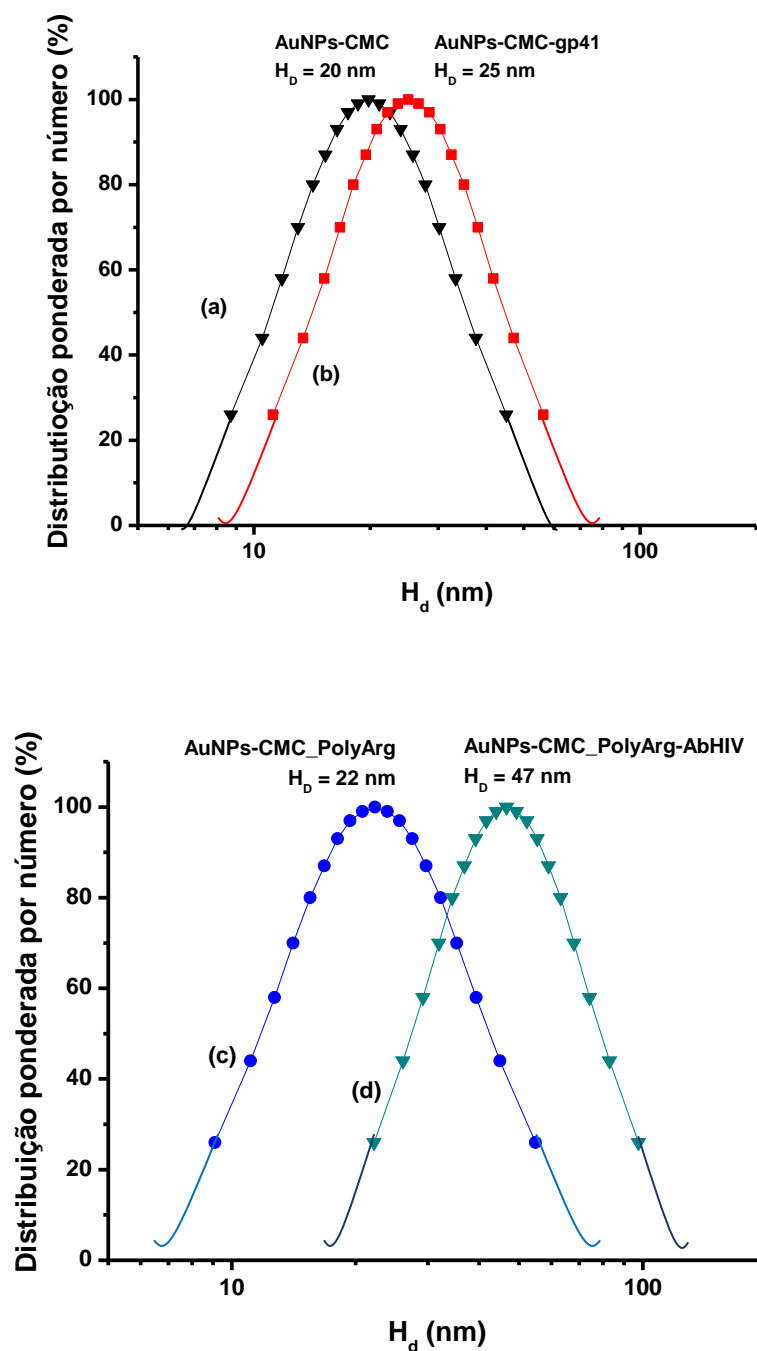


Figura 5.53 - Distribuições de  $H_D$  de nanoconjugados baseados em AuNPs@CMC antes e depois da ligação covalente com antígeno (gp41) ou anticorpo (abHIV): (a) AuNPs@CMC; (b) AuNPs@CMC-gp41; (c) AuNPs@CMC\_PolyArg; e (d) AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV.



O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) das AuNPs@CMC foram calculados usando a técnica DLS para avaliar a sensibilidade potencial do imunoenensaio, que é proposto neste estudo. As curvas de intensidade de espalhamento de luz e os resultados do limite de detecção são mostrados na Figura 5.54(A) e na Tabela 5.4, respectivamente. Os resultados indicaram uma correlação de regressão linear bem ajustada para a concentração dentro da faixa de 1-180pM de ambos os conjugados (AuNPs@CMC e AuNPs@CMC\_PolyArg), o que é consistente com a literatura para sistemas similares <sup>(191-192)</sup>. Esses resultados corroboraram que o DLS é uma ferramenta bioanalítica adequada para o desenvolvimento dos imunoenaios envolvendo a formação de complexos de anticorpos antígenos em meio aquoso coloidal.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) das AuNPs@CMC\_PolyArg estabilizados com polímeros sintetizados foram calculados por DLS para avaliar a sensibilidade potencial do imunoenensaio proposto neste estudo. As curvas de intensidade de espalhamento do DLS e os resultados do limite de detecção são mostrados Figura 5.54(B) e na Tabela 5.4, respectivamente. Semelhante ao relatado na literatura, houve uma relação linear entre a intensidade de espalhamento de luz pela solução e a concentração de nanopartículas. O LOD e LOQ calculados a partir da curva de ajuste linear estavam na faixa de 1,2 pM até 4,1pM e 3,7pM até 12,4pM, respectivamente. Esses valores são maiores que os resultados medidos para AuNPs de 40 nm relatados por Liu *et al* <sup>(192)</sup>, o que era esperado com base na seção transversal de luz relativamente menor das nanopartículas de ouro deste estudo (12-20nm). Consequentemente, os AuNPs@CMC com diâmetro médio de 12 nm apresentaram os maiores valores de LOD e LOQ. Para o imunoenensaio, como a aglutinação dos nanoconjugados de AuNPs@CMC causada pela afinidade antígeno-anticorpo, a seção transversal da solução da luz dos dímeros será maior que os imunoenensaio individuais (ou seja, desacoplados), reduzindo os valores LOD de LOQ e , melhorando, portanto, a sensibilidade do imunoenensaio.

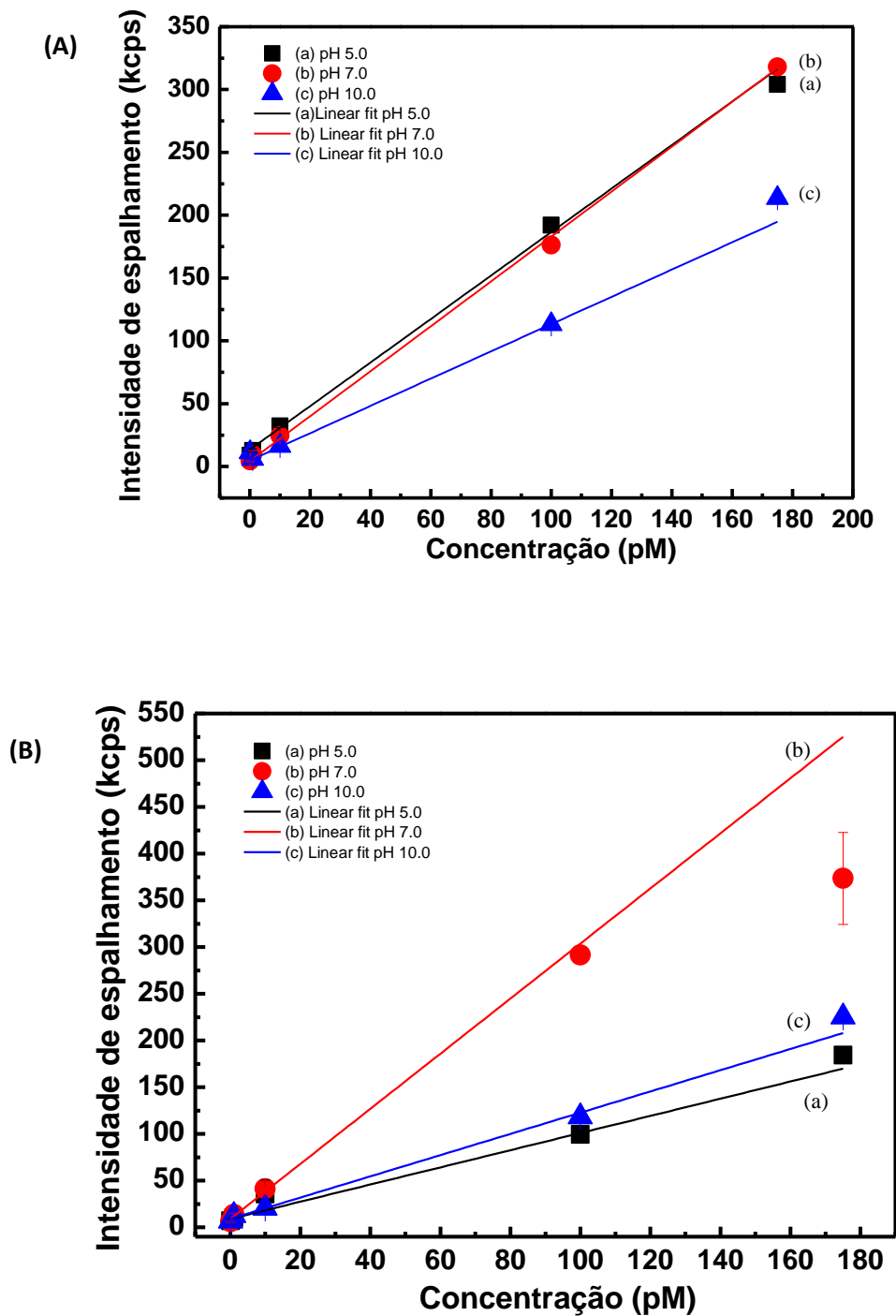


Figura 5.54 - Intensidade de espalhamento de luz pela dispersão coloidal de (A) AuNPs@CMC e (B) AuNPs@CMC\_PolyArg em diferentes concentrações e 3 condições de pH ácido, neutro e alcalino: (a) pH (5,0 ± 0,1), (b) pH (7,0 ± 0,1) e (c) pH (10,0 ± 0,1) conforme determinado a partir das medições DLS (barra de erro: desvio padrão, n=3).

Tabela 5.4 - Dados lineares de regressão e valores de LOD e LOQ para intensidade de espalhamento de luz em função da concentração de AuNPs estabilizadas com polímero em 3 condições de pH.

<b>Tabela 5.4 – Sensibilidade para medidas de espalhamento de luz em coloides de AuNPs@CMC</b>		
	<b>AuNPs@CMC</b>	<b>AuNPs@CMC_PolyArg</b>
<b>pH = 5,0±0,1 (ácido)</b>	$y=13.43462+1.73199x$ $R^2 = 0.99687$ LOD = 4,1 pM LOQ = 12,4 pM	$y=9.08305+0.91865x$ $R^2 = 0.99628$ LOD = 2,1 pM LOQ = 6,4 pM
<b>pH = 7,0±0,1 (neutro)</b>	$y=4.39542+1.78714x$ $R^2 = 0.99975$ LOD = 3,1 pM LOQ = 9,3 pM	$y=8.88818+2.94909x$ $R^2 = 0.98204$ LOD = 1,2 pM LOQ = 3,7 pM
<b>pH = 10,0±0,1 (alcalino)</b>	$y=4.82014+1.08531x$ $R^2 = 0.99918$ LOD = 2,4 pM LOQ = 7,1 pM	$y=9.10874+1.13636x$ $R^2 = 0.99080$ LOD = 1,7 pM LOQ = 5,3 pM

### 5.3.11. Nanobiosensor for HIV-1 baseado em espalhamento dinâmico de luz (LIA)

Combinando as propriedades de forte intensidade de espalhamento de luz pela solução de AuNPs@CMC, com a capacidade de medida de tamanho por DLS, uma técnica de biodeteção nomeada de LIA foi desenvolvida. Considerando o uso de espalhamento de luz pela dispersão coloidal de AuNPs@CMC desenvolvemos um nanoimunosensor ativo para a detecção de anticorpos de HIV-1, sendo os resultados observados na figura 5.55. Neste design, quando as soluções de AuNPs@CMC-gp41 (antígeno) e AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV (anticorpos HIV-1) foram misturadas, verificou-se um aumento notável do valor  $H_D$  para aproximadamente  $131 \pm 10$  nm. Este aumento no valor de  $H_D$ , detectado por DLS, foi causado pela formação de agregados com ambos os imunoconjugados em meio coloidal aquoso, devido à afinidade muito alta entre moléculas do anticorpo e do antígeno. Além disso, a sensibilidade do imunoenensaio foi determinada como tipicamente na faixa entre 5-10nM de antígeno ou anticorpo no meio. Assim, os imunoconjugados AuNPs@CMC-gp41 e AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV foram acoplados, através da formação de agregados de AuNPs induzida pela ligação específica entre antígenos e anticorpos, que foram efetivamente detectados pelas medidas de espalhamento de luz. Para investigar a possível interferência de outras proteínas comumente presentes no soro sanguíneo na resposta do nano sensor LIA, uma solução de BSA (como proteína globular modelo) foi adicionada à dispersão coloidal e os resultados são apresentados na Figura 5.55 (inset). A mesma tendência foi verificada para ambos os sistemas, antes e depois de adicionar BSA ao ensaio LIA, que provou a alta afinidade, sensibilidade e especificidade de ligação dos imunoconjugados AuNPs@CMC detectados até o nível nanomolar, mesmo na presença de outras proteínas interferentes (BSA) no meio. Note-se que, para aplicações clínicas prospectivas, de forma semelhante a muitos protocolos imunológicos atuais, essa estratégia requer a extração e purificação prévias do anticorpo do soro sanguíneo do paciente a serem conjugados com AuNPs para realizar o ensaio LIA.

Além disso, as curvas normalizadas de correlação mostradas na Figura 5.55B confirmam o comportamento desses nanoconjugados na solução. Essencialmente, a flutuação da intensidade em função do tempo através da função de correlação que depende do tamanho, massa e inércia hidrodinâmica das nanopartículas em soluções aquosas coloidais <sup>(193)</sup>. Assim, a variação observada para valores mais elevados do

tempo ( $\tau$ ), demonstrou inequivocamente as interações efetivas entre AuNPs@CMC-gp41 (Figura 5.55(A) e AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV (Figura 5.55(B)) causada pelo aumento da inércia dos sistemas acoplados a anticorpos (resposta LIA positiva, Figura 5.55).

Para confirmar a especificidade do nano biossensor desenvolvido, dispersões coloidais do conjugado AuNPs@CMC-gp41 e da amostra de AuNPs@CMC\_PolyArg sem conjugação de anticorpos (sem abHIV) foram misturadas. Neste ensaio, não foi observada nenhuma variação relevante do valor  $H_D$ . Isso revelou a falta de interações de afinidade devido à ausência de anticorpos para o bioreconhecimento do receptor gp41 (teste negativo, Figura 5.55(B)).

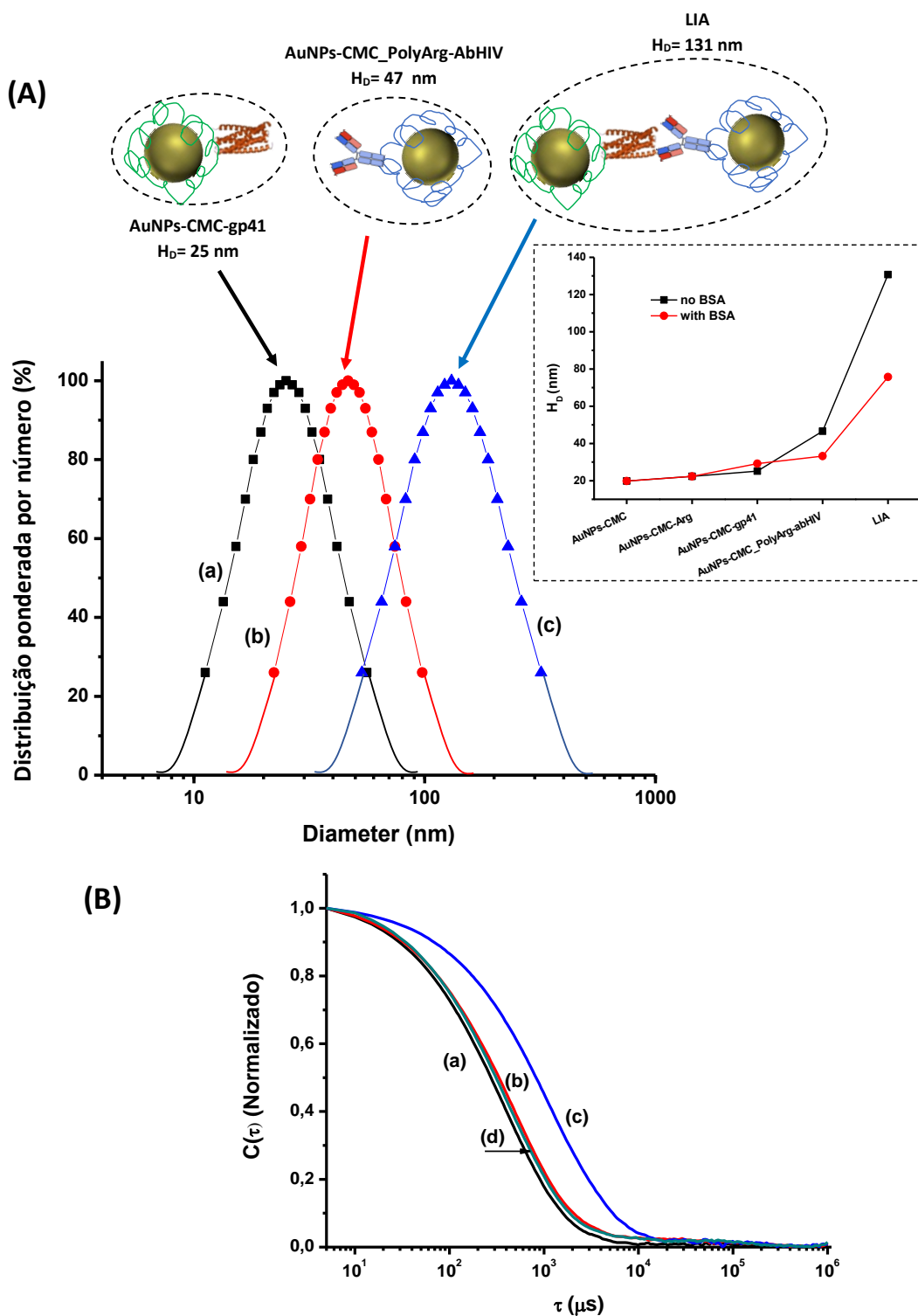


Figura 5.55 - (A) Distribuição de tamanho hidrodinâmico de imunoconjugadas e (B) curvas de correlação normalizadas: (a) AuNPs@CMC-gp41; (b) AuNPs@CMC\_PolyArg-abHIV; (c) Ensaio LIA; (d) teste negativo: mistura de dispersões coloidais de AuNPs@CMC-gp41 e AuNPs@CMC\_PolyAr sem conjugação de anticorpos (sem bHIV) (apenas apresentada em (B)).

### 5.3.12 Teste ELISA para validação do nanobiossensor LIA

A viabilidade do uso da técnica de DLS para servir como um método de biosensoramento fácil (LIA), usando nanoconjugados de biopolímeros AuNPs biologicamente funcionalizados, foi validada para a detecção de concentrações significativamente reduzidas de antígenos gp41 (1-10nM) relacionados a infecções por HIV-1. Os resultados de detecção por DLS para a detecção da infecção do HIV1 foram validados com base no ensaio imunoenzimático (ELISA) <sup>(161)</sup>, conforme ilustrado na Figura 5.56. Neste ensaio os imunoconjugados AuNPs@CMC-gp41 foram testados quanto a efetividade de detecção de ligações do tipo antígeno-anticorpo e provou que o novo imunoconjugado projetado, efetivamente retinha seus sítios ativos após conjugação química com o biopolímero, mantendo a especificidade necessária para o processo de reconhecimento biológico.

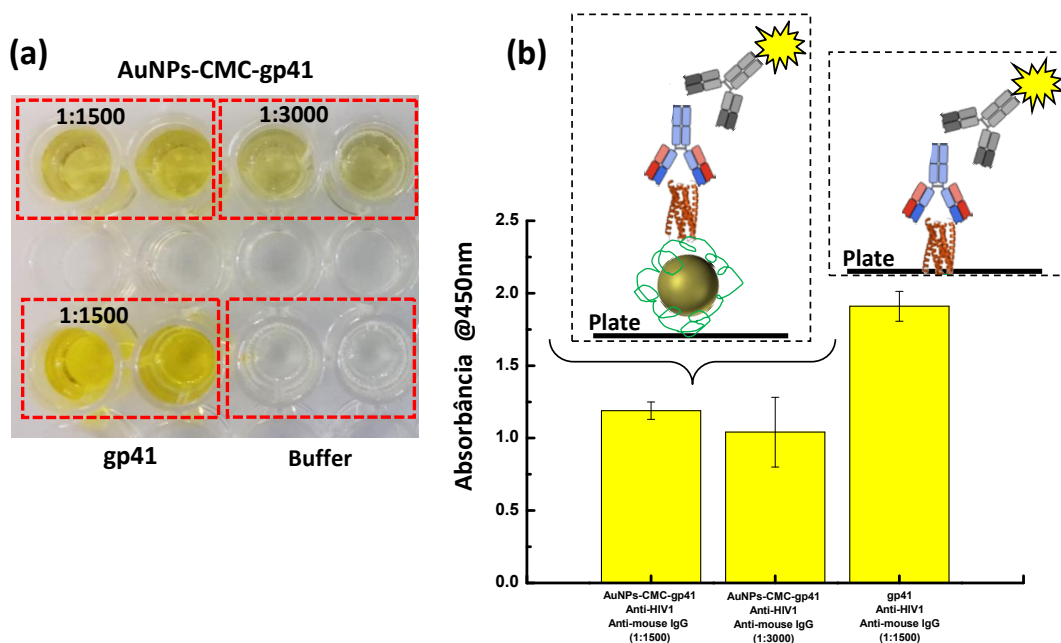


Figura 5.56 - Ensaio de ELISA. (a) Fotografia digital de parte da placa ELISA de 96 poços usada nos experimentos. 1ª fila: poços sensibilizados com AuNPs-gp41 e testado com anticorpo monoclonal anti-HIV1 em duas concentrações de 1:1500 e 1:3000 (anticorpo: tampão, v/v) de anticorpo secundário. 2ª fila: poços sensibilizados com a proteína gp41 e testado com anticorpo monoclonal anti-HIV1 como um controle positivo a uma concentração de 1:1500 e com tampão de carbonato/bicarbonato como controle. (b) Medidas de absorção em  $\lambda=450\text{nm}$  (barra de erro: desvio padrão,  $n=3$ ).

Além das respostas qualitativas e semiquantitativas apresentadas, foram realizados ensaios adicionais para investigar a aplicação potencial deste sistema como uma nano plataforma inovadora de biossensoriamento, com base na formação de agregados detectada por DLS em suspensões coloidais, onde diferentes concentrações de anticorpo e antígeno foram testadas usando o método LIA. No entanto, devido aos sérios riscos potenciais de biossegurança e razões éticas, para evitar o manuseio de amostras infecciosas positivas para HIV-1 a partir de soro humano, foi projetado um sistema equivalente para "imitar" a detecção de HIV-1 sendo imunoconjugados com AuNPs@CMC. Este sistema foi baseado na alta semelhança do vírus da anemia infecciosa dos equídeos (EIAV) para a produção do anticorpo e da glicoproteína 45 (gp45), que desempenham um papel semelhante ao da gp41 no HIV ao mediar a infecção por células hospedeiras do vírus <sup>(194)</sup>. Portanto, o protocolo de acoplamento de anticorpo (abEIAV) e antígeno (gp45) aos conjugados de AuNPs@CMC foi realizado analogamente como o procedimento de HIV-1. As concentrações dos imunoconjugados AuNPs@CMC foram variadas nas dispersões coloidais para a elaboração de curvas de correlação usando a resposta bioquímica antígeno-anticorpo detectada pelo método analítico LIA. Os resultados das alterações no  $H_D$  em função das concentrações de conjugados AuNPs@CMC-anticorpo nas suspensões são apresentados na Figura 5.57. Como pode ser observado, para concentrações superiores a 16 pM, o  $H_D$  apresentou valores mais altos devido à ligação de dois ou mais imunoconjugados através da afinidade específica antígeno-anticorpo, o que comprovou o teste positivo por LIA. Os valores de  $H_D$  nivelaram-se e ~220nm para concentrações superiores a 32 pM, devido à saturação dos sítios de ligação e ao equilíbrio de agrupamento na solução. Por outro lado, para concentrações inferiores a 16pM, não são observadas variações significativas quando comparadas com a referência de conjugados desacoplados. De acordo com a literatura <sup>(195-198)</sup>, a correlação entre a dimensão  $H_D$  do diâmetro hidrodinâmico e a concentração de nanoconjugados (baseados em AuNPs@CMC) adquiridos pelo método de espalhamento de luz para biossensores usando o ensaio LIA pode ser ajustada em um modelo logístico não linear de quatro parâmetros como mostrado na Equação 5.5.

$$H_D = [A_2 + (A_1 - A_2)] / [1 + (x/x_0)] \quad (\text{Eq. 5.5})$$



Onde os parâmetros foram determinados pelo ajuste como sendo:  $A=29.6\pm 1.2$ ,  $A_2=256.8\pm 50.7$ ,  $x_0= 19.7\pm 6.4$ ,  $p=5.3\pm 1.4$  e  $R^2=0.989$ . O coeficiente de variação (CV % ou desvio padrão relativo, RSD) da curva ajustada foi inferior a 10% para todas as concentrações testadas. Com base nesses resultados, o limite de detecção (LOD) foi de 16pM (correlação linear,  $R^2=0,99$ ) para o nanobiosensor LIA utilizando imunocombinados baseados em AuNPs@CMC. Esses resultados validaram os imunocombinados AuNPs@CMC desenvolvidos neste estudo como nano plataformas viáveis para a construção de biossensores com base em espalhamento de luz em agregados de antígenos para o diagnóstico ou detecção de doenças ou disfunções específicas, incluindo HIV-1 e outras doenças relacionadas ao vírus. Além disso, em vista dos resultados deste estudo, o método LIA pode ser antecipado como um imunoenensaio fácil, rápido, acessível, sensível e confiável para a detecção de biomarcadores HIV-1, variando de nM até a faixa de concentração de pM, através das interações de alta afinidade entre o antígeno gp41 e o anticorpo anti-HIV em meio coloidal aquoso.

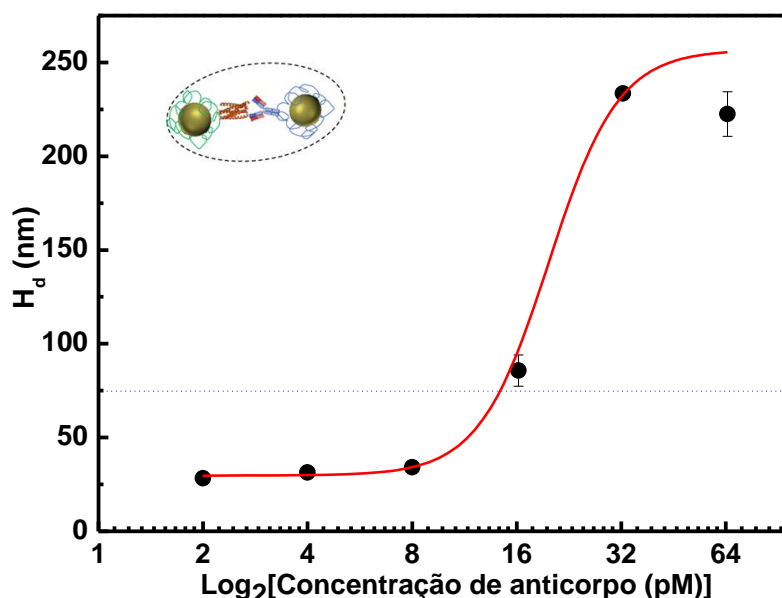


Figura 5.57 - (a) Curva de dose e resposta LIA (HD) (AuNPs@CMC\_PolyArg-abEIAV e AuNPs@CMC-pgp45); HD determinado a partir de medidas de DLS em função da concentração de anticorpos. (Barra de erro: SD, n=3, tracejada-linha: Referência H<sub>D</sub> conjugado desvinculado).

## 5.4 - Síntese, caracterização e estudo das propriedades ópticas de ZnS@CMC

O objetivo geral deste projeto de pesquisa, foi o desenvolvimento de nanoheterojunções metal/semicondutor Au@ZnS, e como meio fundamental para esse objetivo, foi sistematicamente investigado o efeito dos parâmetros de processamento durante a síntese de QDts de ZnS, estabilizados pelo biopolímero CMC (ZnS@CMC).

Como um polímero aniônico de cadeia sensível ao pH e solúvel em água, a CMC pode ser um excelente agente para estabilização de QDts de ZnS, devido as interações dos cátions ( $Zn^{2+}$ ) com cargas negativas da CMC ( $R-COO^-$ ), formando quelatos  $COO^-/Zn^{2+}$  de acordo com a Eq. 5.6, e devido à estabilização coloidal por impedimento estérico e/ou repulsão eletrostática entre cadeias poliméricas solvatadas carregadas negativamente no meio aquoso. A estabilidade coloidal pode ser atribuída ao crescimento, termodinâmica e cineticamente favorável, de nanocristais de ZnS em fase sólida com base no baixo produto de solubilidade ( $K_{sp} = 1,0 \times 10^{-23}$ )<sup>(95)</sup>, combinado com a resistência da CMC e do ZnS à degradação na faixa ácido-alcalina de pH selecionada para os procedimentos experimentais (acima de 3,5 e abaixo de 10,5) devido ao pKa.



### 5.4.1 Caracterização óptica de nanoconjugados ZnS@CMC

A síntese foi realizada variado à estequiometria e o pH nas condições de reação. Os resultados da espectroscopia UV-visível (UV-vis) e espectroscopia de fotoluminescência (PL) dos nanoconjugados ZnS@CMC em meio ácido (pH 3,5±0,5), neutro (pH 7,5±0,5) e alcalino (pH 10,5±0,5), sintetizados com três razões estequiométricas (Zn:S), são mostrados em Fig. 5.58. Como tendência geral, todos os espectros UV-vis (Fig. 5.58 (a-c)) exibiram bandas de absorção bem definidas entre 270 e 330nm (4,49 a 3,76eV), deslocadas para a região do azul nos espectros, sendo assim um deslocamento hipsocrômico em comparação com o esperado para ZnS “bulk” (borda de absorção em  $\lambda = 343\text{nm}$ , 3,61eV). Essa banda é associada com a primeira transição excitônica de QDts no regime de confinamento quântico<sup>(199-200)</sup>. Os valores de

energia de band gap ( $E_g$ ) dos QDs de ZnS foram estimadas usando a "relação Tauc"<sup>(201)</sup>, com os resultados apresentados na Fig. 5.59. A determinação da energia de band gap confirmou que os nanocristais crescidos com mediação da CMC, apresentam  $E_g$  maior do que o valor esperado para o ZnS "bulk" ( $E_{\text{bulk}} = 3,61\text{eV}$ ). Além disso, de acordo com a literatura, a energia band gap de QDs é significativamente afetada pelo tamanho dos nanocristais, o que lhes dá um conjunto único de propriedades optoeletrônicas dependentes do tamanho. Assim, com base na equação de correlação semiempírica (Eq. 3.1)<sup>(202)</sup>, os diâmetros ( $2r$ ) dos QDs de ZnS@CMC produzidos em pH e concentrações distintas foram calculados com base nos valores de  $E_g$  e variaram entre 3,3 a 4,5nm, que são inferiores ao raio de Bohr do ZnS ( $2r_B \sim 5,5\text{nm}$ )<sup>(203)</sup>.

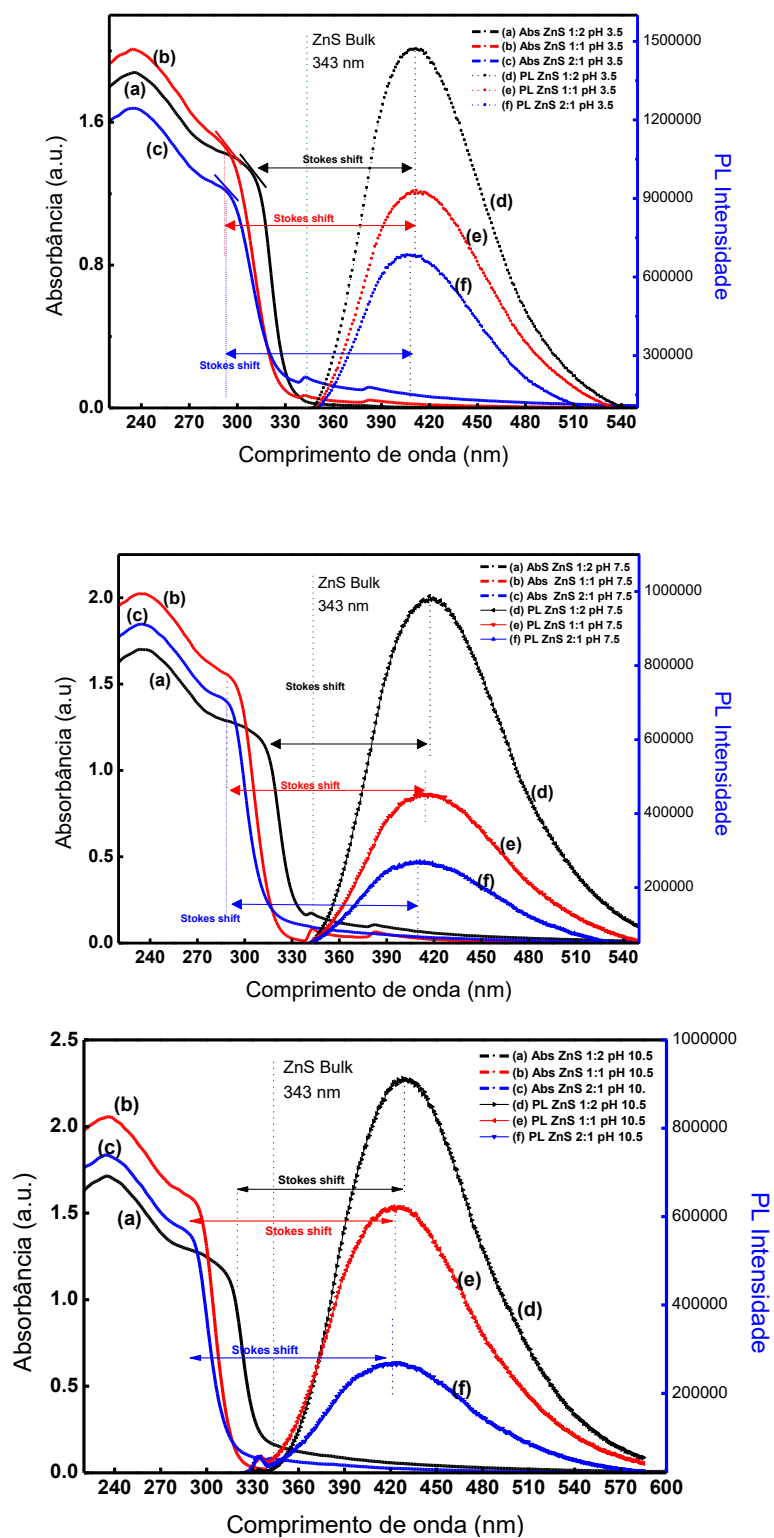


Figura 5.58 - Espectros de UV-vis e de PL (d-f) de ZnS@CMC em dispersão coloidal para diferentes pHs (A) ( $3,5 \pm 0,1$ ), (B) ( $7,5 \pm 0,1$ ) e (C) ( $10,5 \pm 0,1$ ) e Zn:S ((a,d) 1:2; (b,d) 1:1; (c,f) 2:1).

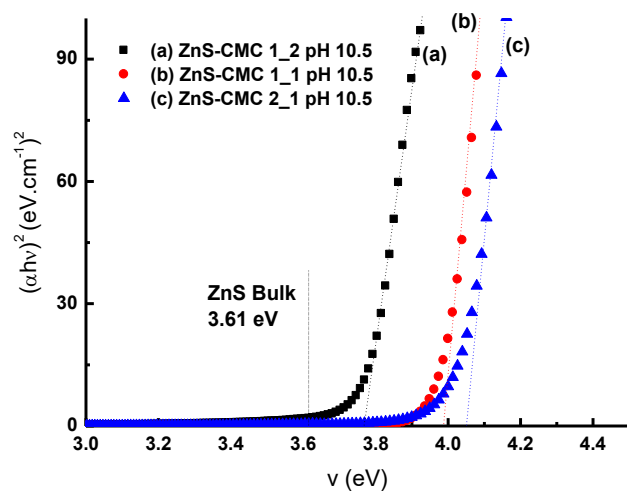
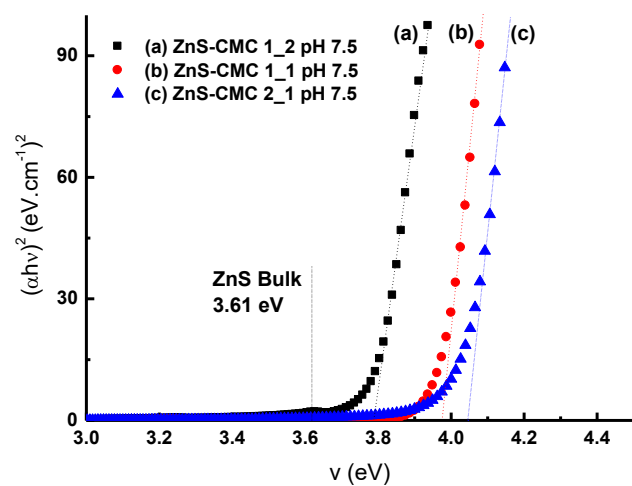
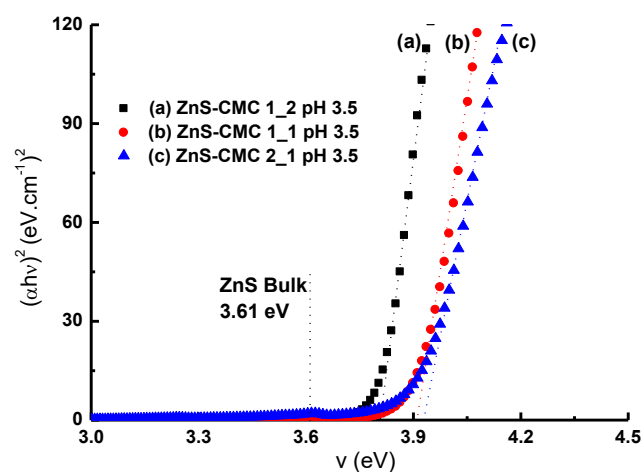


Figura 5.59 - Band gap óptico usando a relação "Tauc" de ZnS@CMC em dispersões coloidais para diferentes valores de pH ((A)  $(3,5 \pm 0,1)$ , (B)  $(7,5 \pm 0,1)$  e (C)  $(10,5 \pm 0,1)$ ). Zn:S ((a) 1:2; (b) 1:1; (c) 2:1).

Os espectros de fotoluminescência (PL) (Fig. 5.58 (d-f)) dos QDts de ZnS@CMC tipicamente exibem picos máximos de emissão predominantemente dentro da faixa de comprimento de onda de 400 a 430nm (violeta). Também foram observados significativos Stokes-shift ( $> 100\text{nm}$ ) e largura à meia altura (FWHM) variando de 89 e 106nm. Esses resultados estão de acordo com o comportamento típico do ZnS, onde as emissões são predominantemente baseadas em sítios ativados por defeitos, sendo a transição óptica da banda de valência para banda de condução geralmente ausente. Isso significa que os defeitos na estrutura (vacâncias de enxofre ( $V_S$ ) e metal ( $V_{Zn}$ ), e defeitos intersticiais,  $I_S$  e  $I_{Zn}$ ) atuam como armadilhas eficientes para elétrons, buracos, e portadores da carga do éxciton, conduzindo à recombinação radiativa em energias mais baixas (comprimentos de onda mais elevados) do que a emissão excitônica. De acordo com os diagramas de níveis de energia relatados na literatura para ZnS<sup>(204-208)</sup>, o  $V_S$  e  $V_{Zn}$  são estados localizados mais perto da banda de condução, enquanto o enxofre em sítios intersticiais ( $I_S$ ) e vacâncias de zinco ( $V_{Zn}$ ) estão mais perto da banda valência. Nesse sentido, esperava-se criar diferentes populações dos tipos de defeitos ( $V_{Zn}$ ,  $V_S$ ,  $I_{Zn}$  e  $I_S$ ) afetados pelas mudanças de parâmetros de processamento na síntese e interações com espécies de carboxilatos da CMC que resultaram nas curvas de emissão largas.

Os resultados UV-Vis e PL demonstraram que os QDts de ZnS@CMC foram efetivamente produzidos e estabilizados pelo biopolímero CMC usando um processo coloidal aquoso à temperatura ambiente e ainda com atividade fotoluminescente.

Mais especificamente, essas propriedades ópticas foram analisadas considerando os efeitos do pH (ácido, neutro e alcalino) e a concentração de precursores (excesso de cátions, estequiométrico e excesso de ânions) tendo em vista o mecanismo de formação e estabilização dos nanocristais associadas à química envolvida no processo coloidal. Os resultados são resumidos na Tabela 5.5. Na figura 5.60, são apresentados os resultados comparados de band gap e tamanhos calculados pelo Tauc, variando com o pH e com a estequiometria.

A influência da relação de concentração dos precursores Zn:S durante a síntese nas propriedades ópticas de QDts de ZnS foi analisada considerando a dependência de tamanho com a absorção UV-vis. Assim, no mesmo pH, no caso do excesso de íons de zinco (Zn: S = 2:1) em solução, as interações entre as cátions ( $Zn^{2+}$ ) e os grupos de

carboxilatos da CMC favoreceram a formação de complexos mais estáveis do metal com o polímero ( $Zn^{2+}/RCOO^-$ ).

Consequentemente, a injeção de concentração relativamente menor de sulfetos ( $S^{2-}$ ) promoveu mais locais para a nucleação de nanocristais ZnS@CMC, sendo consumido mais rapidamente a concentração de  $S^{2-}$  em solução e restringindo o crescimento, levando à formação de QDts menores. Inversamente, em concentrações mais elevadas de sulfetos durante a síntese ( $Zn:S = 1:2$ ) a tendência oposta foi observada devido à competição da espécie aniônica ( $RCOO^-$  e  $S^{2-}$ ) para interações com espécies  $Zn^{2+}$ , levando a complexos menos estáveis ( $Zn^{2+}/RCOO^-$ ) e, assim, favorecendo o crescimento de QDts de ZnS@CMC de tamanhos maiores. Como esperado, na proporção estequiométrica de precursores ( $Zn:S = 1:1$ ), foram produzidos nanocristais de tamanho intermediário na dispersão coloidal.

Tabela 5.5. Resumo das propriedades de QDts de ZnS@CMC.

(ZnS “bulk” :  $E_g = 3.61$  eV – 343 nm)

pH	Zn:S	Band Gap ( $E_g$ ) (eV)	2r (nm)	Stokes-shift (nm)	PL Max (nm)	PL FWHM (nm)
3,5	1:2	$3,80 \pm 0,05$	$4,31 \pm 0,05$	$106 \pm 2$	$411 \pm 2$	$89 \pm 3$
	1:1	$3,90 \pm 0,05$	$3,84 \pm 0,05$	$116 \pm 2$	$411 \pm 2$	$96 \pm 3$
	2:1	$3,93 \pm 0,05$	$3,72 \pm 0,05$	$112 \pm 2$	$407 \pm 2$	$89 \pm 3$
7,5	1:2	$3,79 \pm 0,05$	$4,37 \pm 0,05$	$106 \pm 2$	$417 \pm 2$	$97 \pm 3$
	1:1	$3,97 \pm 0,05$	$3,59 \pm 0,05$	$121 \pm 2$	$413 \pm 2$	$98 \pm 3$
	2:1	$4,04 \pm 0,05$	$3,39 \pm 0,05$	$121 \pm 2$	$410 \pm 2$	$97 \pm 3$
10,5	1:2	$3,76 \pm 0,05$	$4,56 \pm 0,05$	$116 \pm 2$	$428 \pm 2$	$105 \pm 3$
	1:1	$3,98 \pm 0,05$	$3,56 \pm 0,05$	$131 \pm 2$	$423 \pm 2$	$106 \pm 3$
	2:1	$4,05 \pm 0,05$	$3,36 \pm 0,05$	$132 \pm 2$	$421 \pm 2$	$106 \pm 3$

O efeito do pH sobre os processos de nucleação e crescimento para a produção de QDts de ZnS@CMC em solução aquosa foi claramente observado como descrito em Fig. 5.60, associado à energia de Band gap ( $T_{auc}$ ,  $E_g$ ) e tamanho médio estimado, respectivamente. Como a CMC é um biopolímero sensível ao pH ( $RCOO^- + H^+ \leftrightarrow COOH$ ), a macromolécula desempenhou um papel importante na estabilização dos QDts de ZnS@CMC. Em condições ácidas (pH = 3,5) e neutras (pH = 7,5), os valores obtidos

de  $E_g$  foram menores (Figura 5.60A) do que condições alcalinas ( $\text{pH} = 10,5$ ), para as sínteses com excesso de  $\text{Zn}^{2+}$  (2:1) e estequiométrica (1:1).

Estes resultados foram explicados com base na maioria dos grupos carboxílicos protonados ( $\text{Zn}^{2+}/\text{RCOO}^- \leftrightarrow \text{RCOOH}$ ) em  $\text{pH}$  baixo ( $\text{pH} < \text{ou } \sim \text{pK}_a$ ) reduzindo a atração aniônica com os cátions metálicos em solução (excesso de  $\text{Zn}^{2+}$ ) ou com a superfície de nanopartículas de  $\text{ZnS@CMC}$  crescidas. A menor estabilização produziu nanopartículas  $\text{ZnS@CMC}$  maiores. Por outro lado, em condições alcalinas ( $\text{pH} = 10,5 \gg \text{pK}_a \sim 5,0$ ), os grupos carboxílicos da CMC estão predominantemente desprotonados ( $\text{RCOOH} \rightarrow \text{RCOO}^-$ ) formando carboxilatos negativamente carregados no meio. Esses grupos atuam como ligantes multidentados, melhorando a atração eletrostática com íons  $\text{Zn}^{2+}$  em solução e produzindo menores QDts de  $\text{ZnS@CMC}$  (maior  $E_g$ ). No entanto, para a síntese com excesso de  $\text{S}^{2-}$  ( $\text{Zn}:\text{S} = 1:2$ ), esse efeito não foi claramente evidenciado, onde praticamente nenhuma alteração relevante dos valores de  $E_g$  (Fig. 5.60(A)) foi observada de condições ácidas para alcalinas, apesar das pequenas alterações dos tamanhos estimados (Fig. 5.60(B)), que dependem da equação semiempírica não linear (Eq 3.1). Esses resultados foram interpretados como o efeito do excesso de sulfetos superando a dependência do  $\text{pH}$  para a nucleação e o crescimento dos QDts de  $\text{ZnS@CMC}$ .

A síntese com excesso de  $\text{S}^{2-}$  em solução, independentemente do  $\text{pH}$ , produziu QDts de  $\text{ZnS@CMC}$  maiores (Menor  $E_g$ ) em comparação com as outras condições. Essa tendência foi atribuída a diferentes cinéticas termodinâmicas de nucleação/crescimento causadas por um equilíbrio mais complexo de cargas eletrostáticas em solução.

Uma abordagem semelhante foi utilizada para a análise dos efeitos do  $\text{pH}$  e concentração de precursores durante a síntese nos resultados de PL de QDts de  $\text{ZnS@CMC}$ , mas considerando que as propriedades de emissão estão relacionadas a mecanismos muito diferentes em comparação com os fenômenos de absorção. Assim, todos os espectros de fotoluminescência dos QDts de  $\text{ZnS@CMC}$  (Fig. 5.58) normalmente exibiam picos de emissão máxima na faixa de comprimento de onda de 410 a 430nm com o deslocamento Stokes relacionada aos espectros de absorção correspondentes (detalhes na Tabela 5.5). Observou-se claramente que, no mesmo valor de  $\text{pH}$ , a maior concentração de sulfetos ( $\text{Zn}:\text{S} = 1:2$ ) produziu intensidades mais



elevadas de PL. Por outro lado, a maior concentração de  $Zn^{2+}$  (Zn:S = 2:1) causou menor intensidade de PL. Em relação ao pH do meio, para concentrações específicas de precursores, a síntese em condições ácidas (pH = 3,5) provocou maiores intensidades de PL em relação às soluções neutras e alcalinas. Assim, os QDts de ZnS@CMC sintetizados com uma proporção molar não estequiométrica de excesso de sulfetos (Zn:S = 1:2) e condições ácidas (pH = 3,5 < pKa) demonstraram a maior emissão de PL, o que é consistente com a literatura de QDts de ZnS <sup>(91, 113-115)</sup>. Essa tendência foi explicada pela consideração dos processos de nucleação e crescimento dos QDts de ZnS, que foram afetados pelos parâmetros de síntese produzindo QDts de com tamanhos variáveis. Como discutido anteriormente, a combinação de um excesso de  $Zn^{2+}$  com condições neutras ou alcalinas durante a síntese, gerou QDts de ZnS relativamente menores (Fig. 5.60), com maior quantidade de defeitos superficiais, que são o processo físico dominante nas propriedades de luminescência, criando vias não radiativas que podem ser responsáveis pela dissipação da emissão de luz, reduzindo a intensidade de emissão de PL. Por outro lado, a síntese de QDts de ZnS usando excesso de  $S^{2-}$  em uma proporção molar de Zn:S = 1:2 produziu nanocristais maiores e, portanto, reduziu o número relativo de átomos na superfície, o que pode ter favorecido significativamente a emissão de PL. Além disso, a maior emissão de PL também pode ser atribuída ao fato de que a CMC agiu como um polímero aniônico de nivelamento, repelindo o excesso de sulfetos nas superfícies dos QDts de ZnS@CMC e reduzindo a transferência de carga (através de vias não radiativas) do núcleo com a casca e com a solução, o que pode ter contribuído com a emissão de PL. No entanto, é importante destacar que estes são insights de uma interpretação preliminar dos fenômenos muito complexos associados às interações de matéria-luz nesses nanohíbridos baseados em semicondutores (ZnS@CMC) gerando pares excitônicos ( $e^-/h^+$ ), que têm inúmeras vias de recombinação.

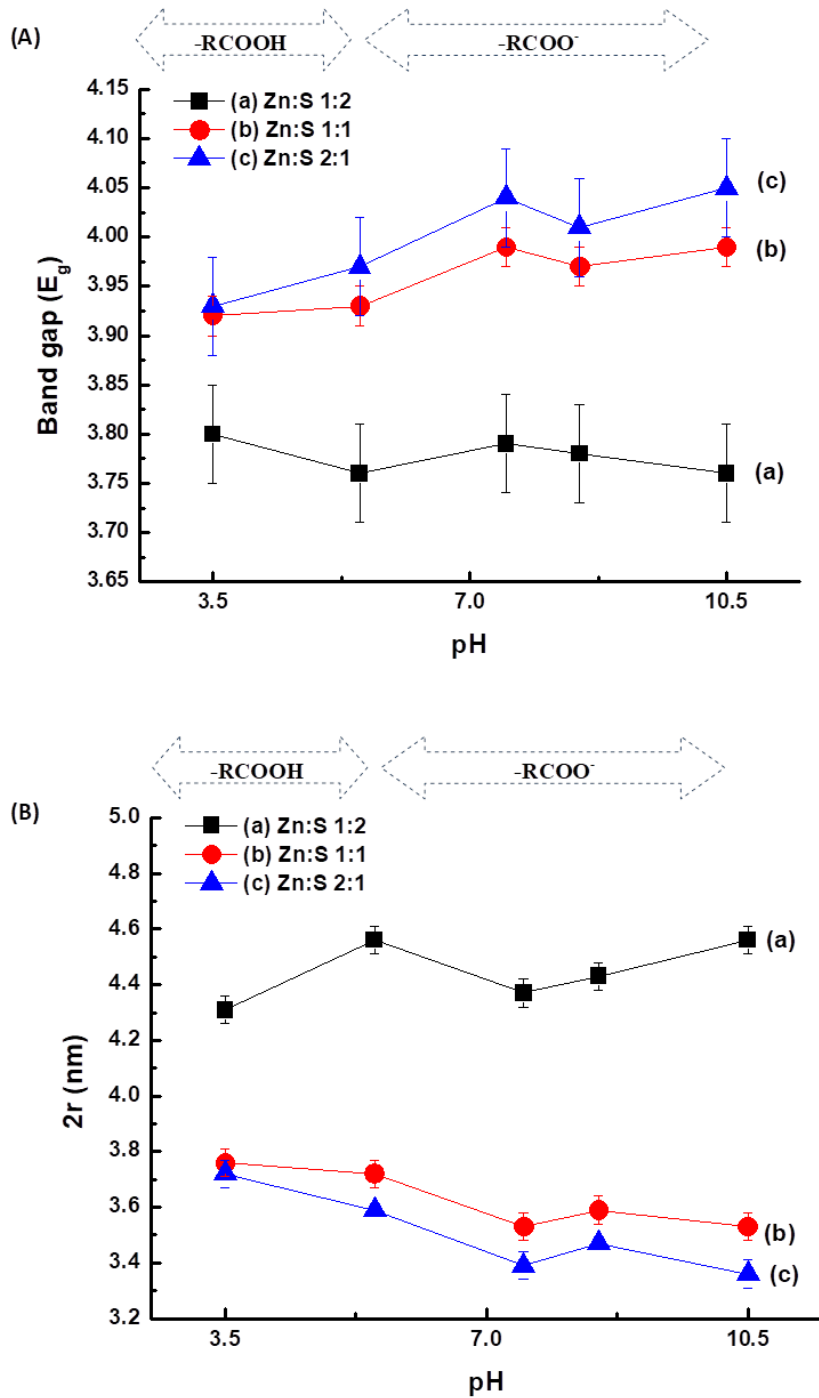


Figura 5.60 - (A) Band gap óptico ( $E_g$ ) e (B) diâmetro ( $2r$ ) de ZnS@CMC em função do pH em diferentes proporções molares (Zn:S): (a) 1:2, (b) 1:1 e (c) 2:1 (barra de erro: desvio padrão (SD), replicação ( $n \geq 3$ )).

As propriedades ópticas dos QDs de ZnS sintetizados foram investigadas através de mapas de 3D de excitação/emissão, e os resultados são mostrados em Fig. 5.61. Estes resultados são complementares aos espectros de PL (Fig. 5.58), mostrando a dependência da emissão com a variação da energia da fonte de irradiação. Como uma tendência geral, observaram-se emissões significativas de PL, tipicamente dentro da região visível do espectro de luz 3D ( $\lambda_{em}$  variando de = 350nm a 500nm (violeta-azul); máxima 410-430nm) após excitação com comprimento de onda ( $\lambda_{exc}$ ) de ~250nm a ~320nm. Nestas curvas, confirmaram-se os resultados da Fig.5.58, onde a maior emissão de PL de fotoluminescência foi obtida para a ZnS@CMC sintetizados com um excesso de sulfetos (Zn:S = 1:2) e condições ácidas (pH = 3,5 < pKa). Além disso, pequenas mudanças para comprimentos de onda mais baixos da região de excitação para amostras com Zn:S = 1:2 em comparação com as outras concentrações, o que foi atribuído à soma das contribuições de densidade de defeitos superficiais e estados armadilha, limpando ânions em solução, tamanho e estrutura cristalina dos QDs, afetando os mecanismos de geração de carga e recombinação. Além disso, observou-se um mapa de excitação/emissão relativamente mais difuso para condições alcalinas (pH = 10,5), atribuído ao excesso de espécies de hidróxidos no meio que afetam o equilíbrio geral de cargas nas nano interfaces de ZnS@CMC/solução.

Os valores de QY são apresentados na Figura 5.62 para cada condição de síntese, mostrando claramente sua dependência dos parâmetros de síntese suportados pela discussão anterior. Ficou evidente a relação entre o tamanho dos QDs de ZnS e os resultados do QY (Fig. 5.62), associados à grande proporção superfície/volume de nanocristais menores que favorece a deterioração não-radiativa dos transportadores de carga (isto é, menor QY). Os nanoconjugados ZnS@CMC com a maior emissão de PL (Zn:S 1:2 a pH 3,5) apresentaram QY médio = 0,3%.

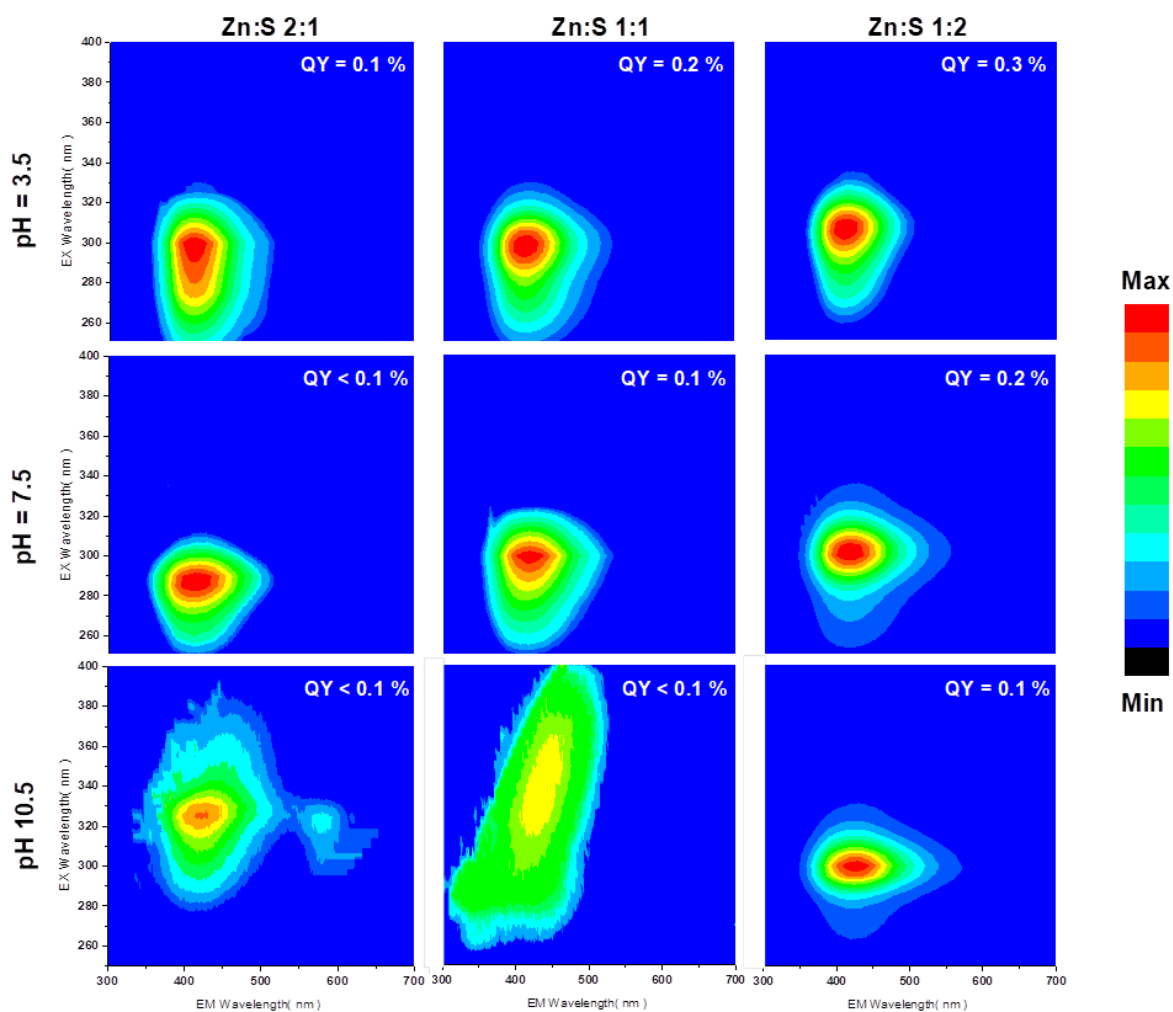


Figura 5.61 - Curvas de excitação-emissão 3D medidas nas diferentes proporções de precursores e pH.

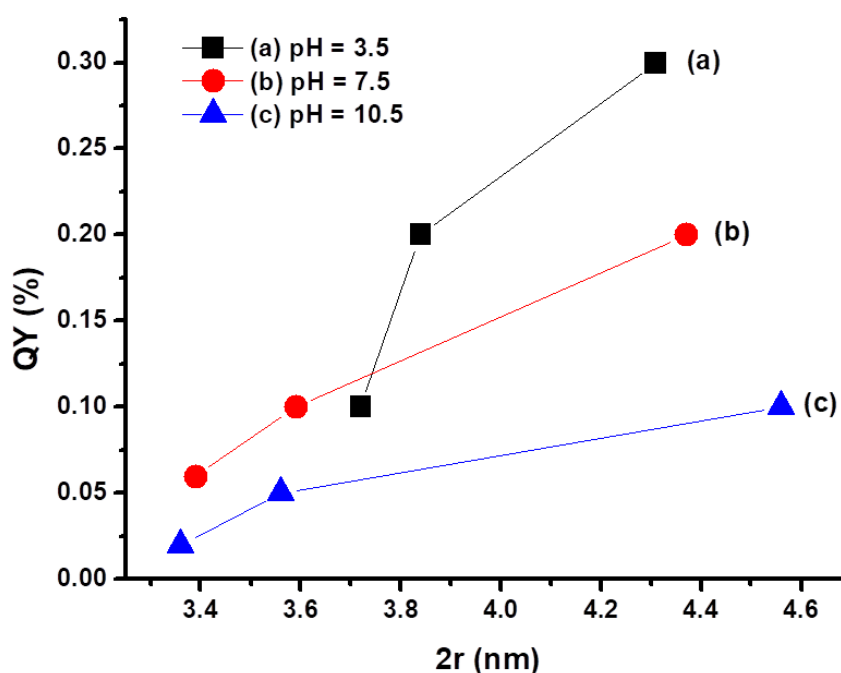


Figura 5.62 - Relação do QY com tamanho dos QDts de ZnS (2r) em função do pH: (a) 3,5 (ácido); (b) 7,5 (neutro); e (c) 10,5 (alcalina).

Como dito anteriormente, o excesso de  $[S^{2-}]$  em relação ao  $[Zn^{2+}]$  produziu QDts de ZnS@CMC maiores e também provocou disponibilidade de espécies de sulfeto em solução, que podem atuar como “capturadores de buracos” que influenciam o processo de transferência de carga nas interfaces nanocristal-líquido e, portanto, as propriedades ópticas medidas. É importante ressaltar que esses resultados provaram que os QDts de ZnS@CMC são adequados para uso como “*nanosondas fluorescentes*” para várias aplicações biomédicas, oferecendo uma ampla gama de possibilidades de energia de irradiação de excitação combinada com uma gama bastante ampla de emissão visível para permitir a detecção luminescente. O rendimento quântico (QY) foi medido usando o protocolo baseado em quinina como referência, mostrando um QY médio de  $(QY) = 0,3\%$ , que já provou ser apropriado para ser usado como fluoróforos para aplicações de bioimagem e consistente com a literatura <sup>(199, 209)</sup>.

É amplamente aceito que, apesar de várias vantagens de produzir QDts semicondutores usando processo coloidal aquoso, incluindo compatibilidades ambientais e biológicas associadas a rotas fáceis, geralmente tem menor rendimento quântico (QY) em comparação com a síntese organometálica <sup>(199, 209)</sup>. Para superar esse efeito, o QY pode ser significativamente melhorado por vários métodos, incluindo o

crescimento de uma camada de outro semicondutor e um processo térmico para passivação de defeitos na superfície, respectivamente. No entanto, a melhoria e otimização da QY não é o objetivo deste estudo, que se concentrou em ajustar as propriedades ópticas de ZnS@CMC nanoconjugados, variando os parâmetros de síntese produzindo QDs fotoluminescentes para testes em aplicações de bioimagem.

#### **5.4.2 Análise morfológica de ZnS@CMC**

Características morfológicas e composição elementar foram avaliadas por MET, juntamente com a análise de EDS. As imagens de MET e histogramas de distribuição de tamanhos são mostradas em Fig. 5.63.

Como uma tendência geral, observou-se nanopartículas razoavelmente bem dispersas e uniformes, com forma predominante esférica para todas as amostras. Além disso, também foi detectada uma tendência de aumento do tamanho médio, com o aumento da relação de concentração de sulfetos em relação ao  $Zn^{2+}$  na síntese. Essa tendência endossou os resultados estimados pela "relação Tauc" e os efeitos de  $[S^{2-}]$  sobre o tamanho médio dos QDs de ZnS@CMC apresentados na Fig. 5.64. Como dito anteriormente, esse efeito foi interpretado considerando os processos de nucleação e crescimento dos QDs de ZnS afetados pela protonação (RCOOH) ou desprotonação ( $RCOO^-$ ) dos grupos funcionais do polímero CMC associados a íons em solução ( $Zn^{2+}$ ) formando complexos.

O sistema ZnS@CMC foi ainda caracterizado por microscopia de força atômica (AFM). O resultado mostrado na figura 5.65, demonstra a estrutura do tipo núcleo/casca com tamanhos compatíveis aos obtidos por MET e determinados por Tauc.

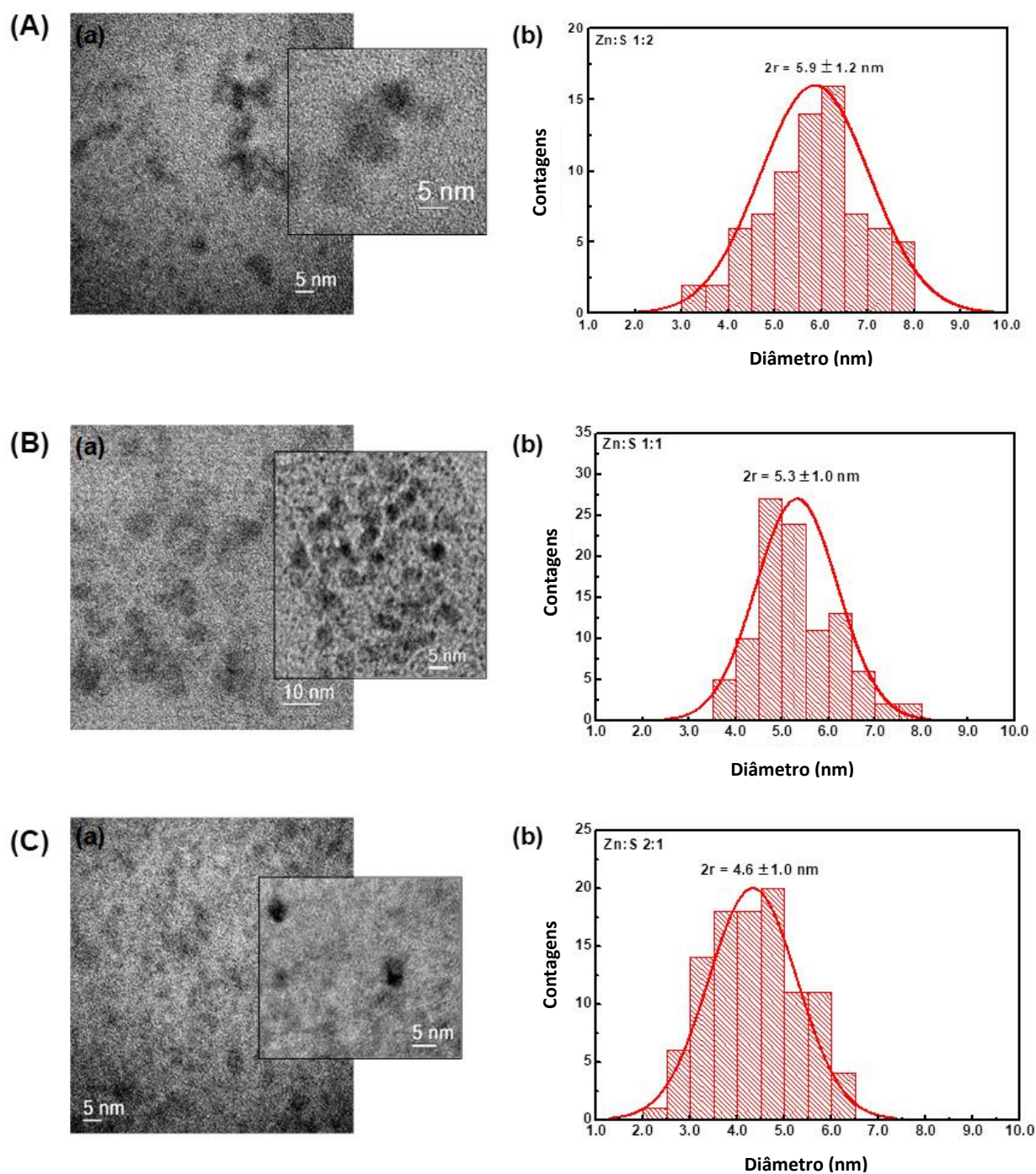


Figura 5.63 - (a) Imagens MET e (b) histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas de ZnS@CMC QDs sintetizados em pH 3,5 em diferentes proporções de Zn:S molar: (A) 2:1; (B) 1:1; e (C) 2:1. Para a distribuição de tamanhos foram medidas em média 100 nanopartículas).

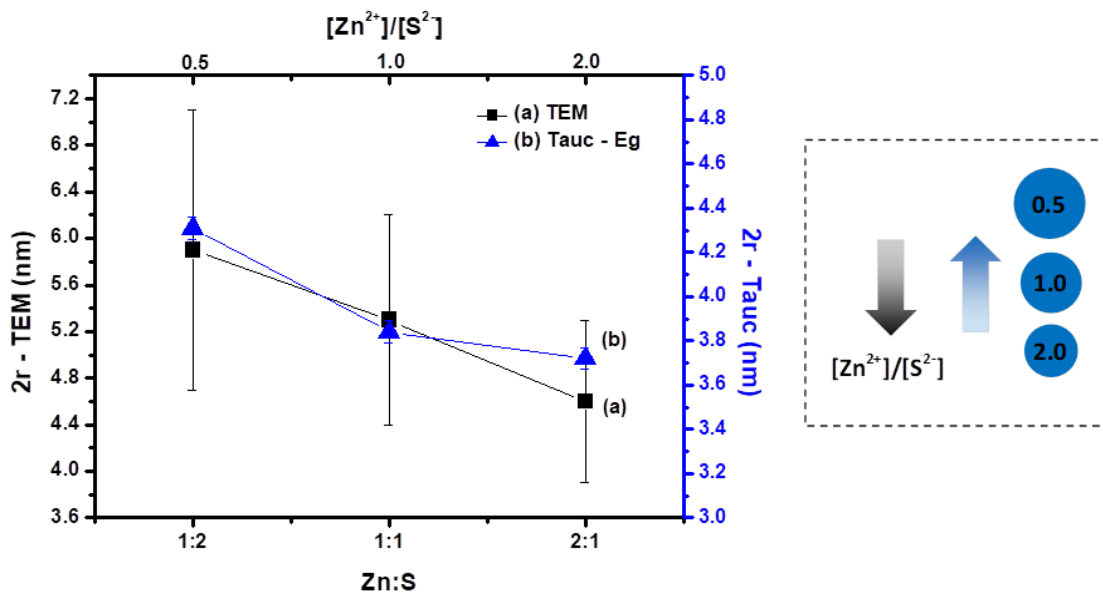


Figura 5.64 - Análise da influência da concentração dos precursores Zn:S no tamanho médio ( $2r$ ) maior ou igual ao ZnS@CMC medida por MET (barra de erro = SD;  $n \geq 100$ ) e estimada usando "Relação Tauc" (barra de erro = SD;  $n = 3$ ) em pH = 3,5. Inserção: Representação esquemática da dependência de tamanho dos QDts de ZnS@CMC com  $[Zn^{2+}]/[S^{2-}]$  na síntese.

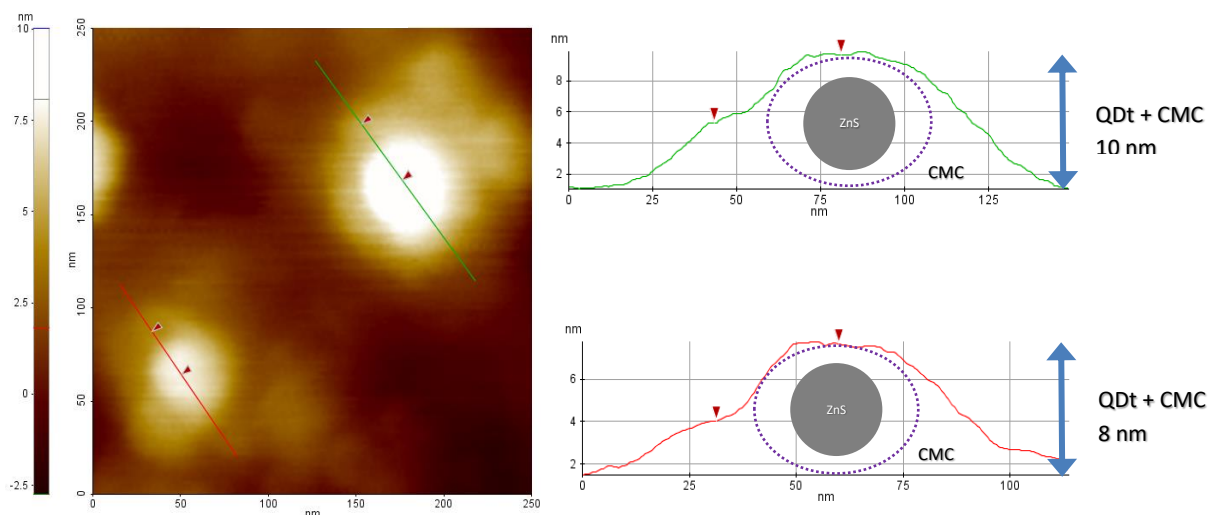


Figura 5.65 - AFM de ZnS@CMC



### 5.4.3 Análise de estrutura de ZnS@CMC

Em relação à sua estrutura, duas formas cristalinas principais podem ser observadas nos QDts de ZnS, a saber, a blenda de zinco mais estável (ZB) com estrutura cúbica de face centrada e a forma alotrópica wurtzita de alta temperatura (WZ) com simetria hexagonal. Normalmente, o ZnS o plano (111) tem espaçamento de 3,1Å (0,31nm). Para demonstrar o efeito do pH e do tamanho na estrutura do cristal, foram empregadas imagens de MET de alta resolução e medições diretas da distância interplanar do ZnS (111) mostradas na figura 5.66. Nossos resultados mostram que não houve variação estatisticamente significativa na estrutura cristalina dos nanocristais de ZnS@CMC sintetizados com variação de pH, como mostrado nas imagens MET e na tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Distância interplanar ZnS (111)	
pH 3,5	0,28 ± 0,02
pH 7,5	0,30 ± 0,02
pH 10,5	0,30 ± 0,02

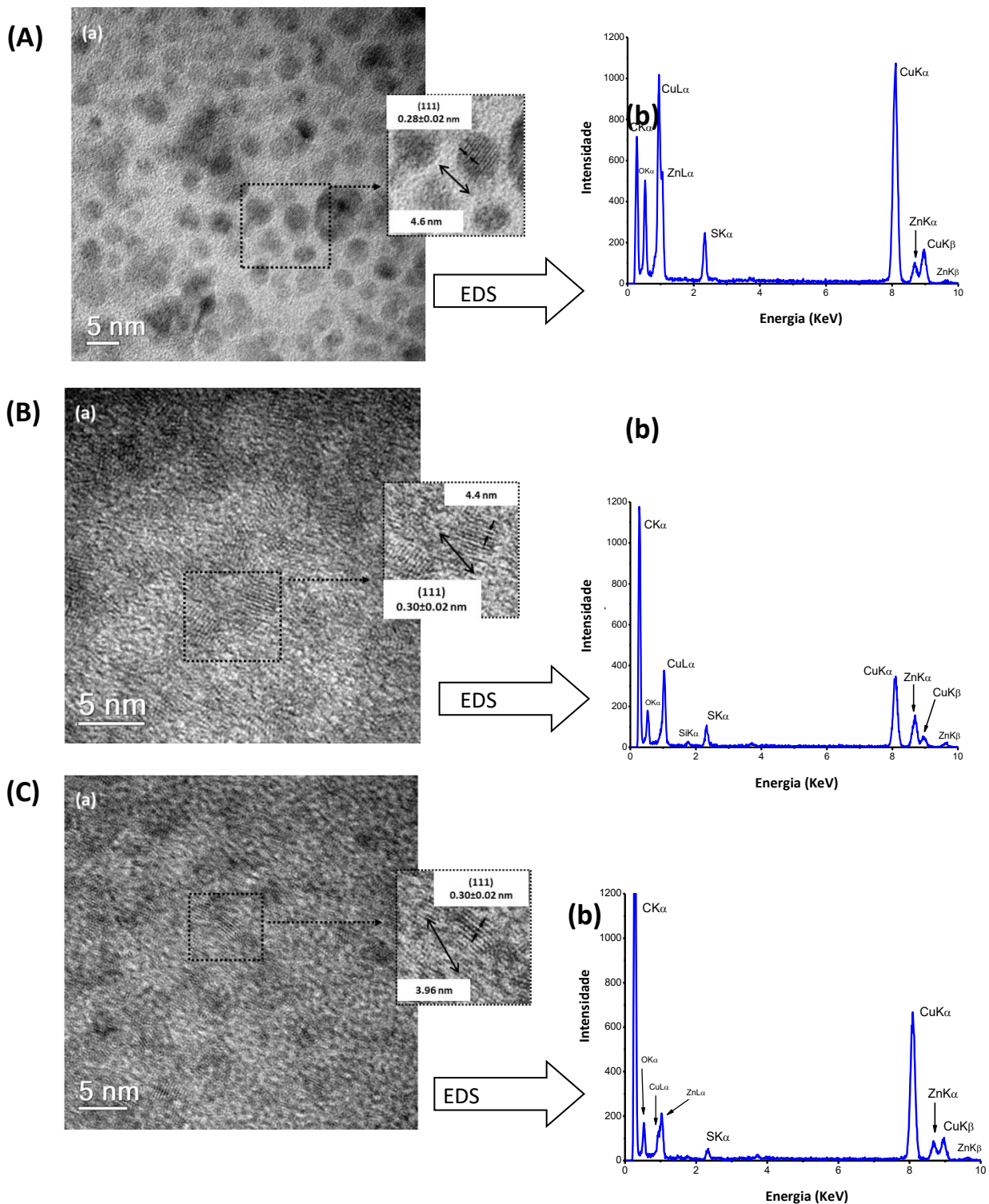


Figura 5.66 - Imagens de MET mostrando a morfologia e caracterização química por EDS de ZnS-CMC sintetizados em estequiometria (Zn:S 1:1) e diferente pH. (A) pH  $(3,5 \pm 0,1)$ , (B) pH  $(7,5 \pm 0,1)$  and (C) pH  $(10,5 \pm 0,1)$ . (a) Imagem MET. Inset: imagem de alta resolução e (b) EDS.

Em relação ao tamanho, escolhemos duas dispersões coloidais de QDts de ZnS@CMC sintetizados sob diferentes condições e que apresentam diferença significativa no diâmetro médio. Nossos resultados mostram que não houve variação estatisticamente significante na estrutura cristalina dos nanocristais de ZnS sintetizados com variação de tamanho, conforme mostrado nas imagens de MET da figura 5.67 e na tabela 5.7.

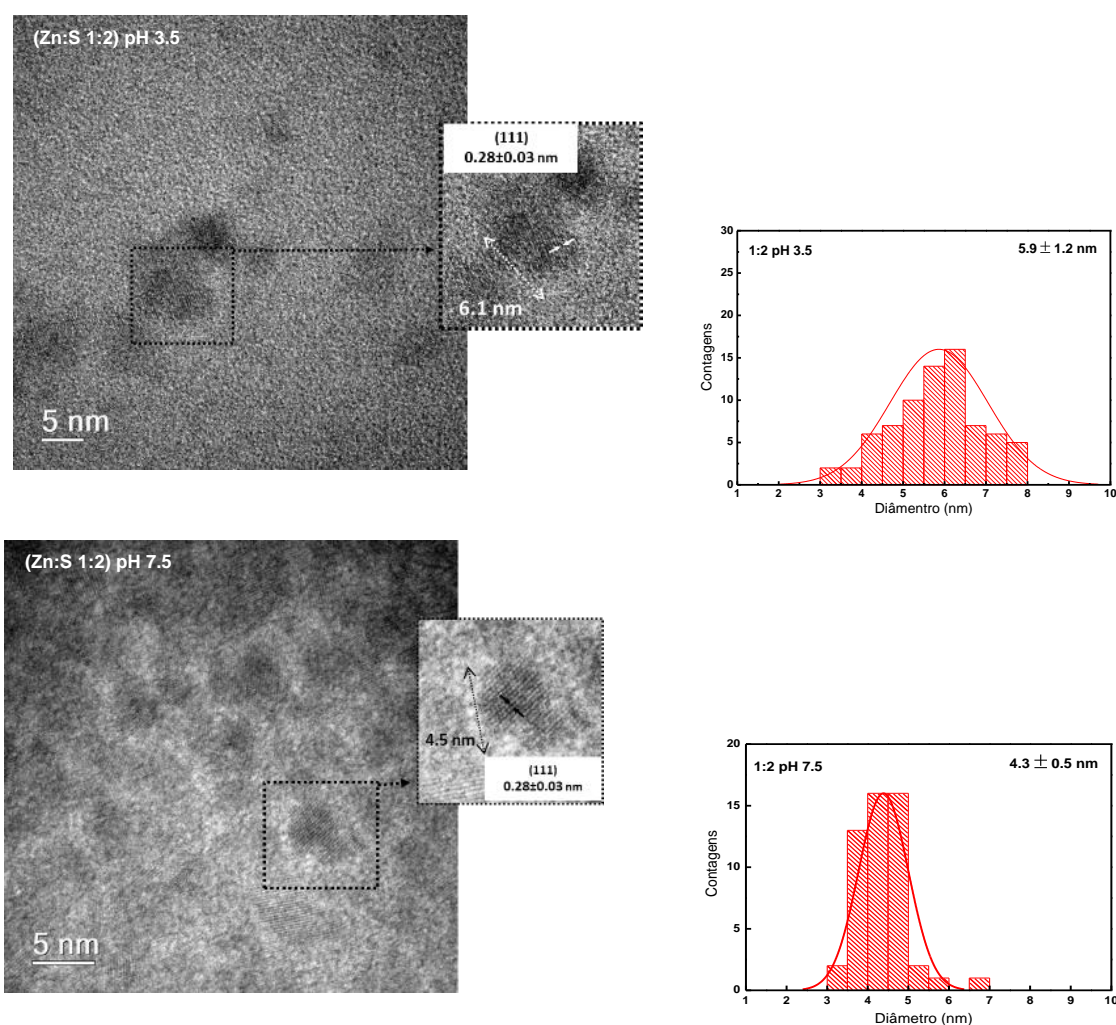


Figura 5.67 - Imagens de MET mostrando a morfologia e caracterização estrutural de ZnS@CMC sintetizados em diferentes tamanhos pela variação do pH.

~ 6 nm	$0,28 \pm 0,03$
~ 4,5 nm	$0,28 \pm 0,03$

#### 5.4.4 Análise de propriedades físico-químicas de QDts de ZnS@CMC

As medidas de carga de superfície usando a técnica de potencial (ZP) são mostradas em Fig. 5.68(A). Os valores de ZP indicaram que todas as amostras apresentaram superfícies carregadas negativamente tipicamente variando de -15 a -45 mV associadas à presença de grupos carboxílicos no polímero CMC que atribui características aniônicas ao ZnS@CMC. CMC, como um polímero sensível ao pH, em condições ácidas ( $\text{pH} = 3,5 < \text{pKa}$ ), os grupos funcionais carboxílicos são em sua maioria protonados ( $\text{RCOO}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{RCOOH}$ ) reduzindo a carga superficial negativa em aproximadamente -20 mV para as três proporções de Zn:S, (1:2, 1:1 e 2:1). Por outro lado, em pH neutro ( $\text{pH} = 7,5 > \text{pKa}$ ) os grupos carboxílicos são parcialmente desprotonados e convertidos em carboxilatos ( $\text{RCOOH} \leftrightarrow \text{RCOO}^- + \text{H}^+$ ), aumentando as cargas negativas da superfície do ZnS@CMC. Em condições alcalinas ( $\text{pH} = 10,5 > \text{pKa}$ ) os valores de ZP demonstraram superfícies altamente negativas ( $\sim -30$  a  $-45\text{mV}$ ) devido à desprotonação formando predominantemente carboxilatos ( $\text{RCOO}^-$ ) associados à presença de íons de hidróxido ( $\text{OH}^-$ ). Tendências semelhantes nos valores de ZP foram observadas para as três concentrações relativas de precursores alterando o pH, mas com efeitos mais ou menos pronunciados atribuídos ao equilíbrio geral das interações eletrostáticas, incluindo as contribuições de espécies carregadas em solução, cátions ( $\text{Zn}^{2+}$ ) e ânions ( $\text{S}^{2-}$ ). A menor variação de ZP com pH foi observada para a razão estequiométrica de Zn:S = 1:1 devido ao consumo de todos os precursores que formam os ZnS@CMC e, portanto, sem íons residuais de precursores ( $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{S}^{2-}$ ) em solução. Assim, esses resultados provaram que os QDts de ZnS@CMC foram efetivamente estabilizados no meio aquoso, predominantemente por forças eletrostáticas pela macromolécula polimérica.

Além das análises UV-Vis e MET, ensaios de DLS também foram realizados para determinar o  $H_D$ , para estudar a estabilidade química e possíveis interações com outras moléculas. Os resultados da análise hidrodinâmica utilizando DLS são apresentados em Fig. 5.68(B). As amostras com excesso de sulfetos (Zn:S = 1:2) apresentaram valores médios superiores de  $H_D$  nas três condições de pH testadas. Estes resultados foram associados com a conformação da macromolécula do polímero de CMC que dá forma a uma camada do "escudo" na superfície do núcleo. Como discutido anteriormente, as interações entre os cátions ( $\text{Zn}^{2+}$ ) e os grupos carboxilatos da CMC formando

complexos  $Zn^{2+}/RCOO^-$  favoreceram uma maior interação entre o polímero e a superfície dos QDts de ZnS@CMC e, conseqüentemente, reduzindo o  $H_D$  para Zn:S = 2:1 e 1:1. Por outro lado, na condição de excesso de sulfetos (Zn:S = 1:2), a formação de complexos é desvantajosa e, assim, diminuindo a interação entre os nanocristais ZnS e carboxilatos da CMC. Esse efeito favorece a repulsão entre as cadeias poliméricas que provocam o aumento relativo do  $H_D$ . É importante destacar que os valores  $H_D$  são diferentes do tamanho primário de nanopartículas semicondutoras calculados em seções anteriores pelas curvas de absorção UV-Vis e por imagens de MET, pois as dimensões hidrodinâmicas dessas nanoestruturas coloidais compreendem a soma de várias contribuições, incluindo o núcleo inorgânico feito de ZnS, a camada de casca de polímero orgânico de CMC, e ainda excluiu interações de volume, efeitos eletrolíticos, bem como as camadas de resolução de moléculas de água e restrições em ângulos de ligação e rotação. Estes resultados são muito relevantes tendo em mente as potenciais aplicações biomédicas destes nanoconjugados, uma vez que o tamanho hidrodinâmico é um dos aspectos-chave nas interações de nanomateriais com células vivas e sistemas biológicos.

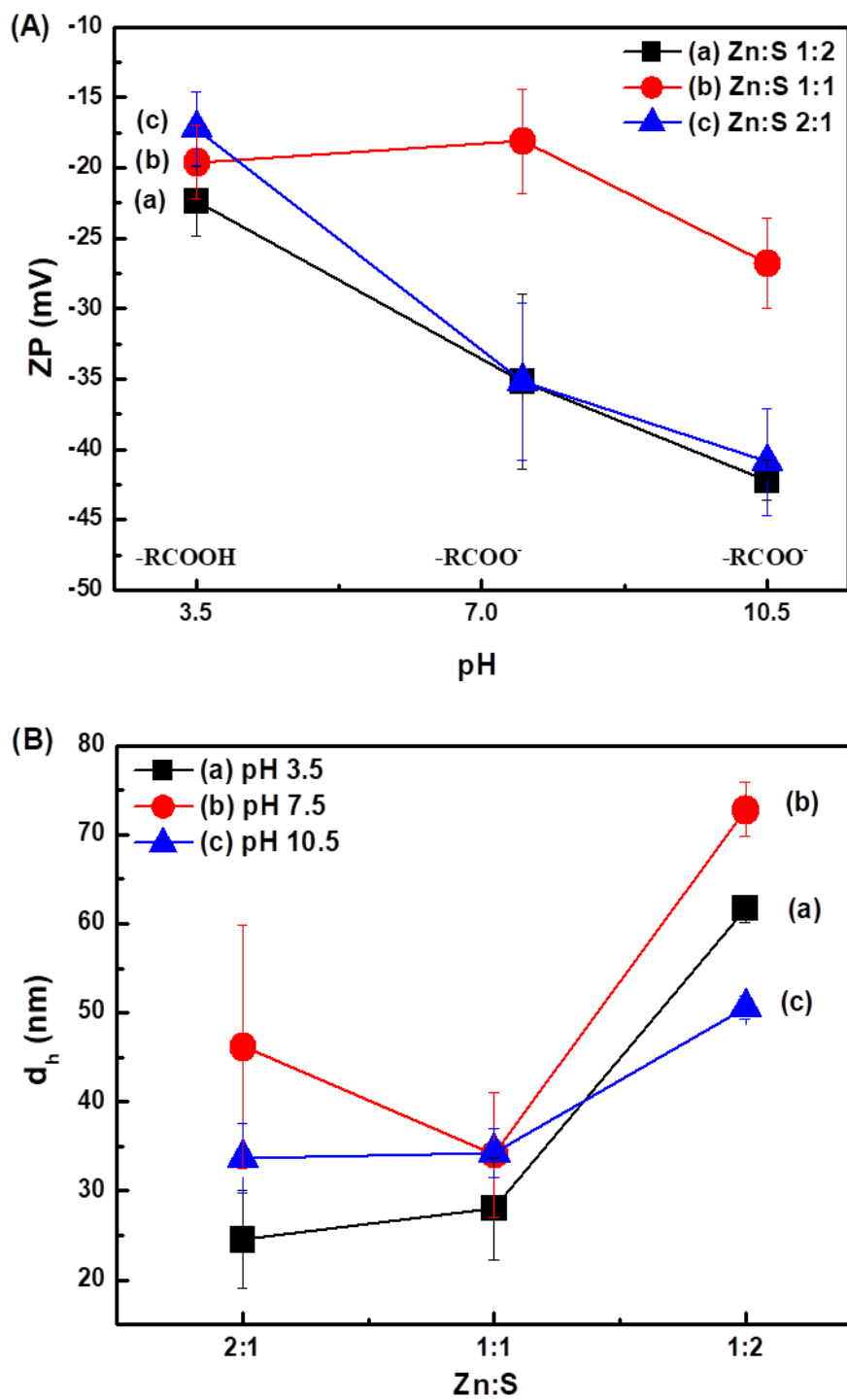


Figura 5.68 - (A) Zeta potencial (barra de erro: desvio padrão,  $n \geq 10$ ) e (B)  $H_D$  (barra de erro: desvio padrão,  $n \geq 3$ ) medições em diferentes proporções molar de precursores e pH ((a)  $(3,5 \pm 0,1)$ , (b)  $(7,5 \pm 0,1)$  e (c)  $(10,5 \pm 0,1)$ ).

#### 5.4.5 Análise de propriedades físico-químicas de QDts de ZnS@CMC resultados de FTIR

A CMC como um biopolímero dependente do pH, tem grupos químicos em suas cadeias poliméricas que sofrem alterações devido a mudança de meio. A técnica de FTIR foi utilizada para estudar como essas mudanças químicas afetam a formação de ZnS@CMC. A Figura 5.69 mostra a influência do pH nos espectros FTIR do ZnS@CMC em Zn:S proporção molar de 1:2.

A principal diferença entre os espectros foi associada ao comportamento sensível ao pH da CMC, principalmente devido à protonação-desprotonação de grupos carboxílicos (R-COOH/R-COO<sup>-</sup>). No pH < pKa (ou seja, ácido, pH 3,5, Fig. 5.69 A (c)), observou-se a faixa característica dos grupos COOH em aproximadamente 1730 cm<sup>-1</sup> atribuída à vibração antissimétrica de C=O. No pH > pKa (pH 7,5 e pH 10,5, Fig. 5.69 A(a,b)). Quando os ácidos carboxílicos são totalmente desprotonados (COO<sup>-</sup>), a banda em aproximadamente 1730cm<sup>-1</sup> desapareceu e as bandas relacionadas à carboxilatos (COO<sup>-</sup>) foram claramente detectadas em 1650 e 1592 cm<sup>-1</sup> (alongamento assimétrico) e 1416cm<sup>-1</sup> (alongamento simétrica) <sup>(211)</sup>. Além disso, as bandas primárias (C6-OH a 1028cm<sup>-1</sup>) e secundárias (C2-OH a 1112cm<sup>-1</sup> e C3-OH a 1060cm<sup>-1</sup>) os álcoois a vibração das ligações de glicosídeos (β 1-4 a 895-900cm<sup>-1</sup>) foram observados para todas as amostras <sup>(211)</sup>.

O efeito da relação molar Zn:S foi apresentado para QD sintetizado abaixo (pH 3.5, Fig. 5.69 B) e acima do pKa (pH 10,5, Fig. 5.69 C) em comparação com CMC nos mesmos pHs. Com base nos espectros, nenhuma mudança significativa foi detectada na energia das vibrações do COOH/COO<sup>-</sup> independente da estequiometria. No entanto, foram observadas alterações na intensidade das bandas carboxílicas/carboxílicas, principalmente no pH 3,5 (< pKa). Neste pH, a forma ácida de CMC prevalece e os positivamente carregados íons Zn<sup>2+</sup> competem com os íons H<sup>+</sup> na formação de complexos. Os espectros FTIR revelaram, independentemente da relação molar Zn:S, a formação de complexos Zn<sup>2+</sup>-COO<sup>-</sup> detectados pelo aumento da intensidade do pico atribuído à vibração dos grupos COO<sup>-</sup> (1592cm<sup>-1</sup>) e diminuição do pico associado ao grupo COOH (1730cm<sup>-1</sup>) conforme detalhado no início da Fig. 5.69B. Além disso, neste mesmo pH (pH = 3,5), para o maior quantidade de íons Zn<sup>2+</sup> (Zn:S = 2:1), a banda

C<sub>3</sub>-OH (alongamento) é claramente mais intensa e deslocada para o vermelho aproximadamente 20cm<sup>-1</sup> indicando que os grupos de álcool estão envolvidos na coordenação com íons de metal/estabilização de QDs ou interagindo com espécies H<sup>+</sup>. Esta mudança para uma energia mais baixa pode estar associada ao excesso de zinco e à concorrência com H<sup>+</sup> para formação de complexos. Além disso, o pico atribuído ao vínculo glicosídico sofreu um deslocamento hipsocrômico em 25cm<sup>-1</sup>, juntamente com maior absorção. Esse comportamento está associado na literatura à formação de ligações dativas entre íons positivos e elétrons de pares solitários de oxigênio em C-O-C, semelhante ao observado com espécies de hidroxila (C-OH) <sup>(212)</sup>. Uma tendência similar, mas com pequenas mudanças nas intensidades e posições energéticas, foi observada em pH 3,5 para a relação molar Zn:S de 1:1.

Além disso, também foi possível avaliar as interações entre grupos funcionais de superfícies CMC e os QDs de ZnS. A presença de duas faixas de vibrações assimétricas e simétricas de íons carboxílicos indicou a ocorrência de dois modos diferentes de ligação ao metal <sup>(213)</sup> e tipo de coordenação pode ser avaliada a partir da diferença de número de ondas entre as vibrações ( $\Delta\nu$ ). O primeiro modo de interação ( $\Delta\nu_1$ ) está relacionado à vibração a 1650cm<sup>-1</sup> e à vibração a 1324cm<sup>-1</sup>, resultando em um  $\Delta\nu_1 = 326\text{cm}^{-1}$  sugerindo, com base na literatura <sup>(213,214)</sup>, coordenação monótona. As diferenças entre as vibrações de alongamento em aproximadamente 1592 e 1416cm<sup>-1</sup> estão relacionadas ( $\Delta\nu_2 = 176\text{cm}^{-1}$ ) e revelaram um modo de interação dos COO<sup>-</sup> com o metal bivalente (Zn<sup>2+</sup>) na superfície de nanopartículas.



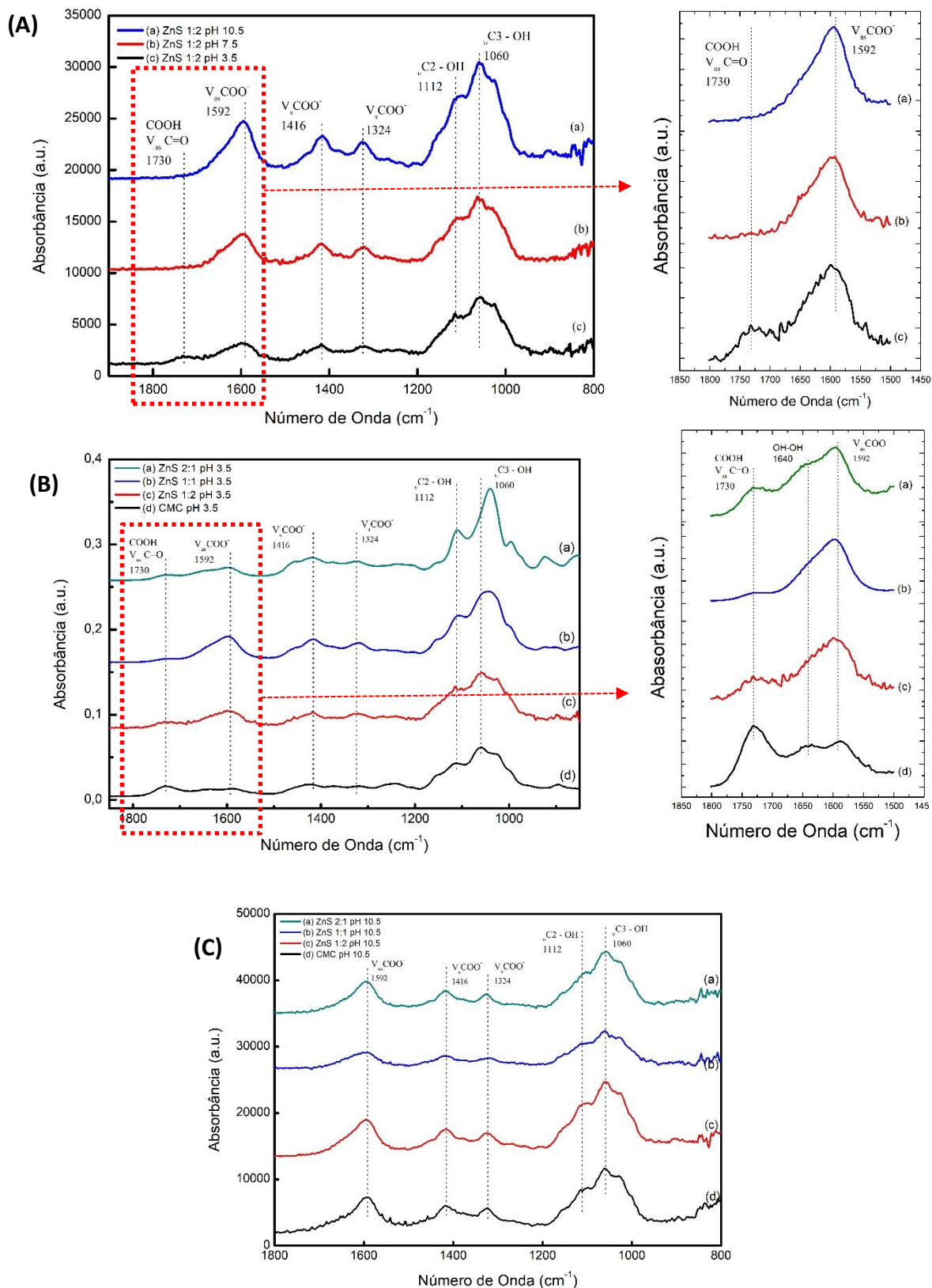


Figura 5.69 - (A) Efeito do pH nos espectros FTIR de ZnS 1:2: (a) pH 10,5; (b) pH 7,5; e (c) pH 3,5. Efeito de Zn: S relação molar ((a) ZnS 2:1; (b) ZnS 1:1; e (c) ZnS 1:2) em comparação com CMC (d) em (B) pH 3.5 (pH < pKa) e (C) pH 10.5 (pH > pKa).

#### 5.4.6 Análises por Espectroscopia XPS

O estado químico de [Zn] e [S] nos QDts de ZnS foi avaliado pela técnica de espectroscopia XPS após a remoção da casca orgânica usando bombardeio de íons de argônio ( $\text{Ar}^+$ , 2 ciclos, 3 s/ciclo, a emissão de corrente de 55mA e tensão de feixe 0,5 kV). Nos espectros obtidos da região de Zn 2p (Fig. 5.70A) os picos em  $(1021,7 \pm 0,2)\text{eV}$  e  $(1044,7 \pm 0,2)\text{eV}$  correspondem aos níveis Zn  $2p_{3/2}$  e Zn  $2p_{1/2}$ , respectivamente, e estão associados ao zinco nos QDts de ZnS<sup>(215-218)</sup>. Os picos Zn  $2p_{3/2}$  e Zn  $2p_{1/2}$  são separados por um intervalo de energia vinculativo de aproximadamente 23.0 eV, de acordo com a literatura<sup>(215)</sup>. A região S 2p (Fig. 5.70B) compreende dois picos com energia de ligação (BE)  $161,6 \pm 0,2\text{eV}$  (S  $2p_{3/2}$ ) e  $162,8 \pm 0,2\text{eV}$  (S  $2p_{1/2}$ ) identificados *via* desconvolução com  $\Delta = 1,2\text{eV}$ , que pode ser atribuído ao enxofre em sulfetos metálicos (M-S)<sup>(215-218)</sup>. Estas regiões espectrais Zn<sub>2p</sub> e S<sub>2p</sub> foram semelhantes para todos os ZnS@CMC sintetizados independentes da relação molares Zn:S e do pH e indicaram a formação de nanopartículas de sulfeto de zinco. As concentrações atômicas de Zn e S foram estimadas em  $55 \pm 5\%$  e  $45 \pm 5\%$ , respectivamente, de acordo com a estequiometria teórica do ZnS. Essa ligeira tendência para um maior teor de metal pode ser atribuída à presença de uma superfície da camada mais externa, compreendendo complexos entre os cátions  $\text{Zn}^{2+}$  e as ligações oscilantes passivadoras de polímeros aniônicos CMC. Essas regiões espectrais de Zn<sub>2p</sub> e S<sub>2p</sub> foram semelhantes para todos os ZnS sintetizados, independentemente do pH e da razão molar de Zn:S, que indicaram a formação de QDts de ZnS compatíveis com a proporção relativa estequiométrica (1:1)

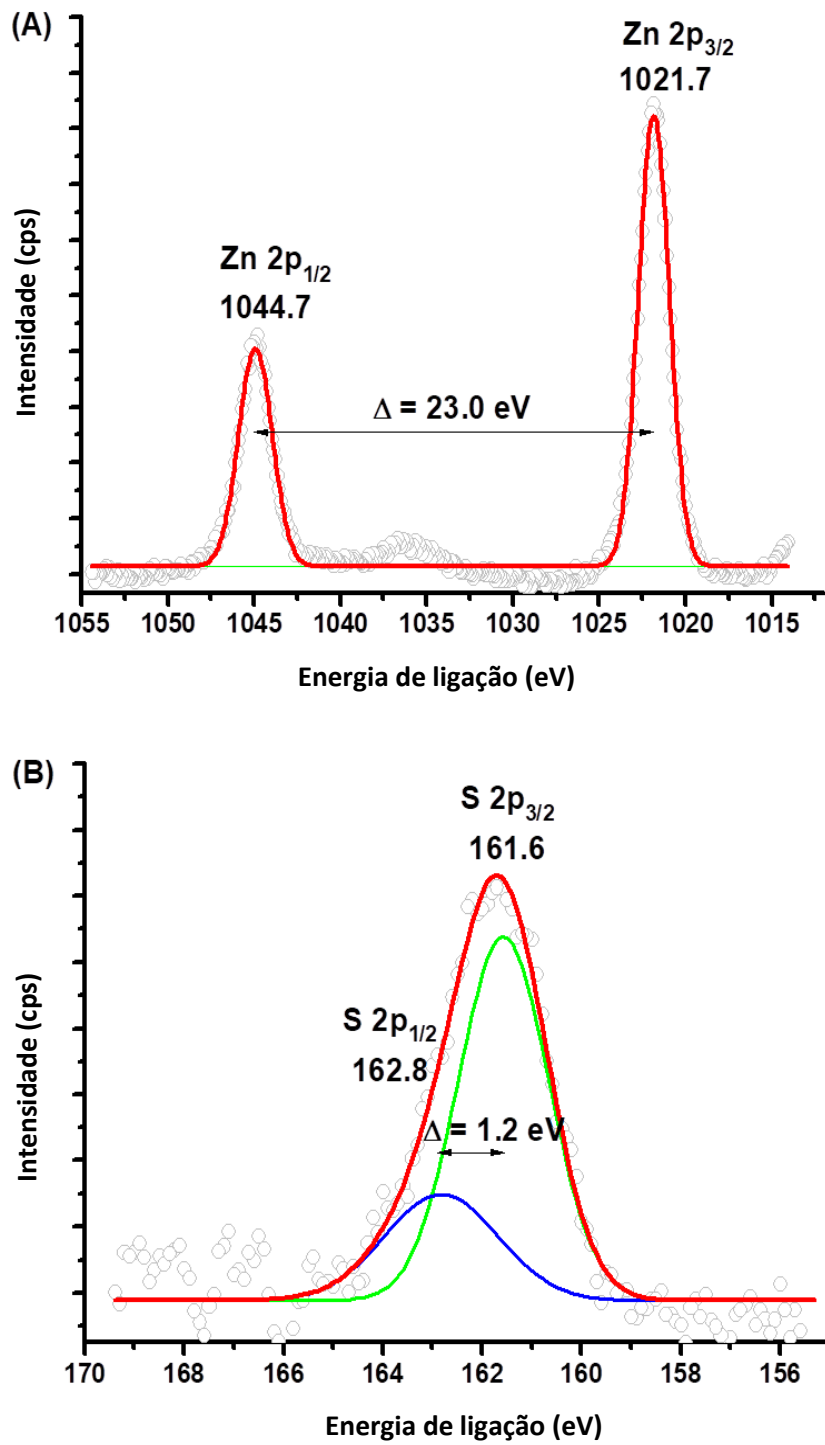


Figura 5.70 - XPS (A) Zn 2p e (B) S 2p (Zn:S 2:1, pH 7,5).

#### **5.4.7 Análise biológica de QDts de ZnS@CMC ensaio de viabilidade celular *in vitro***

A citocompatibilidade dos nanoconjugados ZnS@CMC foi avaliada usando ensaio MTT *in vitro* usando linhas celulares HEK 293T e U87 MG, correspondentes às células normais e cancerosas, respectivamente. Todos os ensaios biológicos foram realizados de acordo com a ISO 10993-5:2009/(R)2014 (Avaliação biológica de materiais e dispositivos médicos: Testes para citotoxicidade *in vitro*) globalmente aceitos como uma avaliação preliminar da toxicidade de (nano) materiais e dispositivos. As respostas de viabilidade celular do ZnS@CMC são apresentadas na figura 5.71 ((A) HEK 293T e (B) U87 MG) com base nos ensaios do MTT após 24h de incubação. Os resultados demonstraram claramente que os nanoconjugados de ZnS@CMC têm viabilidade celular superior a 90% para ambos os tipos de células sem diferenças significativas (dentro da variação estatística). Estes resultados evidenciaram que neste estudo CMC estabilizou os QDts de ZnS foram produzidos usando um processo de química aquosa verde fácil, tornando nanossondas fluorescentes citocompatíveis para aplicações biomédicas *in vitro*, como bioimagem de células vivas.

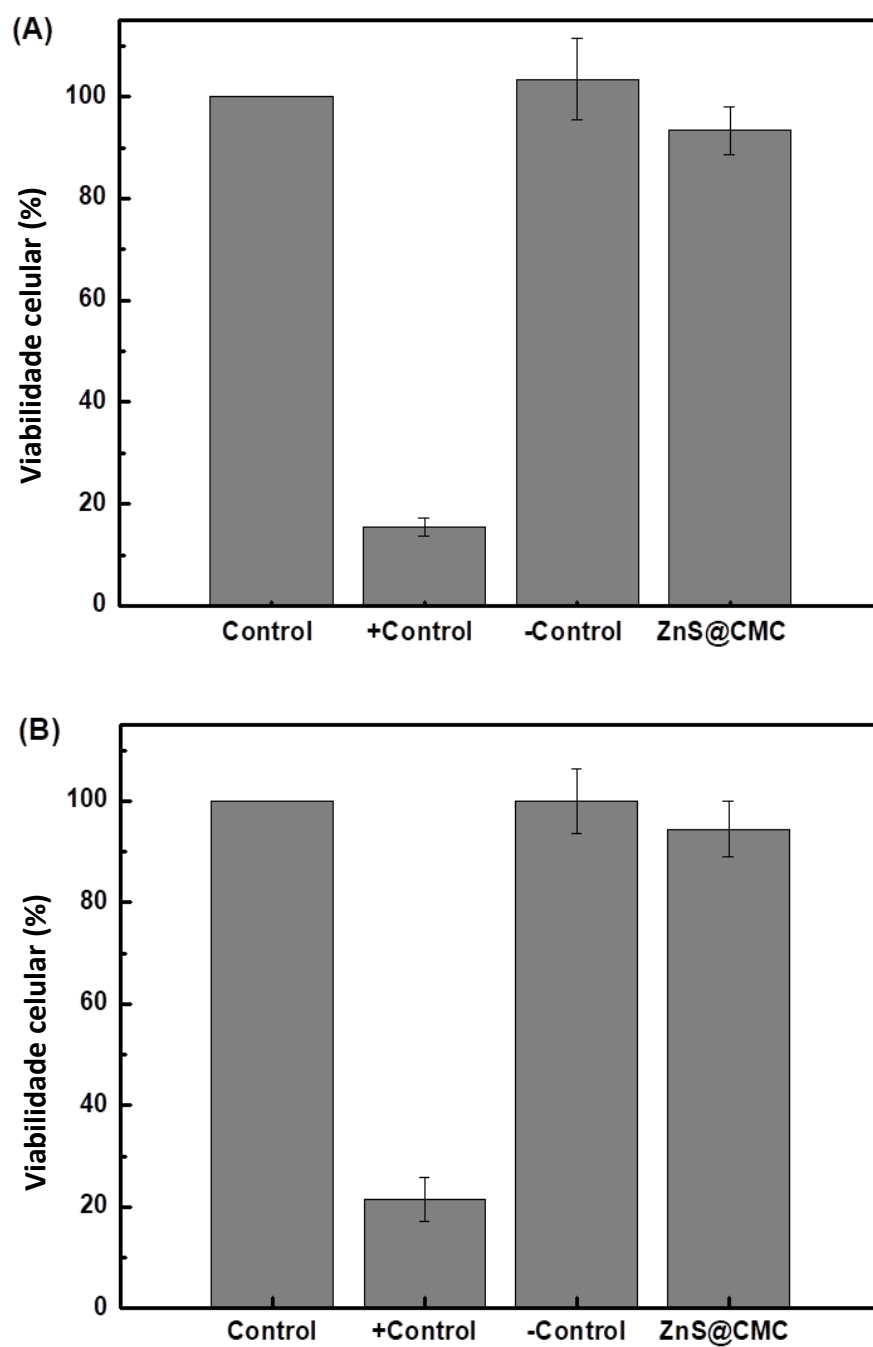


Figura 5.71 - Resposta de viabilidade celular de (A) HEK 293T e (B) linhas celulares U87 MG com base no ensaio MTT após 24h de incubação com ZnS@CMC (Zn:S 1:2, pH 3,5) (barra de erro: desvio padrão, n = 6).

#### 5.4.8 Bioimagem de células de glioma usando ZnS@CMC fluorescentes

Como prova de conceito, os QDts de ZnS@CMC foram aplicados como nanossondas biológicas fluorescentes biocompatíveis para células de glioma para bioimagem (U87 MG) *in vitro* através da internalização celular avaliada pela microscopia de varredura a laser confocal (CLSM) e usando o HEK293T como linha celular normal como referência. HEK 293T foi usada como modelo celular devido à maior eficiência de transfecção. Por outro lado, a linha celular U87 MG é uma linha de células de glioblastoma humana primária, amplamente utilizada em pesquisa de câncer cerebral. Hoje em dia, a pesquisa para novos nanomateriais para detecção do glioblastoma é muito importante, devido à letalidade elevada de tumores de cérebro. A internalização celular dos ZnS@CMC pela HEK 293T e U87 MG são mostradas na Fig. 5.72. Como se observa, os nanoconjugados ZnS@CMC apresentaram a emissão azul característica, como esperado pelos resultados de emissão de fotoluminescência. Esses resultados demonstraram alta eficiência de internalização de ZnS@CMC por células de glioma malignas utilizando as linhas celulares U87 MG. Além disso, a emissão fluorescente dos QDts foi detectada principalmente espalhadas no citoplasma das células e, é claramente observado que as células cancerosas do glioma maligno U87 MG apresentam maior intensidade de luminescência quando comparadas às células HEK 237T. Isso pode ser explicado pelo metabolismo acelerado associado às células cancerosas quando comparado às células normais <sup>(219)</sup>. Estes resultados são muito importantes, porque provaram a viabilidade de usar ZnS@CMC como sondas biológicas fluorescentes para *bioimagem* e, oferecem grande potencial para aplicação em diagnóstico precoce e confiável de câncer, usando uma nano plataforma simples, verde e cito compatível.

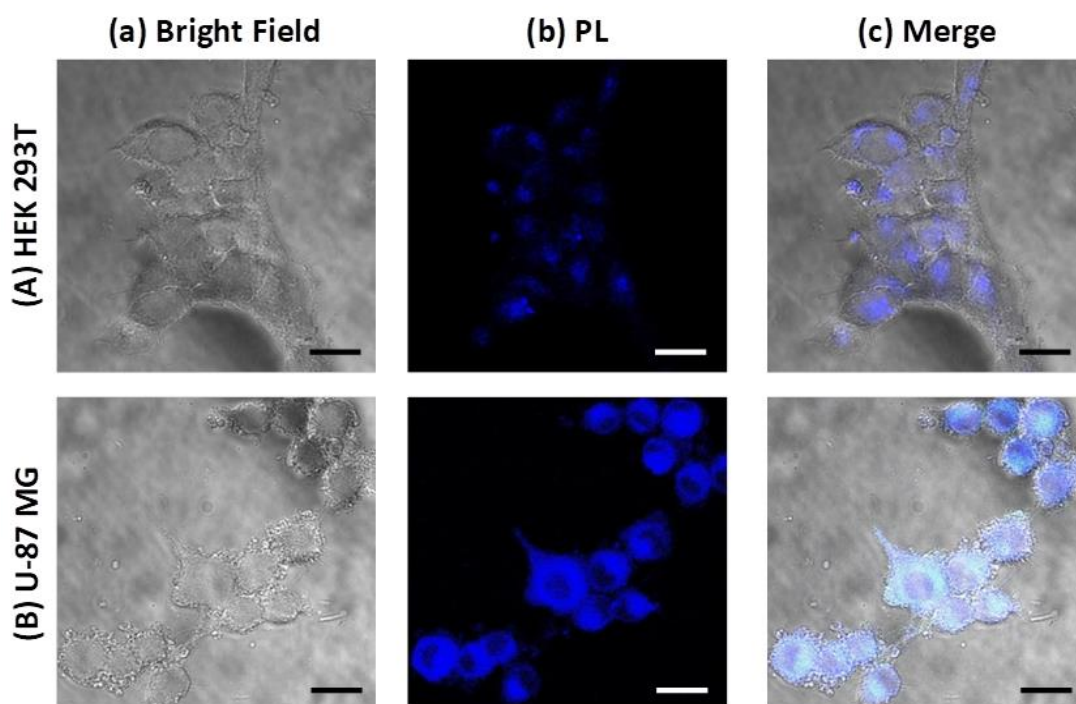


Figura 5.72 - Imagens de microscopia confocal da absorção celular da ZnS@CMC emissão azul por (A) células HEK 293T e (B) células U87 MG com tempo de incubação 120 min: (a) Imagem de campo claro, (b) imagem PL e (c) mesclado PL + imagem de campo claro (barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ).

## 5.5 – Nanoheterojunções plasmônicas fotoluminescentes Au@ZnS-CMC

Nanoheterojunções plasmônicas fotoluminescentes Au@ZnS-CMC, constituídas por um núcleo de AuNPs e uma casca de ZnS, estabilizadas por CMC, foram desenvolvidas através de rota coloidal aquosa em temperatura ambiente e mediada pelo biopolímero carboximetilcelulose (CMC).

### 5.5.1 Modelo matemático para cálculos de espessura da casca

Para o projeto do procedimento experimental, foi utilizado o modelo matemático proposto abaixo <sup>(38)</sup>. Os parâmetros geométricos são,  $R_C$  : raio do núcleo,  $R_T$ : raio da nano-heterojunção (metal + semiconductor) e,  $\delta$ : espessura da casca, sendo  $R_T = R_C + \delta$  (Fig. 5.73).

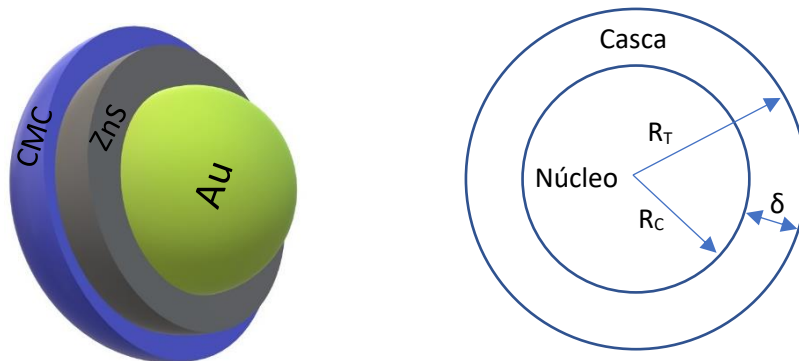


Figura 5.73 - Modelo matemático para cálculos de espessura da casca.

Primeiramente, determinamos as expressões para cálculo do número de AuNPs@CMC servindo como núcleo na dispersão coloidal. Foi considerado o volume calculado pela expressão (5.8), que foi utilizado para determinar as expressões para massa do núcleo mostradas nas equações (5.9) e (5.10). Para os cálculos, consideramos a densidade do núcleo como sendo a densidade de AuNPs já relatado na literatura <sup>(221)</sup>.

$$V_{\text{núcleo}} = \frac{4}{3} \pi (R_C)^3 \quad (5.8)$$

$$m_{\text{núcleo}} = \rho_{\text{núcleo}} V_{\text{núcleo}} \quad (5.9)$$

$$m_{\text{núcleo}} = \frac{4}{3} \pi * \rho_{\text{núcleo}} * (R_C)^3 \quad (5.10)$$



Onde:

$V_{\text{núcleo}}$  = Volume de cada nanopartícula atuando como núcleo em  $\text{cm}^3$ .

$m_{\text{núcleo}}$  = Massa de cada nanopartícula atuando como núcleo em g.

$\rho_{\text{núcleo}}$  = Densidade do núcleo em  $\text{g/cm}^3$ .

$R_c$  = Raio do núcleo metálico determinado por MET em nm.

Densidade de AuNPs: 59 átomos/ $\text{nm}^3$  <sup>(221)</sup> equivalente a  $19,3\text{g/cm}^3$ .

O cálculo da quantidade total de metal no reagente precursor foi realizado pela equação 5.11, sendo levado em consideração o número de mols do reagente precursor para crescimento do núcleo, a massa molar do reagente precursor, e a massa total de reagente precursor utilizada para crescimento do núcleo.

$$n_{\text{mols}} = \frac{m_{\text{total metal no coloide}}}{M_w} \quad (5.11)$$

$n_{\text{mols}}$  = Número de mols do reagente precursor para crescimento do núcleo.

$M_w$  = Massa molar do reagente precursor

$m_{\text{total metal no coloide}}$  = Massa total de reagente precursor para crescimento do núcleo

No cálculo de concentração foi levando em consideração que nem toda massa do reagente é utilizada para formação do núcleo. No crescimento de AuNPs é utilizado como reagente precursor o ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), neste caso, apenas os átomos de ouro participam do crescimento do núcleo. Para incluir essa consideração foi realizada a seguinte correção:

Correção:

Massa molar do ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ):  $339,79\text{g/mol}$

Massa de ouro:  $196,97\text{g}$

Nos cálculo foi considerado um rendimento médio de 85%, ou seja, consideramos que 85% da massa de ouro presente no reagente precursor, efetivamente foi integrante das AuNPs crescidas (equação 5.12).

$$N_{\text{NPs}} = \frac{m_{\text{total metal no coloide}}}{m_{\text{núcleo}}} \quad (5.12)$$

$N_{\text{NPs}}$  = Número de nanopartículas no coloide atuando como núcleo.

Com o conhecimento da quantidade de núcleos AuNPs@CMC estimados, incluímos no modelo o cálculo da quantidade de reagentes precursores para formação de uma casca de ZnS. Determinamos então na equação 5.13 a quantidade de ZnS por núcleo e na equação 5.14 o volume de ZnS por núcleo. Considerando uma casca de espessura  $\delta$ , a massa de uma casca de ZnS em torno de uma AuNPs@CMC de raio  $R_C$  é determinada pelas equação 5.15.

$$m_{ZnS} = \frac{m_{ZnS}(total)}{N_{NPs}} \quad (5.13)$$

$$m_{ZnS}(casca) = \rho_{casca} V_{casca} \quad (5.14)$$

$$m_{ZnS}(casca) = \frac{4}{3} \pi * \rho_{casca} * [(R_C + \delta)^3 - R_C^3] \quad (5.15)$$

$$m_{ZnS}(total) = m_{Zn} + m_S \quad (5.16)$$

Cálculo da quantidade de reagente precursor do metal [Zn] (Eq. 5.17).

$$n_{mols} = \frac{m_{Zn}}{M_w} \quad (5.17)$$

Cálculo da quantidade de reagente precursor de [S] (Eq. 5.18).

$$n_{mols} = \frac{m_S}{M_w} \quad (5.18)$$

A massa da casca por AuNPs@CMC depende assim da geometria do sistema. Com os dados de massa de material semiconductor por núcleo e com a espessura estimada para o regime de confinamento quântico de 2,5 nm (raio de Bohr do ZnS ( $2r_B \sim 5,5\text{nm}$  <sup>(203)</sup>), determinamos, via algoritmo projetando em MS excel<sup>®</sup>, a concentração de reagentes percussores necessários para a nucleação e crescimento de uma casca de ZnS na superfície de AuNPs@CMC.

### 5.5.2 Modelo para determinação do LSPR

As propriedades ópticas das AuNPs são dependentes do seu meio dielétrico. Quando AuNPs estão envoltas por outro material, a característica mais dependente é o comprimento de onda de absorbância máximo que passa a corresponder à equação (5.19) <sup>(222-223)</sup>. Pela equação 5.19 fica evidente que o comprimento de onda de LSPR é

dependente do índice de refração do material e do volume da casca da nanoestrutura formada (g), onde  $\lambda_p$  (plasmon para o “bulk”) é igual a 130,9 nm para um núcleo de ouro <sup>(222-223)</sup>.

$$\lambda^2 = \lambda_p^2 \left[ 12,2 + 2n_{H_2O}^2 + 2g \frac{(n_{ZnS}^2 - n_{H_2O}^2)}{3} \right] \quad (5.19)$$

$$g = \frac{[(R_{núcleo} + R_{casca})^3 - R_{núcleo}^3]}{(R_{núcleo} + R_{casca})^3} \quad (5.20)$$

$$\lambda_p = \sqrt{\frac{4\pi^2 c^2 m \epsilon_\infty}{Ne^2}} \quad (5.21)$$

No entanto, a equação 5.19, relatada na literatura para sistema núcleo/casca <sup>(222-223)</sup>, demonstrou imprecisão para a nano-heterojunções metal/semicondutor (Au@ZnS-CMC), não prevendo corretamente o LSPR para coloides Au@ZnS-CMC com a espessura de casca projetada de 2,5nm. Desta forma, foi realizada uma correção na equação 5.19, para levar em consideração o efeito do polímero CMC no LSPR, como apresentado na equação 5.22. Essa correção foi necessária levando em consideração que o polímero atua direcionando o crescimento da casca. Para o sistema Au@ZnS-CMC o LSPR é deslocado devido ao índice de refração do ZnS ( $n = 2,40$  em  $\lambda = 520$  nm) <sup>(112)</sup> e da solução aquosa de CMC ( $n = 1,33$  em  $\lambda = 520$  nm) <sup>(224)</sup>.

$$\lambda^2 = \lambda_p^2 \left[ 12,2 + 2n_{H_2O}^2 + 2g \frac{(n_{ZnS}^2 - n_{CMC}^2)}{3} \right] \quad (5.22)$$

Para maior compreensão deste fenômeno, foi realizada simulação numérica para prever os valores esperados de LSPR em relação à espessura da camada semicondutora, com e sem correção, e ainda corrigida pela variação do índice de refração com o comprimento de onda de excitação. Os resultados são mostrados na figura 5.74A, para o LSPR esperado pela variação da espessura, e na figura 5.74B para a correção levando em consideração a variação do índice de refração do ZnS com o comprimento de onda. Como pode ser observado nos resultados de simulação numérica, o crescimento de uma camada de material com as características do ZnS, provoca o deslocamento batocrômico

(deslocamento para o vermelho), do pico de LSPR, sendo ainda demonstrado que dependência conhecida do índice de refração com o comprimento de onda, não afeta o comportamento do sistema em relação ao deslocamento para o vermelho dos espectros após o crescimento da casca. Os valores encontrados pela correção demonstrada pela equação 5.22 são mostrados em (b) na figura 5.74A.

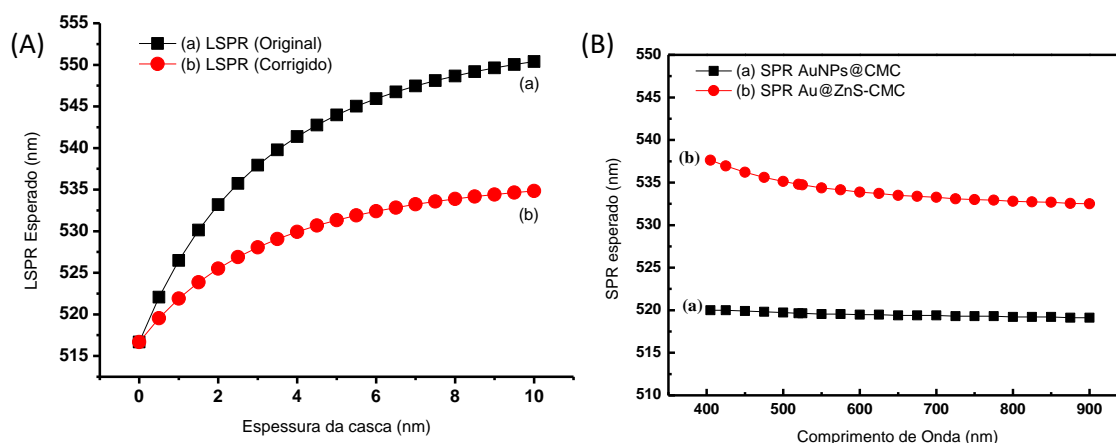


Figura 5.74 - (A) Simulação do LSPR em função da espessura da casca, sendo (a) modelo da equação 5.19 e (b) modelo corrigido pela equação 5.22 e (B) simulação do valor do pico máximo de LSPR com o comprimento de onda ajustados pelo índice de refração em AuNPs@CMC (a) e Au@ZnS-CMC, (b) Dados simulados para uma camada de 2,5nm de ZnS. A dependência conhecida do índice de refração com o comprimento de onda não afeta o comportamento do sistema em relação ao deslocamento para o vermelho do espectro após o crescimento da casca.

Com o conhecimento das condições de síntese e do comportamento óptico esperado para o sistema proposto, foi realizada a síntese dos sistemas, seguindo o procedimento experimental apresentado na sessão 4.2.10.

### 5.5.3 Síntese de nanoheterojunções Au@ZnS-CMC

Seguindo o modelo de nucleação e crescimento apresentado na figura 5.37, o polímero CMC atua mediando o crescimento do núcleo metálico, assumindo-se uma conformação enovelada em volta das AuNPs após o crescimento (Fig. 5.37 (g)). Neste modelo, a conformação da CMC em torno do núcleo pode ser aplicada para o crescimento de uma camada de ZnS, como ilustrado na figura 5.75. Baseado nos resultados obtidos para síntese de AuNPs@CMC e ZnS@CMC, foram escolhidas as seguintes condições de síntese: CMC 0,2%, GS = 0,77, massa molar  $\approx 250,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , pH neutro ( $7,5 \pm 0,5$ ) e razão molar estequiométrica (Zn:S) 1:1. Pelo procedimento experimental, e pelos resultados apresentados no capítulo 5.2, dispersões coloidais de AuNPs@CMC apresentam carga negativa em sua superfície ( $-(53,5 \pm 4,5) \text{ mV}$  - Tabela 5.1), atribuída aos grupos  $\text{COO}^-$  da CMC, como demonstrado pelos resultados de ZP com variação de protonação/desprotonação dos grupos ácido carboxílicos substituídos nas cadeias poliméricas ( $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^-$ ).

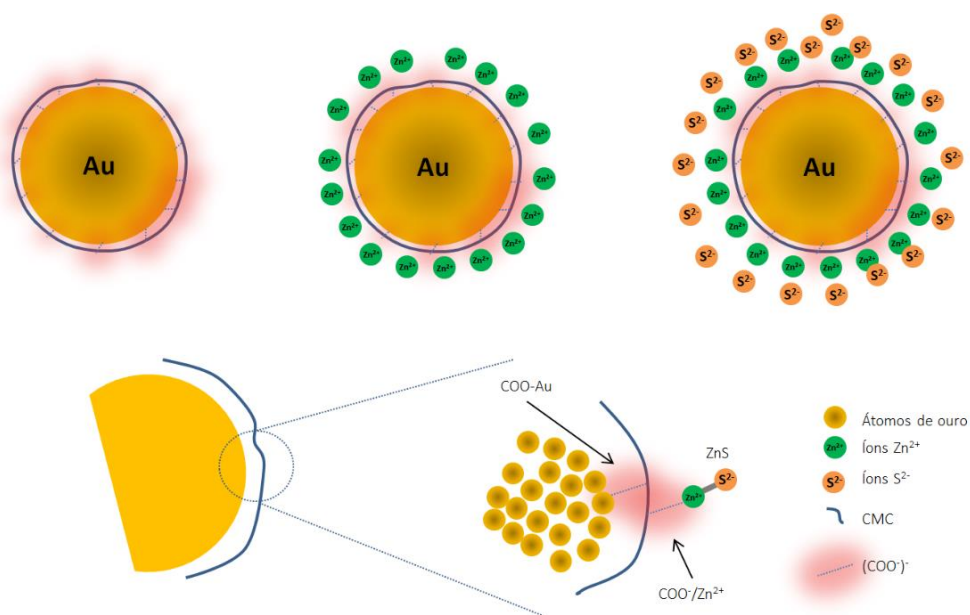
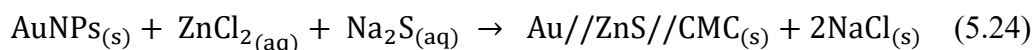
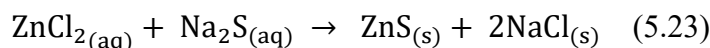
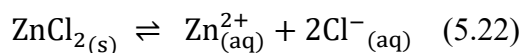
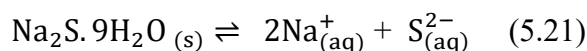


Figura 5.75 - Ilustração do processo de crescimento de casca na superfície de AuNPs@CMC formando uma nanoheterojunção núcleo-casca Au@ZnS-CMC (Fonte: próprio autor).

A síntese de ZnS@CMC e Au@ZnS-CMC foi realizada seguindo as equações 5.21-5.24.



Na síntese de ZnS, os íons  $\text{S}^{2-}$  resultantes de dissociação do  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  em meio aquoso, reagem com os íons  $\text{Zn}^{2+}$  resultantes de dissociação do  $\text{ZnCl}_2$ , precipitando ZnS sólido com estabilização da CMC para formação de nanocristais de diâmetro da ordem 2-4 nm. A síntese na presença de AuNPs@CMC é mediada pelo polímero CMC, seguindo o modelo ilustrado na figura 5.75. As AuNPs@CMC tem carga negativa em sua superfície devido aos grupos carboxilatos da CMC e apresentam uma conformação enovelada em volta das AuNPs devido a distribuição da densidade de carga (figuras 5.37 e 5.75). Nesta reação, os íons  $\text{Zn}^{2+}$ , resultantes da dissociação do  $\text{ZnCl}_2$ , interagem por interação colombiana com os carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) presentes nas cadeias poliméricas da CMC, formando o complexo  $\text{COO}^-/\text{Zn}^{2+}$  (figura 5.75). Em seguida, íons  $\text{S}^{2-}$  resultantes da dissociação do sulfeto de sódio reagem com os íons  $\text{Zn}^{2+}$  na superfície das AuNPs@CMC, possibilitando a formação de núcleos e posterior crescimento de ZnS@CMC na superfície do ouro (figura 5.75). Esse processo tem a tendência de crescimento de uma camada de ZnS que acompanha a curvatura das AuNPs devido ao template de CMC. A presença da CMC também limita o crescimento da casca de ZnS em dimensões nanométricas e, dentro do regime de confinamento quântico (raio de Bohr do ZnS ( $2r_B \sim 5,5\text{nm}$  <sup>(203)</sup>).

Esse mecanismo foi estudado através de medidas de DLS ( $H_D$ ) e potencial zeta, cujos resultados são mostrados na figura 5.76. Na figura 5.76 (A) são apresentados os resultados de potencial zeta para a dispersão coloidal de AuNPs@CMC, o efeito da adição de  $\text{Zn}^{2+}$  e resultado após o crescimento da casca de ZnS@CMC em diferentes valores de pH. Como pode ser observado, o potencial zeta de AuNPs@CMC é dependente do pH da dispersão coloidal, principalmente devido a protonação/desprotonação dos grupos COOH da CMC, sendo que em pH ácido a solução apresenta o menor valor de carga superficial devido a protonação dos

carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) formando ácidos carboxílicos ( $\text{COOH}$ ). A adição de  $\text{ZnCl}_2$  resultou na diminuição do valor de carga superficial, devido a interação dos íons  $\text{Zn}^{2+}$  com os grupos carboxilatos  $\text{COO}^-$ , com a formação do complexo  $\text{COO}^-/\text{Zn}^{2+}$ , efeito que atua provocando a mudança na conformação da CMC na superfície das AuNPs@CMC, o que pode ser comprovado pela redução do  $H_D$ , sendo isso devido a menor repulsão entre as cadeias poliméricas da CMC, como apresentado na figura 5.76 (B). Por outro lado, a adição do sulfeto de sódio resultou em aumento da carga superficial em relação à solução AuNPs@CMC/ $\text{Zn}^{2+}$ , devido a reação dos íons  $\text{Zn}^{2+}$  com os íons  $\text{S}^{2-}$  e posterior crescimento da casca de ZnS e ainda o aumento do  $H_D$ , relacionado a interação da CMC excedente com a superfície da casca recém-crescida (repulsão das cadeias).

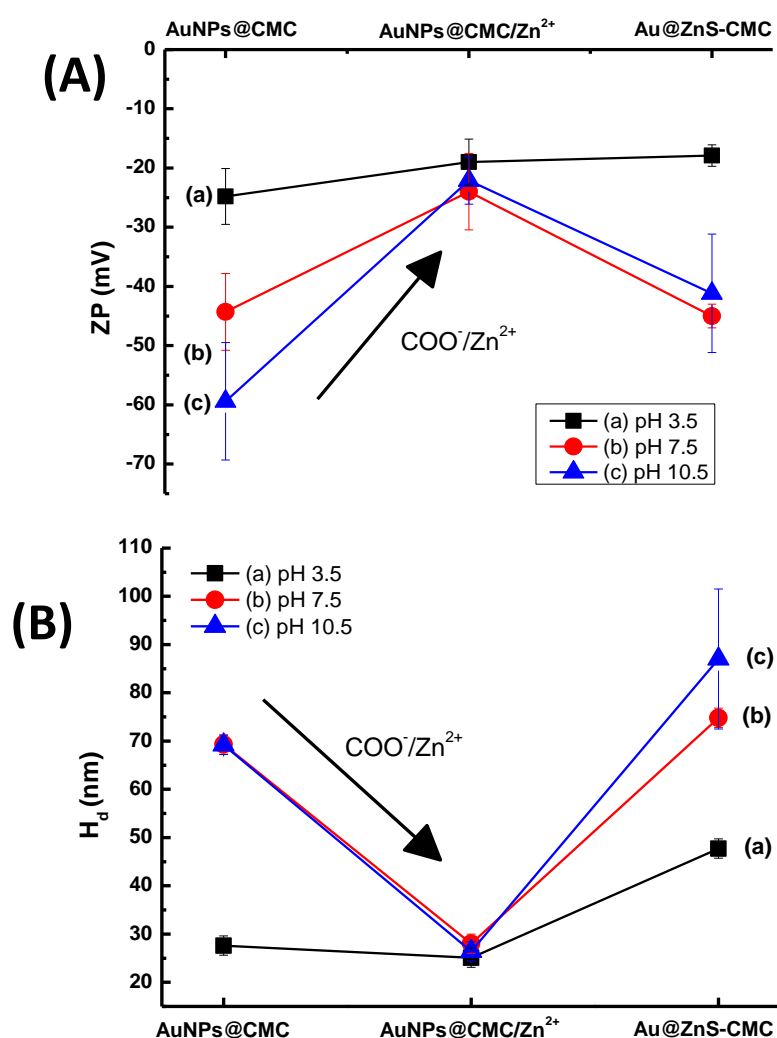


Figura 5.76 - Resultados de potencial Zeta (A) e DLS (B) para amostras de AuNPs@CMC, o efeito da adição de  $\text{Zn}^{2+}$  e após o crescimento da casca de ZnS@CMC em pH ácido (a), neutro (b) e alcalino (c). DLS ( $n \geq 5$ ) e ZP ( $n \geq 15$ ).

#### **5.5.4 Caracterização e comparação entre dispersões coloidais de AuNPs@CMC, ZnS@CMC, Mix-Au-ZnS@CMC e Au@ZnS-CMC.**

Para caracterização dos sistemas sintetizados, foi realizada uma comparação entre as amostras de AuNPs@CMC, Au@ZnS-CMC, e ZnS@CMC, sintetizadas nas mesmas condições de síntese, e ainda com uma dispersão coloidal formada pela mistura física Mix-Au-ZnS@CMC. O primeiro grupo é formado pela estrutura “núcleo-casca” Au@ZnS-CMC. O segundo grupo de amostras é formado pela mistura física entre duas dispersões coloidais, sendo uma de AuNPs@CMC e outra de ZnS@CMC, formando uma amostra chamada de Mix-Au-ZnS@CMC. Todas as medidas foram realizadas com a mesma concentração de AuNPs e ZnS.

Para caracterização dos nanomateriais sintetizados, inicialmente foram avaliados a carga superficial e  $H_D$  das dispersões coloidais. Os resultados de DLS e potencial zeta para amostras de AuNPs@CMC, de ZnS@CMC, de Mix-Au-ZnS@CMC e Au@ZnS-CMC são apresentados na figura 5.77. Os valores encontrados nas medidas de potencial zeta estão na faixa entre -40 e -45mV em todas as amostras testadas e são relacionados à característica aniônica da CMC em torno das nanopartículas, não apresentando variações significativas para o pH testado ( $7,5 \pm 0,5$ ). Por outro lado, o  $H_D$  das amostras apresentou variação, sendo as AuNPs@CMC apresentando maior  $H_D$  ( $\sim 82 \pm 6$ nm) e os QDts de ZnS@CMC menor valor para  $H_D$  ( $\sim 37 \pm 4$ nm). A dispersão coloidal da estrutura núcleo-casca (Au@ZnS-CMC) apresenta um  $H_D$  ( $\sim 75 \pm 5$ nm) ligeiramente inferior às AuNPs@CMC, devido principalmente a mudança de conformação da CMC devido ao processo de nucleação e crescimento da casca de ZnS. Neste processo, a interação entre os íons  $Zn^{2+}$  e os carboxilatos da CMC modifica a conformação do polímero, com conseqüente diminuição do  $H_D$ .

No sistema Mix-Au-ZnS@CMC o  $H_D$  ( $\sim 67,5 \pm 5,5$ nm) é menor que em AuNPs@CMC e no sistema núcleo-casca, indicando que a interação entre os nanomateriais AuNPs@CMC e ZnS@CMC é suficiente para provocar alterações significativas na conformação da CMC em torno das AuNPs@CMC. Essa observação é explicada pelo fato dos dois sistemas misturados, mesmo apresentando valores de carga superficial negativa, conforme medidas de potencial zeta, tem diferenças significativas de tamanho, permitindo a interação próxima entre os QDts de ZnS@CMC e a superfície das AuNPs@CMC. Os resultados de carga superficial e o  $H_D$  das dispersões coloidais



confirmam a estabilidade e grande influência da conformação da CMC nas propriedades dos coloides sintetizados.

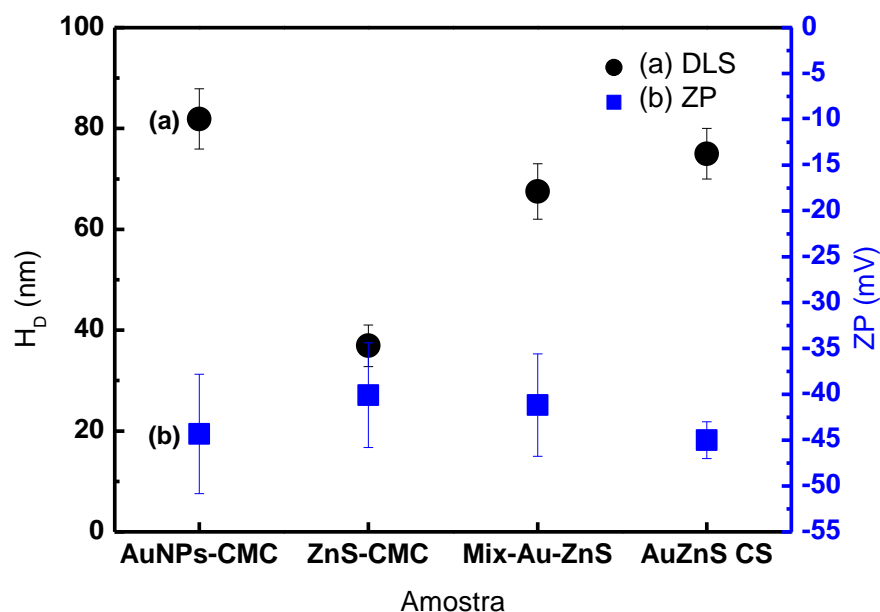


Figura 5.77 - Resultados de (a) DLS e (b) potencial Zeta para amostras de AuNPs@CMC, ZnS@CMC, Mix-Au-ZnS@CMC e Au@ZnS-CMC. Todas as amostras foram medidas em pH  $7,5 \pm 0,5$ . DLS ( $n \geq 5$ ) e ZP ( $n \geq 15$ ).

### 5.5.5 Caracterização espectroscópica Au@ZnS-CMC

Para a caracterização óptica foi empregada à técnica de espectroscopia UV-Vis para avaliar o efeito da interação entre AuNPs@CMC e ZnS@CMC. Essa avaliação foi realizada pelas alterações do pico de ressonância de LSPR das AuNPs@CMC, pela banda de absorção associada à recombinação excitônica do semiconductor e pela variação de absorbância dos coloides. A figura 5.78 apresenta as medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC. Nos espectros de nanoheterojunções Au@ZnS-CMC, ZnS@CMC e Mix-Au-ZnS@CMC foi observado uma banda em torno de 290nm correspondente a transição excitônica do ZnS@CMC, representando um “quantum shift” em relação ao ZnS “bulk” de 3,61 eV para 4,27 eV ( $\Delta E_g = 0,6$  eV). Por outro lado, nos espectros de AuNPs@CMC, Au@ZnS-CMC e Mix-Au-ZnS@CMC é observada a banda referente ao LSPR do núcleo metálico. As duas importantes regiões espectrais são detalhadas nas figuras 5.79 e 5.80.

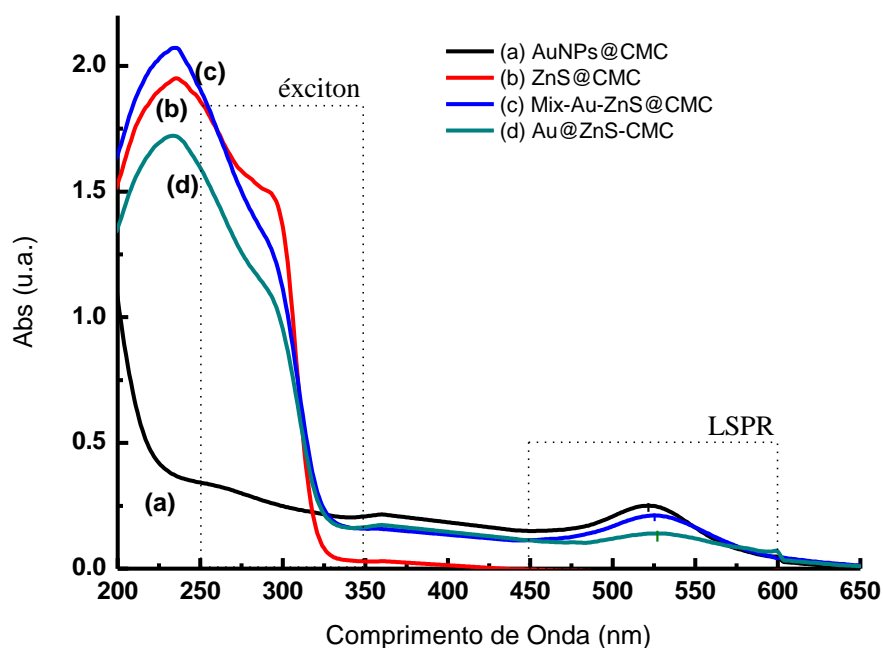


Figura 5.78 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC.

O ZnS@CMC, é um semiconductor de amplo band gap, 3,61eV para o “bulk” e em torno de 4eV para nanocristais (devido ao confinamento quântico), assim é esperado absorção de energia em torno de 300 nm <sup>(112, 225-226)</sup> (região do ultravioleta). Por outro lado, é importante destacar na análise da absorbância nesta região espectral, que a absorção de energia por AuNPs é significativamente dependente, da morfologia e do meio dielétrico em torno de sua superfície. Para nanopartículas esféricas e com diâmetro em torno de 20nm é esperado um pico no espectro de absorbância em torno de 520nm, e nenhuma absorção de energia na faixa entre 600 e 800 nm.

A figura 5.79 apresenta as medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC, para região entre 450 e 600nm (ZnS sintetizado com estequiometria 1:1 e pH 7,5±0,2). A região compreendida entre 450 e 600nm apresenta absorção centrada em 520nm devido à absorção de energia causada pela oscilação coletiva dos elétrons de condução na superfície das AuNPs@CMC. Essa oscilação dos elétrons de condução é causada pelas pequenas dimensões das nanoestruturas metálicas, menor que o comprimento de onda de excitação. Nesta condição, o campo elétrico será uniforme em volta das nanopartículas, sendo induzido um deslocamento uniforme da densidade eletrônica e

uma forte força de restauração em relação aos núcleos positivos, resultando em uma oscilação característica dos elétrons e condução (LSPR). Esse pico de absorção é dependente do meio dielétrico em torno das AuNPs@CMC e, foi afetado pelo crescimento de uma camada de ZnS@CMC como demonstrado na figura 5.79, com um deslocamento batocrômico de 521 nm para 527 nm ( $\Delta_{LSPR} = 6$  nm). Esse resultado está de acordo com o modelo teórico apresentado na seção 5.5.2 para uma espessura de casca em torno de 2,5nm.

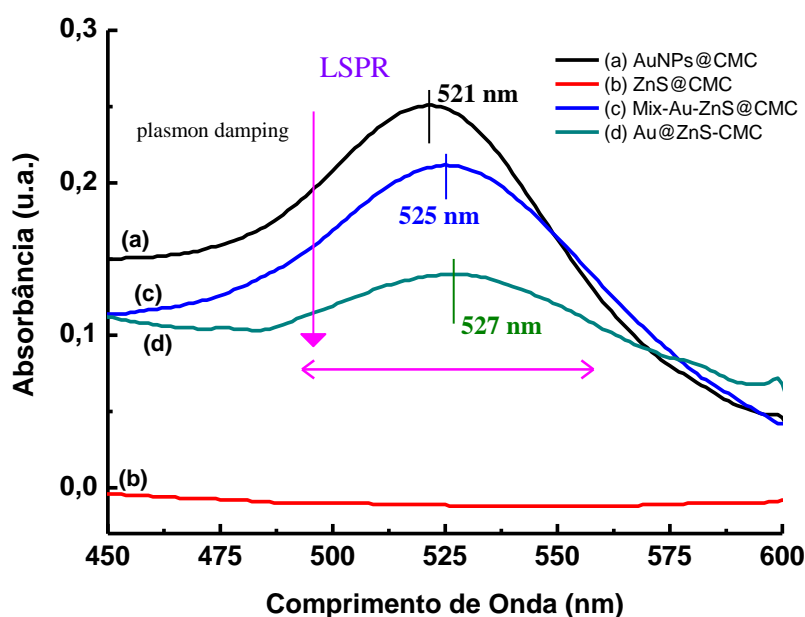


Figura 5.79 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC.

Na amostra Mix-Au-ZnS@CMC, não era esperado um deslocamento do pico de LSPR (AuNPs@CMC = 521 nm), devido a maior distância entre as AuNPs@CMC e ZnS@CMC nesta amostra, o que não afetaria o meio dielétrico próximo da superfície das AuNPs@CMC <sup>(135, 138)</sup>, devido a carga superficial negativa em ambas as amostras coloidais. A dispersão coloidal de ZnS@CMC apresenta ZP ~40 mV com  $H_D$  de ~37nm (Fig. 5.77), e por outro lado, as soluções coloidal de AuNPs@CMC apresentam ZP de ~ -45 mV e  $H_D$  de ~82 nm (Fig. 5.77). A CMC é um polímero aniônico com carga negativa devido aos grupos  $-COO^-$ . Nesta amostra, a carga negativa em ambos os sistemas (AuNPs@CMC e ZnS@CMC) causa uma repulsão entre o componente metálico e o semiconductor, não permitindo que o meio dielétrico seja

alterado na superfície do núcleo metálico e como consequência não alterando a ressonância de plasmon. Contudo, foi observado que o material semiconductor alterou a ressonância de plasmon nas amostras formadas pela mistura entre os componentes separados de dispersões coloidais de AuNPs@CMC e ZnS@CMC, com um deslocamento batocrômico de 521 nm para 525 nm ( $\Delta_{LSPR} = 4$  nm). Esse resultado está relacionado à interação do ZnS@CMC com a superfície das AuNPs@CMC devido a suas pequenas dimensões e a interação entre as cadeias poliméricas de CMC na mistura, devido a distribuição da densidade de carga ao longo das cadeias, causando aproximação entre o material semiconductor e a superfície metálica.

Em relação a intensidade de absorvância na região espectral do LSPR, foi observada a redução nas amostras de Au@ZnS-CMC e Mix-Au-ZnS@CMC. Esse fenômeno é conhecido como amortecimento de plasmon “plasmon damping”, sendo relacionado à interação entre o metal e o semiconductor. A presença do material semiconductor amortece a oscilação dos elétrons livres através da transferência de carga e/ou pela alteração da resistência ao deslocamento da densidade de carga na superfície do núcleo metálico <sup>(227-228)</sup>, diminuindo assim a amplitude da oscilação dos elétrons livres, com consequentemente redução da intensidade de absorção de energia pela dispersão coloidal. Na estrutura núcleo-casca o efeito é mais significativo devido a maior cobertura da superfície metálica pelo ZnS.

A região espectral compreendida entre 190 e 450nm, é dominada principalmente por efeitos de transições excitônicas no ZnS e por fenômenos de absorção óptica pelo núcleo de AuNPs@CMC na região do ultravioleta. A figura 5.80 apresenta as medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC. Nos espectros de nanoheterojunções Au@ZnS-CMC e Mix-Au-ZnS@CMC foi observado uma banda em torno de 290 nm correspondente a transição excitônica do ZnS@CMC. No espectro da dispersão coloidal de AuNPs@CMC foi observado absorção devido às transições intra-banda do núcleo (transição de elétrons 5d para a banda 6sp) <sup>(237-238)</sup>. Nesta faixa espectral não é observada influência da ressonância plasmônica na absorvância da dispersão coloidal.

Nas amostras de Mix-Au-ZnS@CMC e Au@ZnS-CMC foi observado que a banda referente ao éxciton, apresentou significativo deslocamento, devido

principalmente as dimensões de confinamento quântico entre as amostras, QDts ~4nm (Fig. 5.66) e Au@ZnS-CMC ~2,5 nm de espessura, apresentando clara alteração na intensidade e forma da absorção pelo éxciton, em comparação ao ZnS@CMC. O resultado para Au@ZnS-CMC, comprova que mesmo o regime de confinamento quântico ocorrendo na espessura do ZnS, o éxciton foi claramente identificado, comprovando que a CMC limitou o crescimento da casca em dimensões da ordem do confinamento quântico, destacando, que o ZnS cresceu acompanhando a curvatura das AuNPs@CMC. Os resultados para o espectro de absorbância em todas as faixas espectrais são um indicativo do acoplamento entre os éxcitons do ZnS e os plasmons no núcleo metálico, shift de LSPR e éxciton, em um regime de acoplamento fraco, onde cada entidade quântica atua existindo separadamente <sup>(153-154)</sup>.

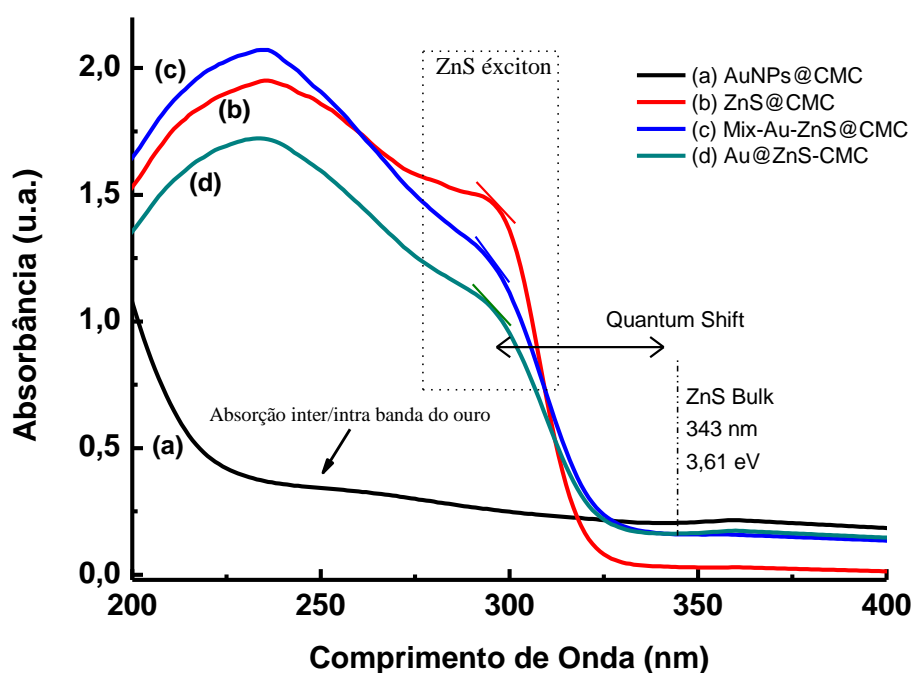


Figura 5.80 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC.

As medidas de fotoluminescência na nanoheterojunção Au@ZnS-CMC e Mix-Au-ZnS@CMC, foram comparadas com as medidas realizadas em amostras de ZnS@CMC (Fig. 5.81(A)). Pelos resultados, foi observado uma redução da intensidade de emissão “quenching” pelas amostras de Au@ZnS-CMC e Mix-Au-ZnS@CMC, sendo a maior diminuição de emissão observada na amostra da Mix-Au-ZnS@CMC.

Neste trabalho, postulamos que o “quenching” é resultado do curto “overlap” entre o LSPR do núcleo metálico e a emissão da casca de ZnS (Fig. 5.81(B)), o que tem sido considerado um fator de “quenching” na emissão de QDs de ZnS <sup>(229)</sup>, além dos processos de transferência de carga e energia gerada pelo contato direto entre o metal e o semicondutor, sendo que é bem conhecido que QDs podem sofrer “quenching” na sua emissão quando próximos a AuNPs <sup>(230)</sup>, efeito que é dependente da distância entre o emissor e a nanopartícula <sup>(231-238)</sup>. Como foi observado pelas medidas de espectroscopia UV-Vis, através do deslocamento do pico de ressonância de plasmon no núcleo metálico, é esperado contato entre o ZnS@CMC e a superfície das AuNPs@CMC, justificando assim o “quenching” observado nos espectros de PL para as medidas de Mix-Au-ZnS@CMC (~40%). Por outro lado, o sistema Au@ZnS-CMC apresentou significativa emissão apesar da remoção do ZnS@CMC livre (Apêndice 1). Sendo uma nanoestrutura tridimensional, com casca semicondutora de significativa área e massa (por emissor quântico), sendo o efeito de confinamento quântico observado na espessura do material e apresentado significativa quantidade de defeitos devido ao processo de nucleação e crescimento mediado por CMC, tais como: lacunas e átomos intersticiais; defeitos unidimensionais, como, discordâncias; defeitos associados as interfaces entre regiões com diferentes estruturas cristalinas ou diferentes orientações cristalográficas; defeitos tridimensionais, associados ao crescimento de nanocristais em várias direções em torno das AuNPs@CMC e, ainda, a deformação mecânica promovendo a formação de imperfeições. Além dos complexos mecanismos de troca de carga/energia e o acoplamento entre os diferentes processos físicos de SPR e éxciton na interface, a nanoheterojunção compensa o efeitos de distância metal/semicondutor, apresentando emissão.

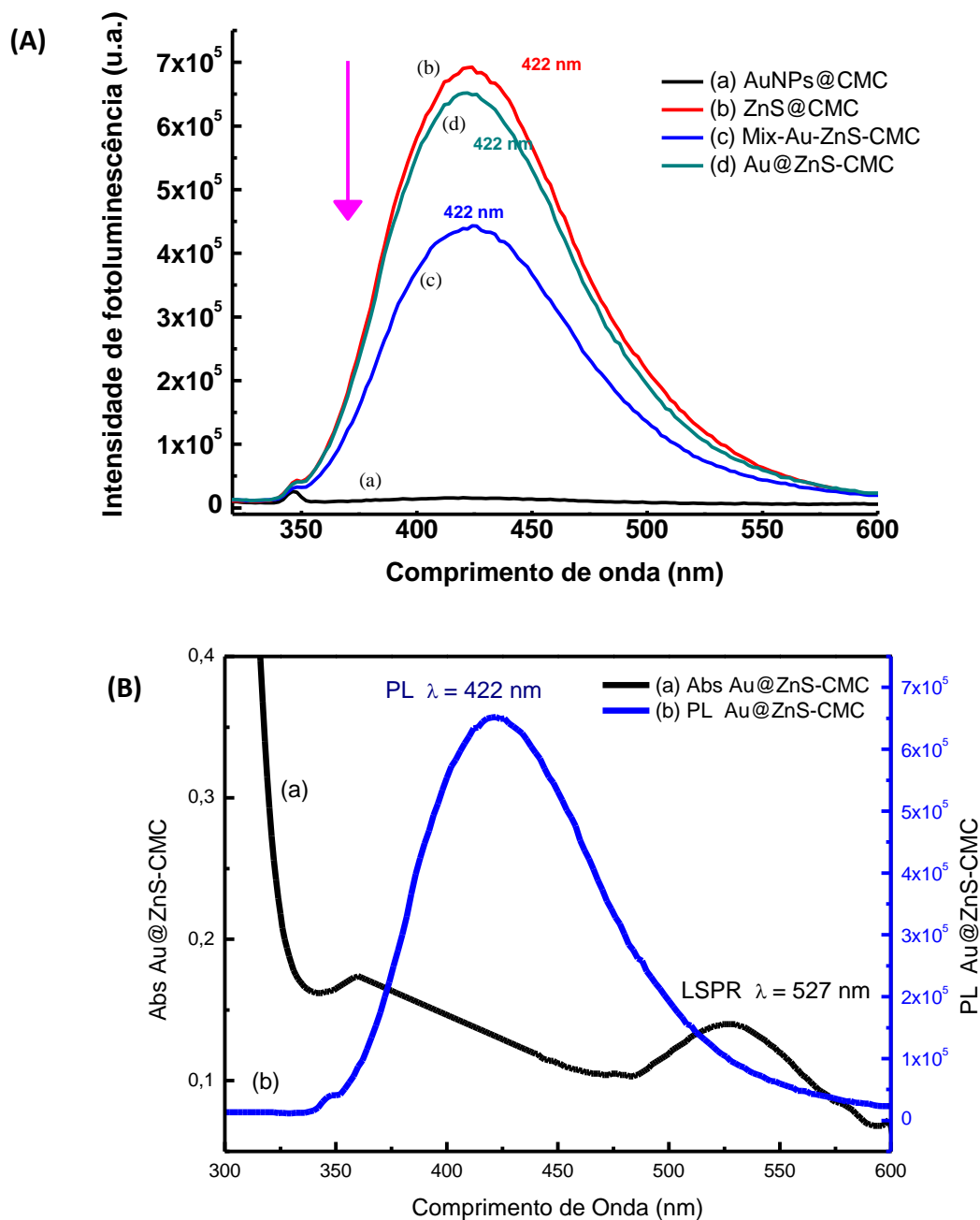


Figura 5.81 – (A) Medidas de espectroscopia de fotoluminescência (PL) de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC e (d) Au@ZnS-CMC. (B) Comparação entre PL e absorvância para amostra de Au@ZnS-CMC.  $\lambda_{exc} = 310$  nm.

Para compreensão das propriedades ópticas dos sistemas estudados, foram realizados mapas de excitação e emissão 3D. A figura 5.82 apresenta os resultados dos mapas 3D para (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Au@ZnS-CMC e (d) Mix-Au-ZnS@CMC, todos ajustados para a mesma escala de intensidade para fins de

comparação entre as diferentes amostras. Pelos resultados apresentados nos mapas 3D, a amostra de AuNPs@CMC não apresenta emissão. Por outro lado, as amostras de (b) ZnS@CMC, (c) Au@ZnS-CMC e (d) Mix-Au-ZnS@CMC apresentam forte emissão em torno de  $(420 \pm 2)$ nm com excitação em torno  $(310 \pm 2)$ nm. Nos mapas 3D ainda fica evidente o (quenching) observado na emissão das amostras de Au@ZnS-CMC e significativamente maior na Mix-Au-ZnS@CMC.

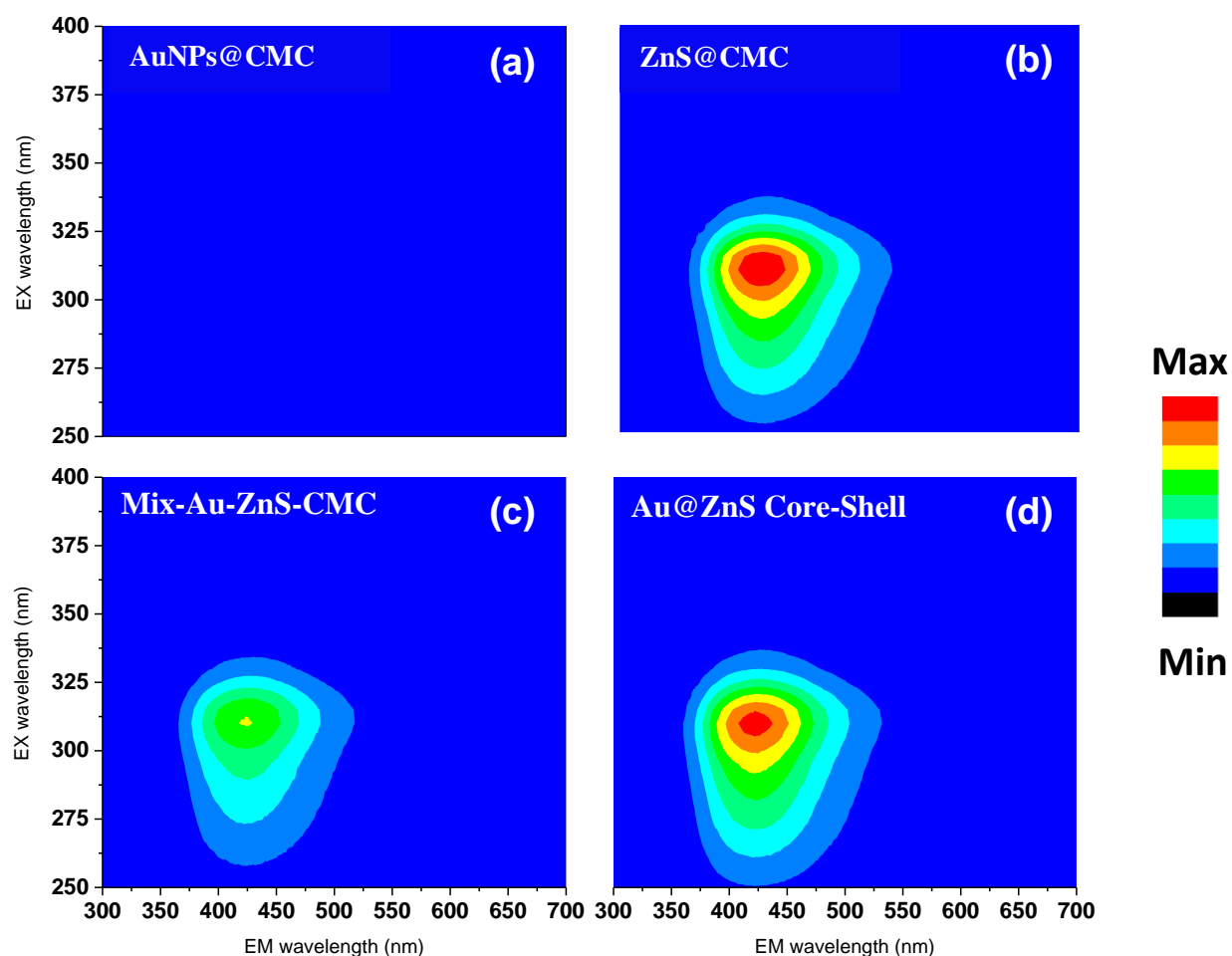


Figura 5.82 - Mapas 3D de excitação-emissão em amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) ZnS@CMC, (c) Au@ZnS-CMC e (d) Mix-Au-ZnS@CMC. (ZnS sintetizado com estequiometria 1:1 e pH  $7,5 \pm 0,2$ ).



Os espectros de fotoluminescência e os mapas 3D (PL) das amostras de ZnS@CMC, Au@ZnS-CMC e Mix-Au-ZnS@CMC exibem picos máximos de emissão predominantemente dentro da faixa de comprimento de onda de 400 a 430nm (violeta). Esses resultados estão de acordo com o comportamento típico do ZnS, onde as emissões são predominantemente baseadas em sítios ativados por defeitos, sendo a transição óptica da banda de valência para banda de condução geralmente ausente. Isso significa que os defeitos na estrutura (vacâncias de enxofre ( $V_S$ ) e metal ( $V_{Zn}$ ), e átomos intersticiais,  $I_S$  e  $I_{Zn}$ ) atuam como armadilhas eficientes para elétrons, buracos, e portadores da carga do éxciton, conduzindo à recombinação radiativa em energias mais baixas (comprimentos de onda mais elevados) do que a emissão excitônica, como já explicado no capítulo 5.3 para o ZnS@CMC (204-208).

Para a compreensão dos fenômenos observados é necessário o entendimento dos processos físicos e sua dependência com as características de absorção e emissão do metal e do semicondutor. Em nanoheterojunções Au@ZnS, temos dois estados diferentes de excitação do sistema. No primeiro estado, no "estado de excitação no bandgap", apenas o ZnS é excitado, não existindo excitação do LSPR no núcleo, contudo, na interface a barreira de Schottky tem influência nos processos de transferência de carga, com elétrons excitados no semicondutor podendo ser transferidos para o metal, suprimindo assim a recombinação elétron-buraco ( $e^-/h^+$ ) e deixando buracos no semicondutor. Esse processo favorece o "quenching" na emissão do semicondutor. Na prática o sistema tem um comportamento semelhante a um diodo. No segundo estado, o "estado de excitação no LSPR", apenas o LSPR é excitado (~527nm para Au@ZnS-CMC). Nesta condição não é observada emissão pelo material semicondutor, devido a não excitação dos éxcitons. Neste caso, a transferência de elétrons do metal para o semicondutor só será possível caso estes tenham energia superior à barreira Schottky. Contudo, o LSPR é influenciado pela casca de ZnS com o deslocamento batocrômico devido a alteração do meio dielétrico em torno das AuNPs.

Para compreensão dos processos físicos na nano interface entre AuNPs e ZnS, e entre o ZnS e a CMC, é apresentado na figura 5.83 a ilustração da junção (A), e do modelo de confinamento quântico na espessura da casca de ZnS (B), e na figura 5.84 o diagrama de bandas detalhado da nanoheterojunção Au@ZnS-CMC.

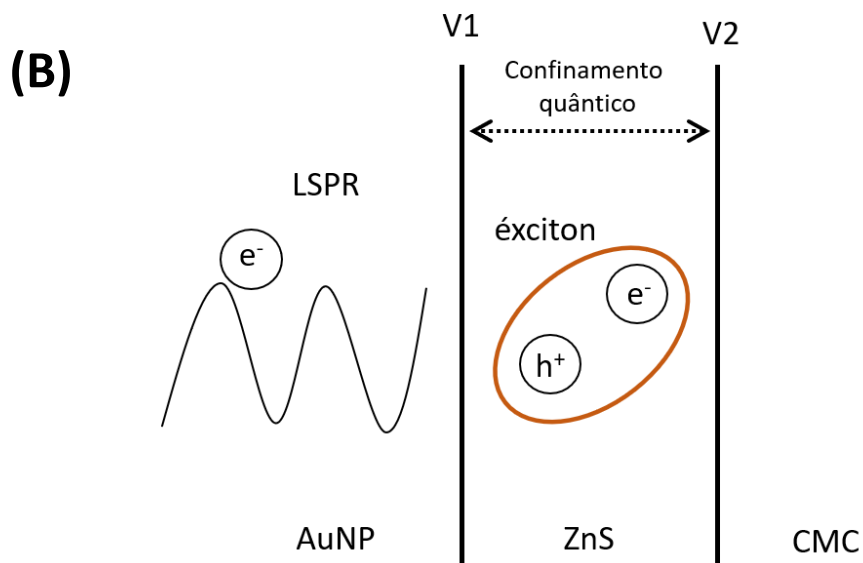
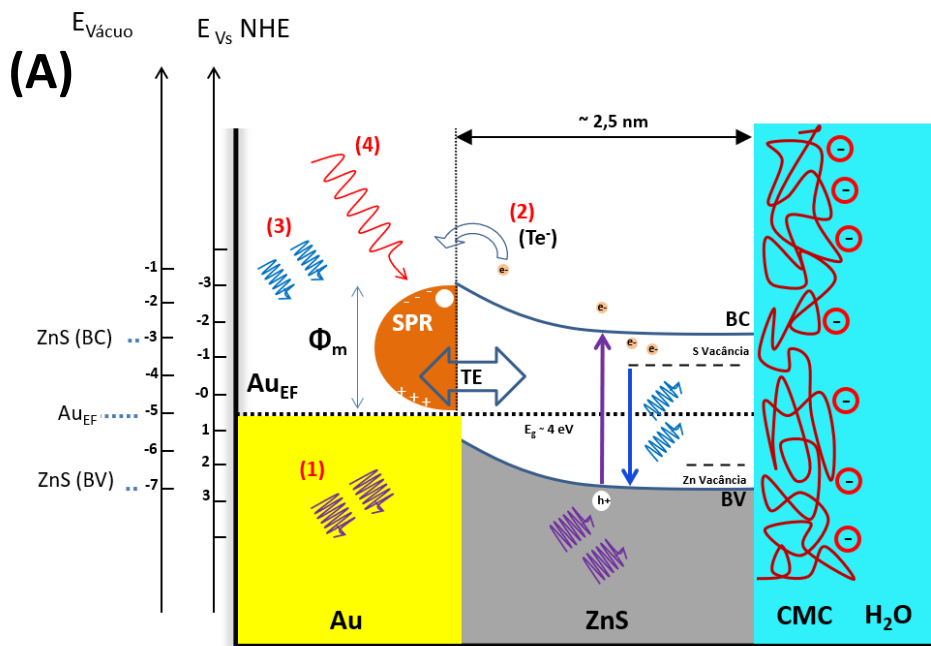


Figura 5.83 - (A) Ilustração da interface em uma junção Au@ZnS-CMC destacando os processos ópticos na interface metal/semicondutor (1) absorção do ouro na região do UV, (2) transferência de elétrons ( $Te^-$ ) na nano interface metal-semicondutor, (3) reabsorção de fótons pelo ouro e (4) absorção pelo LSPR. TE = Transferência de energia e  $Au_{EF}$  = Energia de Fermi para o ouro. (B) Modelo de confinamento quântico na espessura da casca de ZnS. (Fonte: próprio autor).

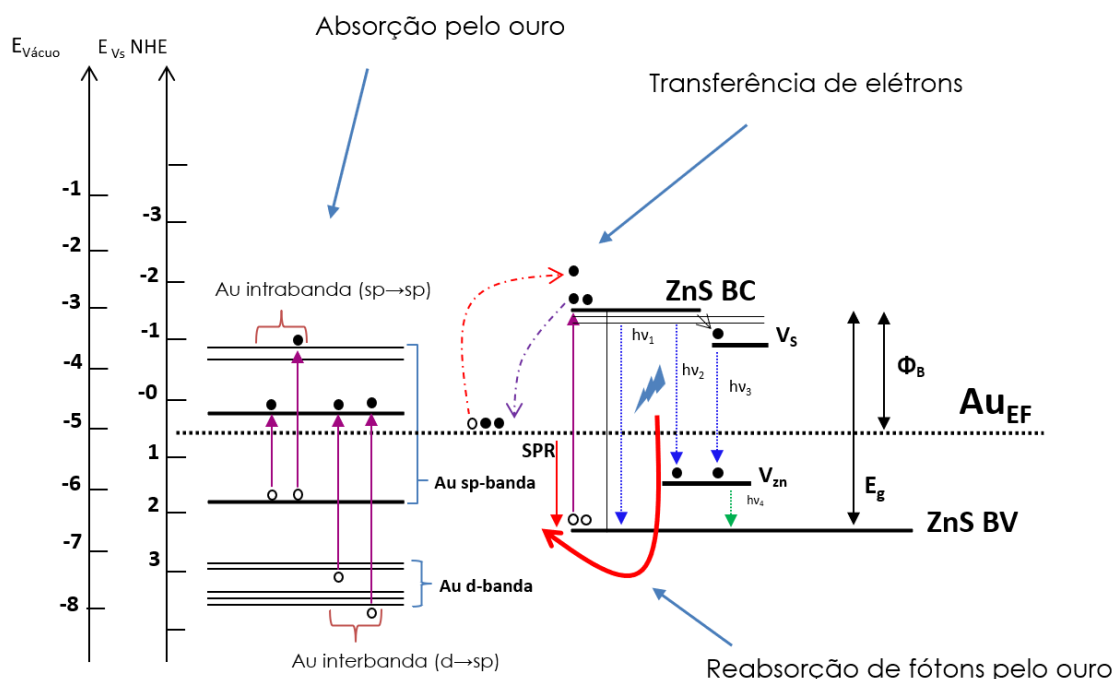


Figura 5.84 - Diagrama de bandas representando os processos esperados de absorção e emissão em uma nanoheterojunção metal-semicondutor (Fonte: próprio autor).

Primeiro, sob irradiação de luz UV ( $\lambda \sim 300\text{nm}$ ), ambos os materiais estão absorvendo luz, como mostrado por medidas de UV-Vis na figura 5.78. AuNPs@CMC têm absorção óptica na região do UV devido a transições interbanda (transição de elétrons 5d para a banda 6sp) <sup>(237-238)</sup>, sendo essa absorção de luz acontecendo sem excitação de LSPR, para a condição de excitação  $\lambda \sim 300\text{nm}$ . Esta absorção da luz pelo metal, contudo, diminui a energia disponível para a excitação do semicondutor, e assim, reduzindo a taxa de transições eletrônicas. A absorção de energia pelo ZnS leva o sistema para o estado excitado, com transições de elétrons da banda de valência (BV) para banda de condução (BC). Transições não-radiativas para estados de defeitos na estrutura (vacâncias de enxofre ( $V_s$ ) e metal ( $V_{Zn}$ ), e átomos intersticiais,  $I_s$  e  $I_{Zn}$ ) e posterior recombinação radiativa em energias mais baixas (comprimentos de onda mais elevados) do que a emissão excitônica, são responsáveis para emissão observada nos espectros de PL. No sistema Au@ZnS-CMC, a probabilidade de defeitos na estrutura é significativamente maior do que em nanocristais de ZnS, devido ao mecanismo de nucleação e crescimento mediado pela CMC e, o tipo de estrutura tridimensional que acompanha a curvatura das faces cristalinas do ouro. Essa característica

morfológica/estrutural contribui para a significativa emissão observada neste sistema coloidal.

O segundo mecanismo é a transferência de carga do semicondutor para o metal. Na interface a diferença entre a banda de condução do semicondutor (BC) e a energia de Fermi do metal ( $Au_{EF}$ ) (figura 5.83) forma uma barreira Schottky, uma barreira potencial de energia formada em uma junção metal-semicondutor. Neste design, o metal atua como o ânodo e o semicondutor do tipo N atua como o cátodo, semelhante a um diodo do tipo Schottky. Nesta situação, os elétrons excitados no semicondutor são preferencialmente transferidos para o metal, o que assegura a efetiva transferência de elétrons da casca de ZnS para o núcleo de AuNPs@CMC. Esta transferência de carga do semicondutor ao metal suprime a recombinação elétron-buraco ( $e^-/h^+$ ) deixando buracos no semicondutor. Por outro lado, a transferência de carga do metal para o semicondutor é possível apenas quando o sistema está excitado na frequência de ressonância do LSPR (~520nm). Três mecanismos podem ser descritos para compreender a transferência de carga/energia do metal para o semicondutor. O primeiro é a transferência direta de elétrons da densidade de carga em oscilação no metal (LSPR) para o material semicondutor, elétrons esses chamados de “elétrons quentes”<sup>(155-158)</sup> (Fig. 3.10). Esse mecanismo será possível apenas durante a excitação do núcleo metálico na condição de LSPR e para contato direto entre o metal e o semicondutor. O segundo mecanismo de transferência de energia ocorre através da mediação do campo eletromagnético local criado na condição de LSPR que contribui radiativamente para a geração de pares ( $e^-/h^+$ ) no semicondutor. Esse mecanismo, contudo, só ocorre para situações em que a energia plasmônica é maior que o bandgap do semicondutor. Finalmente, os fótons emitidos pelo semicondutor podem excitar o LSPR na superfície do metal devido a curta sobreposição entre os espectros de emissão do semicondutor e o espectro de absorção do metal. A casca de ZnS atua como o "doador" e o núcleo de AuNPs como o "aceitador". Esta transferência de energia pode influenciar significativamente o processo de quenching observado devido à sobreposição entre a emissão de ZnS e a banda LSPR de AuNPs@CMC e a distância entre o doador e o aceitador. Outro mecanismo possível neste sistema é a reabsorção de fótons emitidos por uma partícula por partículas vizinhas. A reabsorção destes fótons pelo coloide provoca uma diminuição da luz emitida pelo material.

Como pode ser observado, o sistema núcleo-casca, apresenta emissão de maior intensidade quando comparado à Mix-Au-ZnS@CMC. Importante ainda ressaltar, que a amostra núcleo/casca foi purificada para remoção de possível ZnS livre, diminuindo assim qualquer emissão residual no sistema. A estrutura projetada neste trabalho difere em tamanho e forma de QDts convencionais. Neste caso, o confinamento quântico é devido à espessura do ZnS, em contraponto ao ZnS@CMC puro, cujo confinamento é devido ao tamanho dos nanocristais. Neste sistema, a emissão de luz é improvável devido ao contato direto que favorece o quenching<sup>(230-233, 235)</sup>, devido à transferência de elétrons do semicondutor para o metal. Contudo, foi observada significativa emissão de fotoluminescência. Associamos a emissão a fatores relacionados à estrutura da casca de ZnS; primeiro, no mecanismo de nucleação e crescimento do sistema núcleo/casca, é significativa a probabilidade de defeitos na estrutura cristalina do ZnS, devido a morfologia do semicondutor na superfície do metal com maior área de emissão competindo com a maior área de contato e significativa probabilidade de defeitos na estrutura cristalina devida ao não perfeito ordenamento e, além disso, ao contorno seguindo a conformação do polímero. Segundo, a probabilidade de decaimento nos estados de defeitos para a banda de valência com consequente recombinação do par eletro/buraco com emissão de um fóton é mais provável que a transferência de carga na interface do semicondutor para o metal. Terceiro, ao contrário do confinamento quântico em nanocristais, na nanoheterojunção Au@ZnS-CMC o confinamento do éxciton ocorre na espessura do semicondutor, e sob influência da densidade carga da superfície do núcleo metálico e do polímero de recobrimento, isso tende a manter o éxciton por maior período de tempo confinado antes da recombinação, com um acoplamento fraco entre as entidades quânticas. A combinação destes efeitos competitivos, em uma nanoestrutura crescida sob a mediação da CMC, torna possível a emissão por Au@ZnS-CMC.

Os efeitos físicos relatados atuam juntamente com as características da dispersão coloidal. As amostras de Au@ZnS-CMC e Mix-Au-ZnS@CMC tem mesma concentração inicial de AuNPs, com  $N_{AuNPs} = 8 \times 10^{11}$  AuNPs/cm<sup>3</sup>, sendo um número de QDts de ZnS de  $N_{QDts ZnS} = 7 \times 10^{17}$  QDts/cm<sup>3</sup> para a amostra de Mix-Au-ZnS@CMC. Destacando que a quantidade de ZnS para a amostra Au@ZnS-CMC é menor devido ao processo de purificação para remoção de ZnS livre (Apêndice 1) .

Devido a área de superfície de cada AuNPs, a probabilidade de encontro entre AuNPs e QDts é alta, contribuindo para o processos de troca de energia durante o contato.

Como demonstrado na seção 5.3, AuNPs tem alta seção de choque de espalhamento, sendo significativamente maior que o ZnS, devido ao material e ao raio ( $R_{Au} \gg R_{ZnS}$ ) das partículas. Em Au@ZnS-CMC o espalhamento é reduzido devido a cobertura pelo ZnS, sendo ainda observado uma significativa diminuição da absorção de energia devido ao amortecimento do LSPR. Esse mecanismo de espalhamento contribui para maior absorção de energia pela casca de ZnS, e conseqüentemente maior emissão na nanoheterojunção.

### **5.5.6 Caracterização morfológica e estrutural**

Os resultados da caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fig. 5.85(A)) e de MET (Fig. 5.85(B)), são apresentados na figura 5.85. A figura 5.85 (A) apresenta imagens de MEV para os sistemas de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC e (c) Mix-Au-ZnS@CMC. A figura 5.85 (B) apresenta imagens de MET para os sistemas de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC. Essas amostras estão com a mesma concentração de ouro e ZnS, com ZnS sintetizado com estequiometria 1:1 e pH  $7,5 \pm 0,2$ .

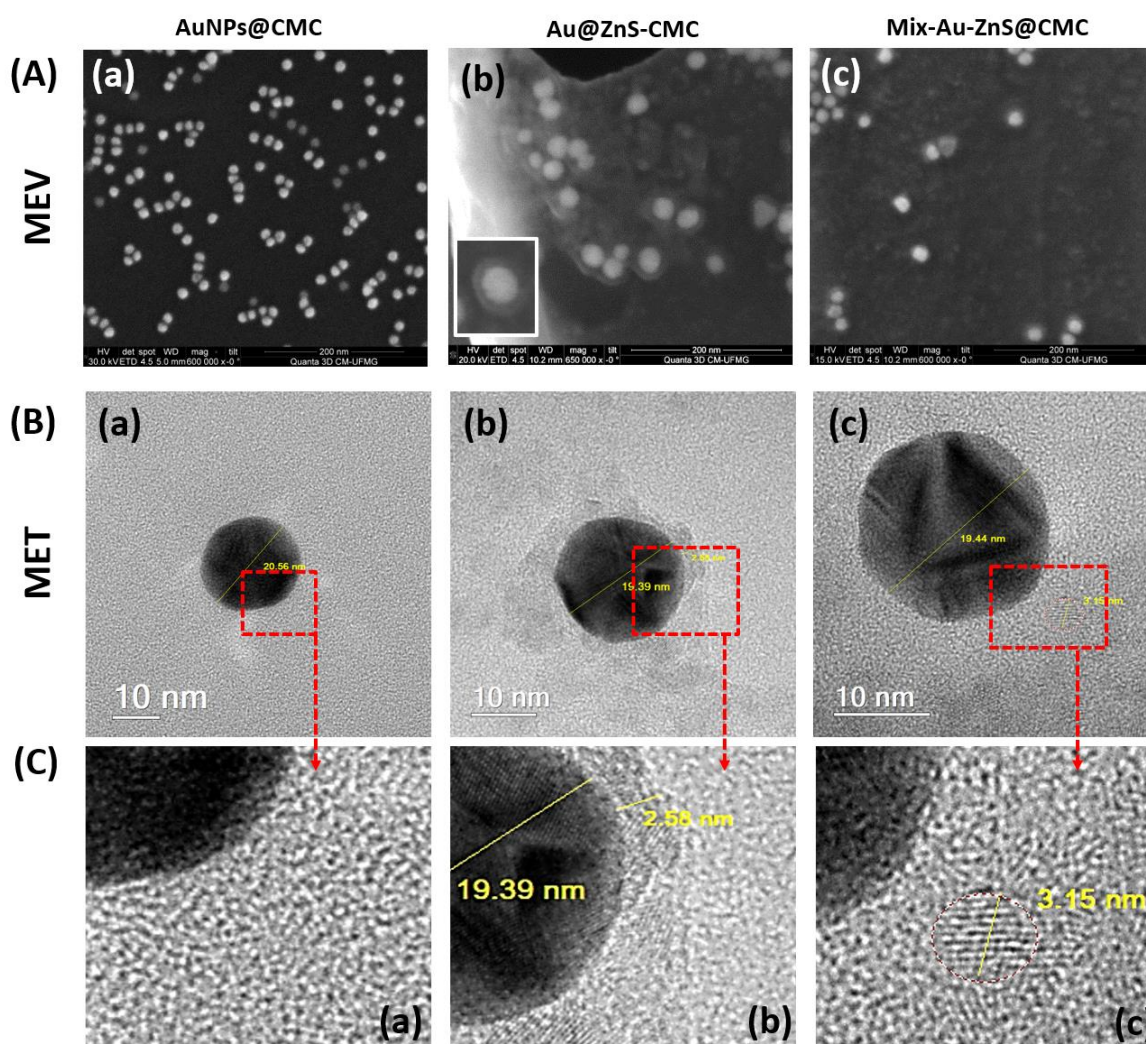


Figura 5.85 - (A) imagens de MEV para os sistemas de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC e (c) Mix-Au-ZnS@CMC. (B) imagens de MET para os sistemas de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC. (C) imagens de MET de alta resolução destacando as os sistemas mostrados em (B) (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) Mix-Au-ZnS@CMC.

Pelas imagens de MEV e MET observamos a formação de uma nanoestrutura do tipo núcleo-casca entre AuNPs@CMC e ZnS@CMC. Em relação ao sistema núcleo-casca, a distribuição de espessura da casca é apresentada na figura 5.86 e de distribuição de diâmetro do núcleo na figura 5.87. Pelos resultados apresentados é observado que a casca de ZnS tem uma espessura média de  $(2,6 \pm 1,0)\text{nm}$  crescida sob um núcleo de AuNPs@CMC de diâmetro  $(20,5 \pm 1,5)\text{nm}$ . Esses resultados estão em linha com os esperados, levando em consideração o projetado pelo modelo matemático apresentado.

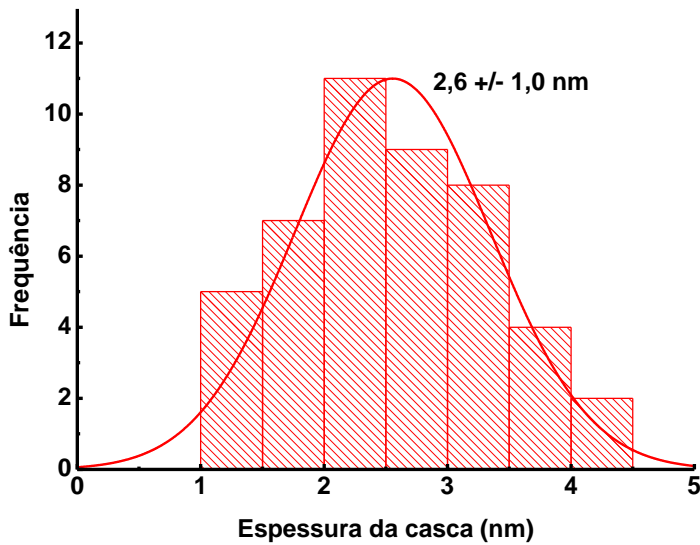


Figura 5.86 - Distribuição de espessura para a casca de ZnS medidas em imagens de MET.

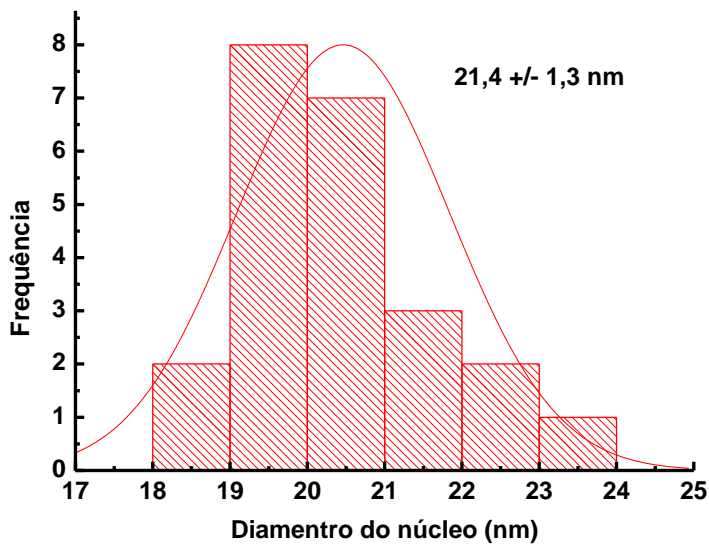


Figura 5.87 - Distribuição de diâmetros para o núcleo de ouro medido em imagens de MET.

A figura 5.88 apresenta uma imagem típica de MET de alta resolução de uma nanoestrutura núcleo/casca Au@ZnS-CMC (a), destacando a medida de distâncias interplanares em diferentes posições da nanopartícula. Os valores medidos de distância interplanar podem ser indexados como referindo-se ao plano 111 ( $2,4 \pm 0,3 \text{ \AA}$ ) do ouro



de estrutura cúbica de face centrada e com o plano ZnS 111 ( $3,0 \pm 0,3 \text{ \AA}$ ) de estrutura cúbica de face centrada (ICCD: 80-0020).

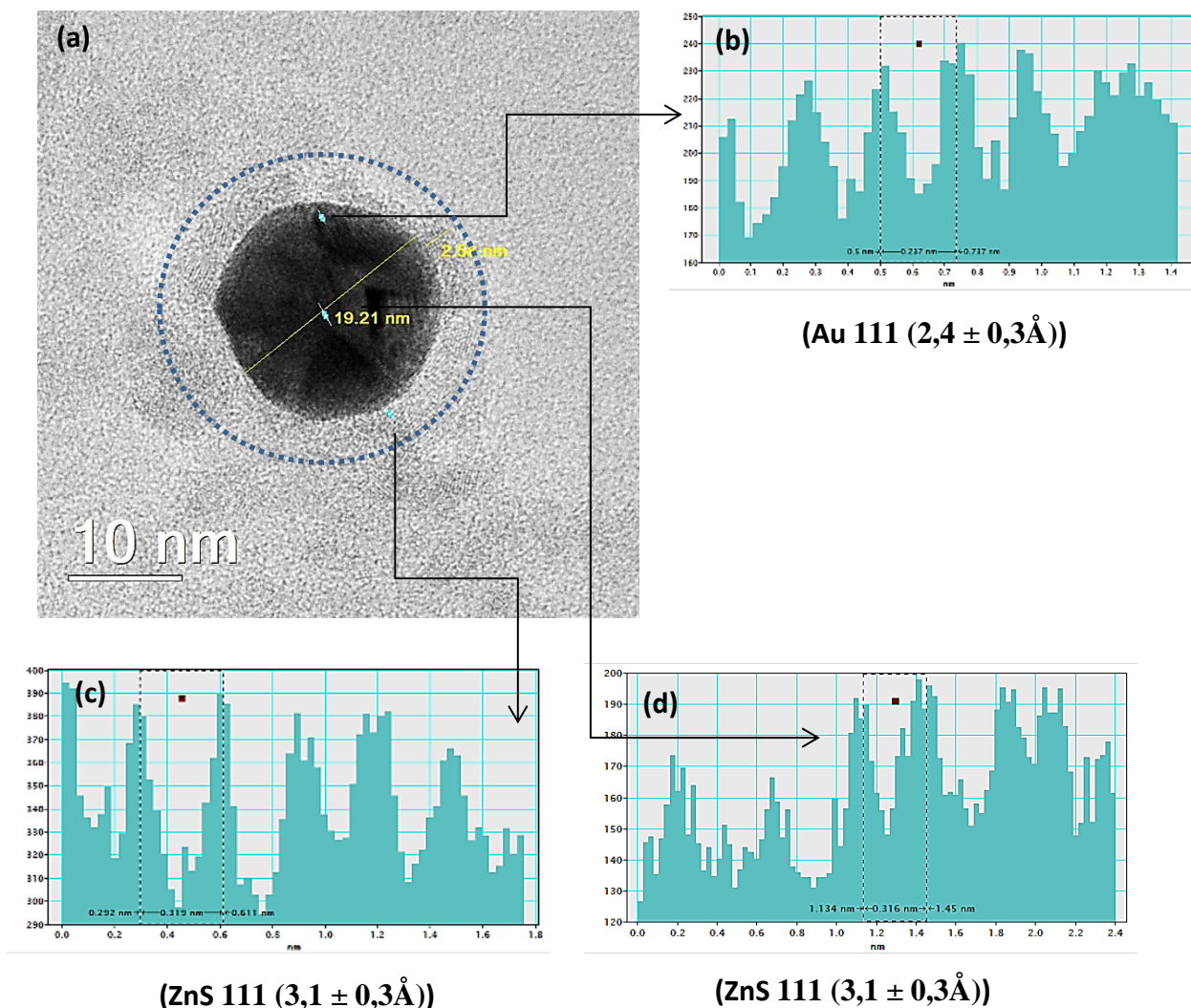


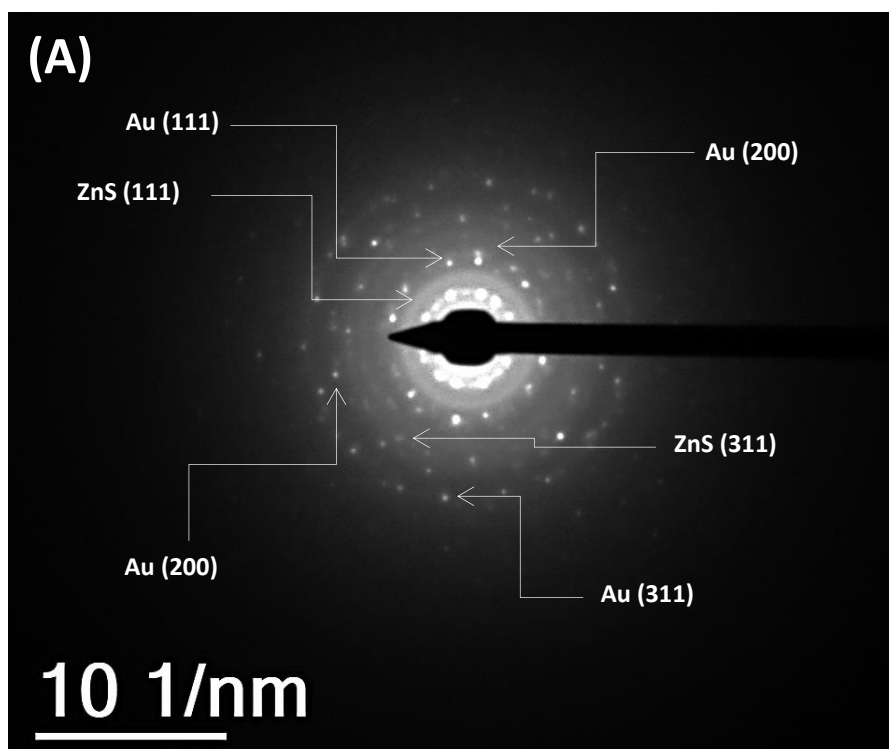
Figura 5.88 - Avaliação da nanoestrutura núcleo-casca por MET. (a) Imagem de uma nanoestrutura de Au@ZnS-CMC destacando a medida de distância interplanar na casca e no núcleo. (b) distância interplanar identificada pela estrutura do ouro. (c) distância interplanar identificada na estrutura do ouro. (c) distância interplanar identificada na estrutura do ZnS. (d) distância interplanar identificada na estrutura do ZnS.

A análise estrutural da nanoestrutura Au@ZnS-CMC foi realizada por medidas de difração de elétrons de área selecionada (SAED). AuNPs podem apresentar diferentes organizações cristalográficas, com cinco picos de difração podendo ser indexados como

(111), (200), (220), (311) e (222), sendo a estrutura cúbica de face centrada (cfc) a mais comum. Em temperatura ambiente, a estrutura de wurtzita hexagonal é o polimorfo estável de ZnS, no entanto, na literatura a estrutura cúbica é geralmente relatada, e ensaios de XRD são frequentemente publicados com picos relacionados aos planos (111), (220) e (311). A Figura 5.89a mostra os resultados de SAED e uma tabela comparando os resultados com os encontrados na literatura e ensaios de DRX. Os anéis identificados podem ser indexados como referindo-se aos planos de ouro 111 ( $2,4 \pm 0,3\text{Å}$ ), 200 ( $2,2 \pm 0,3\text{Å}$ ), 220 ( $1,4 \pm 0,3\text{ Å}$ ), e 311 ( $1,2 \pm 0,3\text{Å}$ ), de estrutura cfc e com os planos ZnS 111 ( $3,1 \pm 0,3\text{Å}$ ) e 311 ( $1,6 \pm 0,3\text{Å}$ ) de estrutura cfc (ICCD: 80-0020).

Esses resultados são comparados então pela figura 5.89b, que apresenta uma imagem de MET de uma nanoestrutura Au@ZnS-CMC destacando a medida de distâncias interplanares e as dimensões medidas da nanoestrutura. Os valores medidos de distância interplanar podem ser indexados como referindo-se ao plano ZnS 111 de estrutura cfc (ICCD: 80-0020).

Os resultados de MET provam a nucleação e crescimento de uma casca de ZnS nano cristalino na superfície de AuNPs@CMC medida por CMC, conforme projetado. Os resultados de caracterização morfológica validam os resultados da influência da casca de ZnS obtidos de espectroscopia óptica.



(h,k,l)	d (Å) Au@ZnS-CMC (Experimental)
ZnS (111)	3.0 ± 0.3 Å
Au (111)	2.4 ± 0.3 Å
Au (200)	2.2 ± 0.3 Å
ZnS (220)	
ZnS (311)	1.6 ± 0.3 Å
Au (220)	1.4 ± 0.3 Å
Au (311)	1.2 ± 0.3 Å

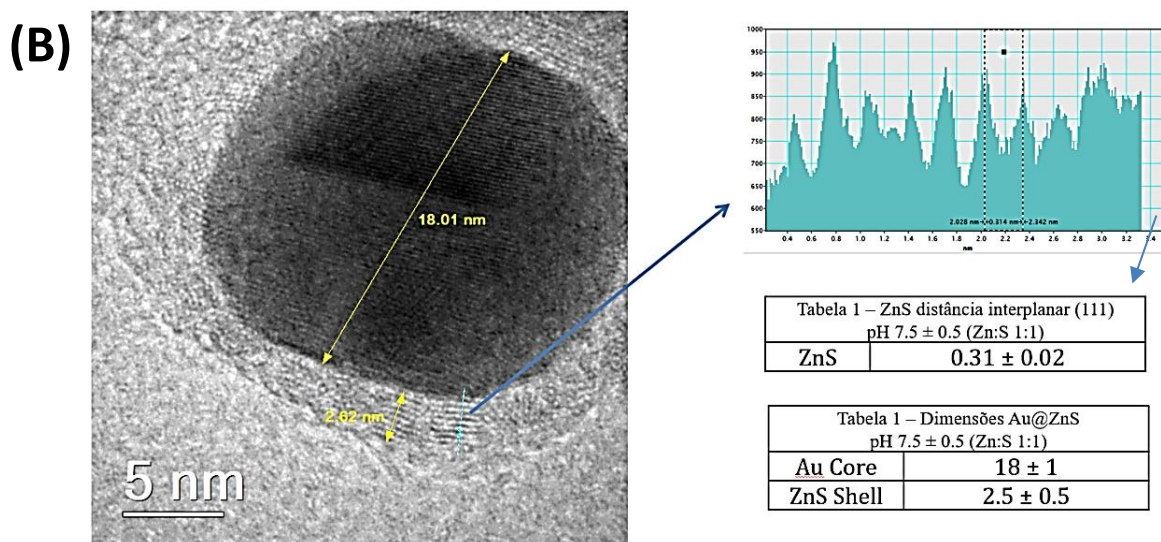


Figura 5.89 - (A) Padrão de difração de elétrons SAED e tabela com resultados com os resultados de distância interplanar da amostra de Au@ZnS-CMC. (B) imagem MET de alta resolução com medidas de dimensões da nanoestrutura.

### 5.5.7 Caracterização por mapa químico elementar

A caracterização química do sistema núcleo-casca em escala nanométrica foi aprofundada empregando à técnica de Espectroscopia de perda de energia de elétrons (da sigla em inglês: EELS “Electron Energy Loss Spectroscopy”). Os resultados são apresentados na figura 5.90. Nesta figura, em (A), são apresentados os espectros EELS obtidos nos pontos (a), (b) e (c) da imagem (B), que representam os pontos onde foram realizadas medidas pontuais de EELS (círculos na imagem (B), com resolução em torno de 2nm) medidas no centro da nanopartícula (a), na borda da nanopartícula (b) e fora da nanopartícula (c), respectivamente, demonstrando a caracterização química do sistema Au@ZnS-CMC, através da identificação das bandas em 2206eV e 2291eV referentes ao ouro <sup>(239)</sup>, e em 1020, 1043 e 1194eV referentes ao zinco <sup>(240)</sup>. Para caracterização química da estrutura núcleo-casca, foram realizadas medidas de EELS seguindo a linha apresentada na figura (B), e cujos resultados são apresentados em (C). Nesta figura, é mostrada a intensidade de sinal EELS para a borda de Zinco (I) e para a borda de ouro (II), em função da posição das partículas na linha marcada na figura 5.90 (B). Esse resultado mostra a distribuição dos elementos ao longo da linha medida, podendo ser notada a detecção dos elementos ouro e zinco, além do encobrimento dos núcleos metálicos pelo material semicondutor.

A técnica de EELS foi ainda utilizada para determinar a presença de Plasmons e o valor do band gap óptico do material semicondutor. O espectro EELS para região de baixa energia é apresentado na figura 5.91 (A) com ampliação na região do band gap na figura 5.91B. Foi identificada uma banda característica de Plasmons ( $E_p$ ) na região entre 15-30eV e outra banda entre 4-8eV, atribuída ao material semicondutor ZnS ( $E_g$ ). Pelos espectros de EELS na região de baixa perda de energia foi possível determinar band gap do ZnS <sup>(241)</sup>. Neste método, uma reta é traçada na região da borda associada a energia de band gap do semicondutor em baixa energia (Fig. 5.91(B)). O band gap foi determinado como sendo de  $3,97 \pm 0,05\text{eV}$ , compatível com as análises realizadas por espectroscopia UV-Vis pelo método Tauc.

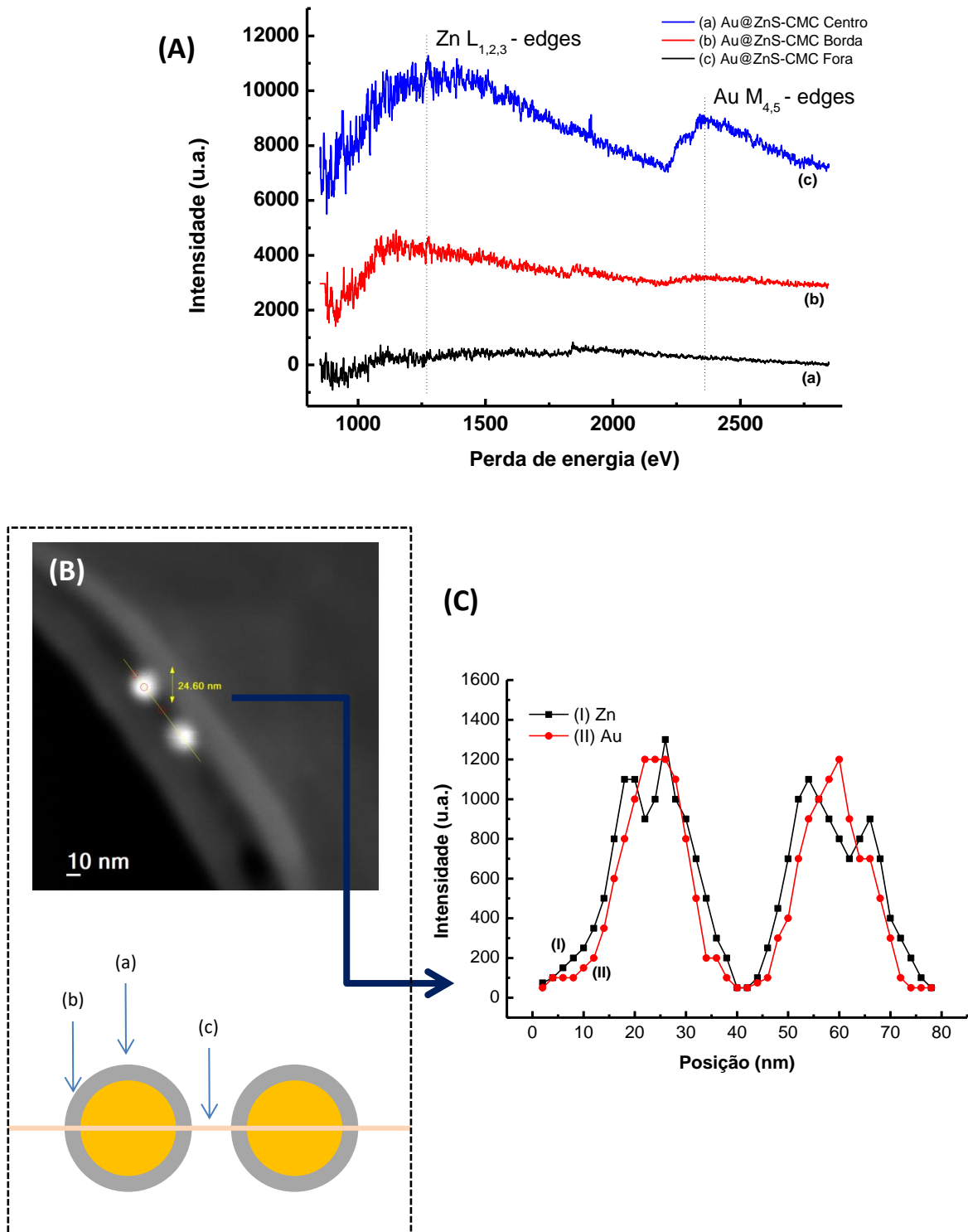


Figura 5.90 - (A) Medidas de EELS em diferentes posições das Au@ZnS-CMC mostradas em (B). (B) imagem STEM e ilustração mostrando a vista de perfil das nanopartículas, apresentado medidas no centro da nanopartícula (a), na borda da nanopartícula (b) e fora das nanopartículas (c). (C) Intensidade do sinal EELS para (I) zinco e (II) ouro em relação à posição das nanopartículas na imagem STEM (B).

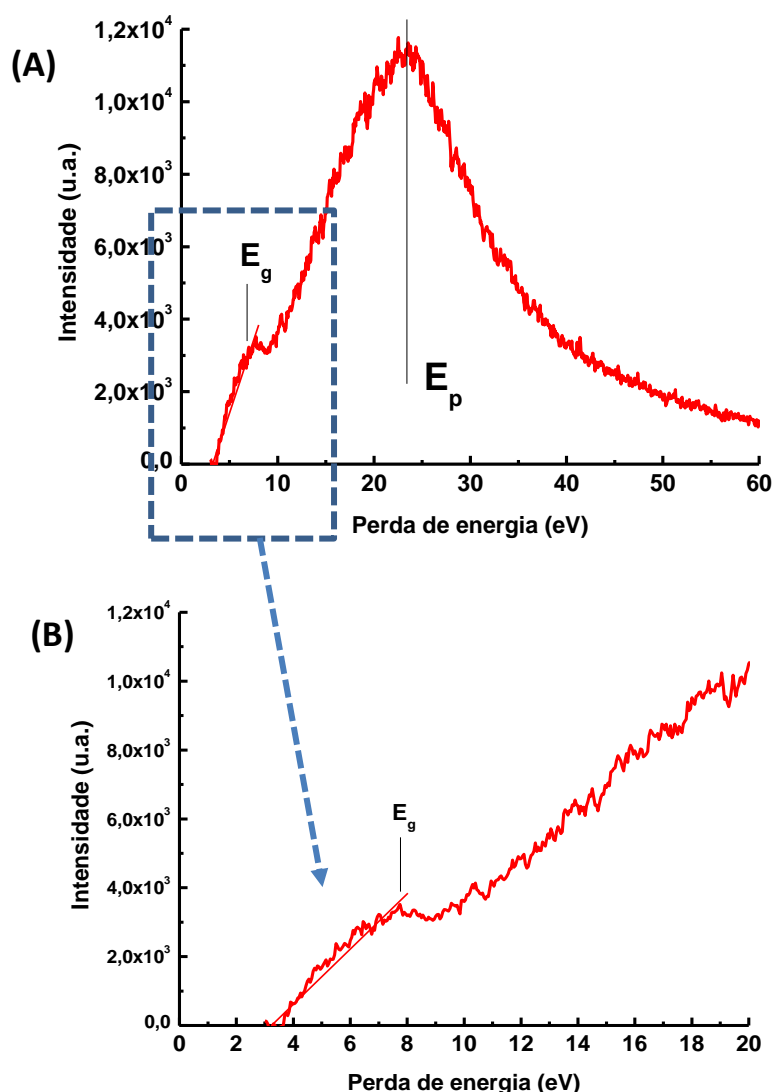


Figura 5.91 - (A) Espectros EELS medidas no centro da nanopartícula (a). (B) Ampliação da região 0-20eV do espectro (A).

Para complementar as análises pela técnica de EELS foram realizados mapas de distribuição elemental nas amostras de Au@ZnS-CMC, cujos resultados são mostrados na figura 5.92. Nesta figura, são apresentados em (a) uma imagem MET no modo varredura das nanoestruturas núcleo-casca, em (b), uma imagem de distribuição de ouro pela medida da borda  $O_{2,3}$  em 54eV, em (c), uma imagem de distribuição de zinco pela medida da borda  $M_{2,3}$  em 87eV, sendo então a figura (d), a combinação destes resultados. O Conjunto dos resultados apresentados demonstram a estrutura do tipo núcleo-casca projetada. Adicionalmente, foi mapeada a distribuição de plasmons pelos núcleos metálicos pela filtragem de energia na região entre 2 e 30eV do espectro EELS,

e ainda um mapa gerado pela filtragem de energia no gap do material semiconductor 4eV, cujo resultado é apresentado como inset na Fig. 5.92d. Esse mapa mostra a perda de energia do feixe pela interação com os plasmon gerados no movimento da densidade de carga nos núcleos metálicos e pelo band gap do material semiconductor.

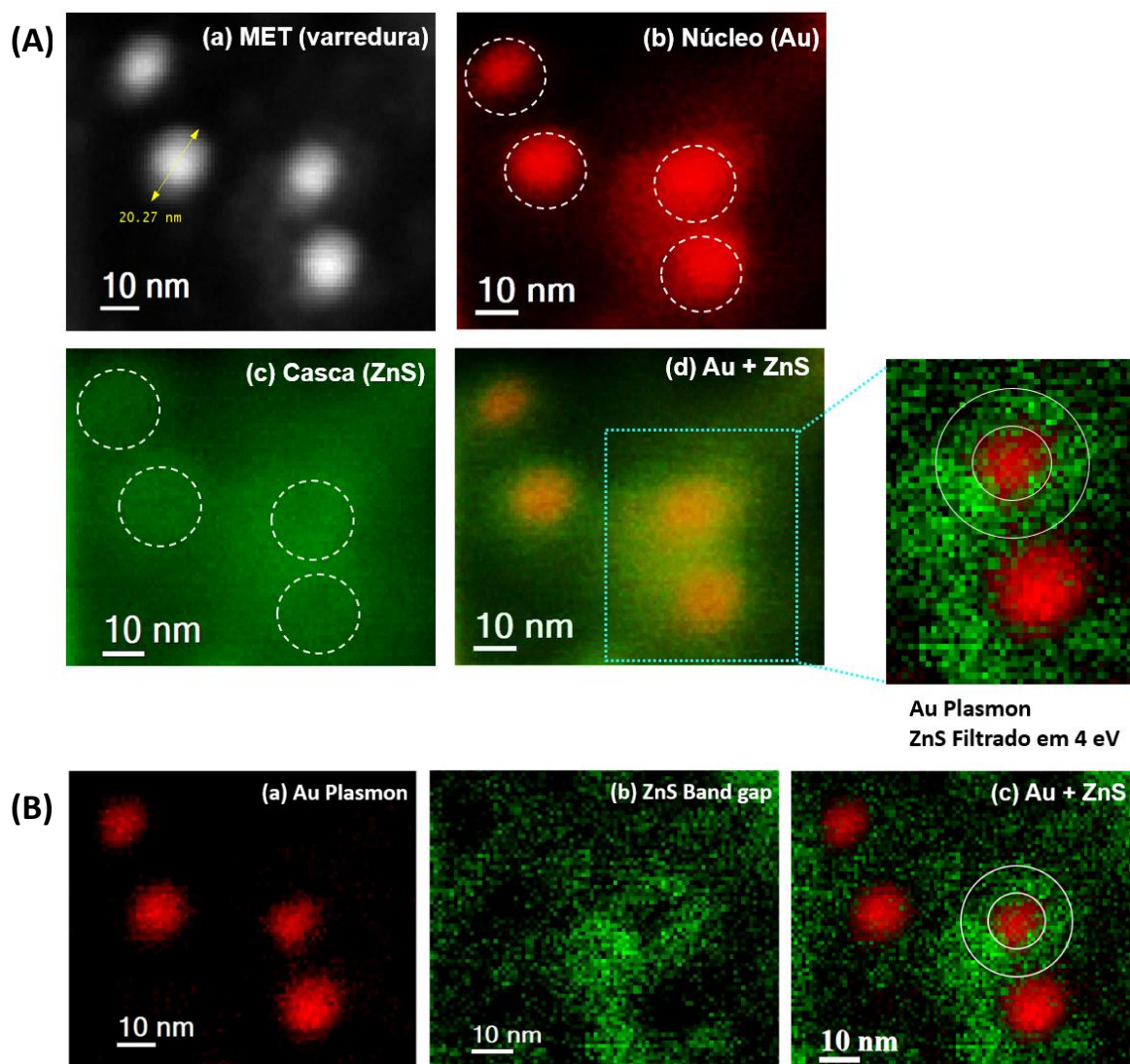


Figura 5.92 – (A) (a) Imagem STEM das nanoestruturas tipo núcleo-casca Au@ZnS-CMC. (b) Mapa de distribuição de ouro, (c) mapa de distribuição de zinco, (d) Combinação das figuras (b) e (c). Inset: Combinação do mapa de distribuição de plasmons com mapa filtrado na energia do band gap do ZnS ~ 4eV. (B) (a) Distribuição de plasmons pelos núcleos metálicos (b) mapa gerado pela filtragem de energia no gap do material semiconductor 4eV e (c) Combinação de (B) (a) e (b).

### 5.5.8 Confinamento quântico na casca de ZnS – Efeito da variação de espessura na energia do éxciton e no LSPR.

Como demonstrado pelos modelos teóricos e pelos resultados apresentados no sistema Au@ZnS-CMC, o crescimento de uma casca de ZnS tem influência no LSPR e, na absorção devido ao éxciton, em uma condição de confinamento quântico na espessura do material semiconductor. A variação da espessura é então um parâmetro importante na avaliação das propriedades ópticas em heterojunções Au@ZnS-CMC. Nas amostras de Au@ZnS-CMC (renomeada para Au@ZnS-CMC 1L), foi crescida uma camada adicional de ZnS, considerando o crescimento de uma segunda camada com espessura de aproximadamente 2,5nm, nomeada de Au@ZnS-CMC 2L. A figura 5.93, apresenta as medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC 1L e (c) Au@ZnS-CMC 2L. Como pode ser observado, o crescimento de uma camada de material semiconductor com as características do ZnS provoca o deslocamento batocrômico do pico de LSPR das AuNPs@CMC de 520nm para 526nm. Esse pico de absorção foi afetado pelo crescimento de uma segunda camada de ZnS (Au@ZnS-CMC 2L), com um deslocamento batocrômico do pico de LSPR de 526nm para 531nm, como destacado na figura 5.94.

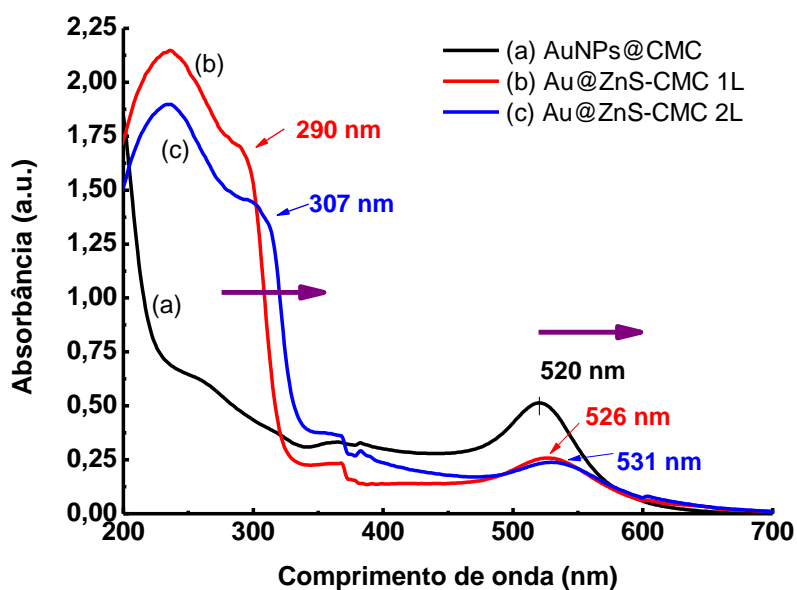


Figura 5.93 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC 1L e (c) Au@ZnS-CMC 2L.



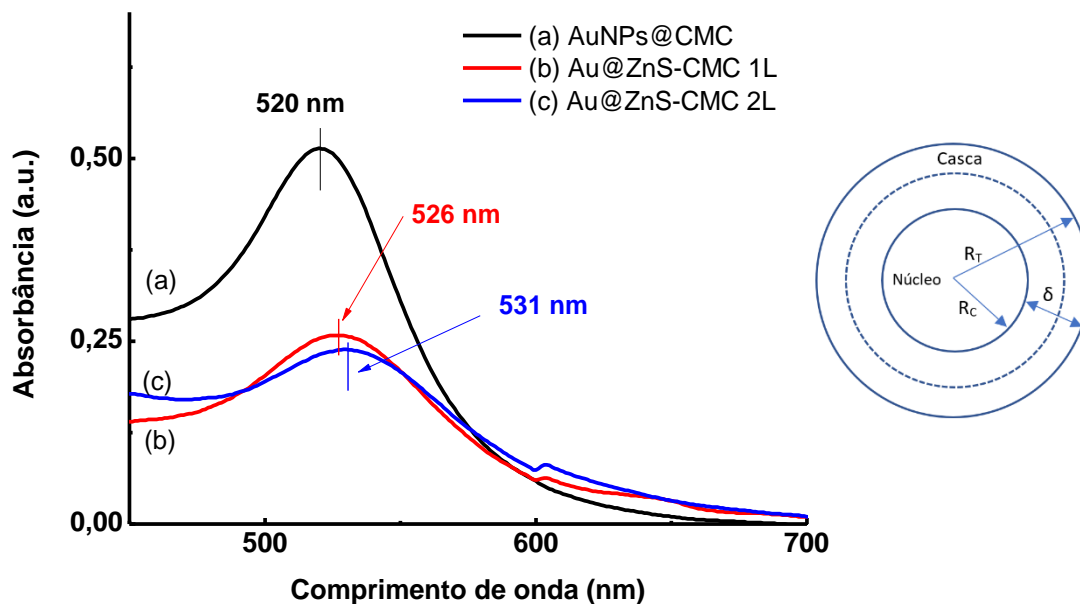


Figura 5.94 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC 1L e (c) Au@ZnS-CMC 2L na faixa entre 450 e 900 nm.

A influência do material semiconductor é observada na alteração do comprimento de onda da ressonância de LSPR do núcleo, que é dependente da espessura do material formador da casca, sendo que o crescimento de uma segunda camada de ZnS provocou o deslocamento batocrômico do pico de plasmon das Au@ZnS-CMC de 526 nm para 531 nm. Ainda é observado nesta região espectral que a intensidade de absorvância do pico devido a LSPR sofreu uma redução nas amostras de Au@ZnS-CMC devido ao fenômeno de “plasmon damping”. Esses efeitos são esperados pela teoria simplificada na equação 5.22 que relaciona o LSPR com a espessura da camada semicondutora na superfície de AuNPs.

A região compreendida entre 190 e 450 nm, destacada na figura 5.95, é dominada principalmente por efeitos de transições excitônicas no material semiconductor e, por fenômenos de absorção óptica pelo núcleo metálico na região do ultravioleta. Nos espectros de nanoheterojunções Au@ZnS-CMC 1L e Au@ZnS-CMC 2L, foi observada uma banda em torno de 300 nm correspondente a transição excitônica do ZnS@CMC, sendo 290 nm para a amostra com uma camada de ZnS e 307 nm para a amostra com duas camadas de ZnS. Essa variação está relacionada ao aumento da espessura de ZnS

( $\delta$ ), com a conseqüente redução do efeito do confinamento quântico, provocando a diminuição da energia associando ao éxciton na casca ( $E_g$ ) ( $4,27 \text{ eV} \rightarrow 4,03 \text{ eV}$ ), como apresentado no modelo apresentado na figura 5.96. Esse resultado demonstrar os complexos efeitos do confinamento quântico, tanto dos elétrons no núcleo metálico, como no material semiconductor.

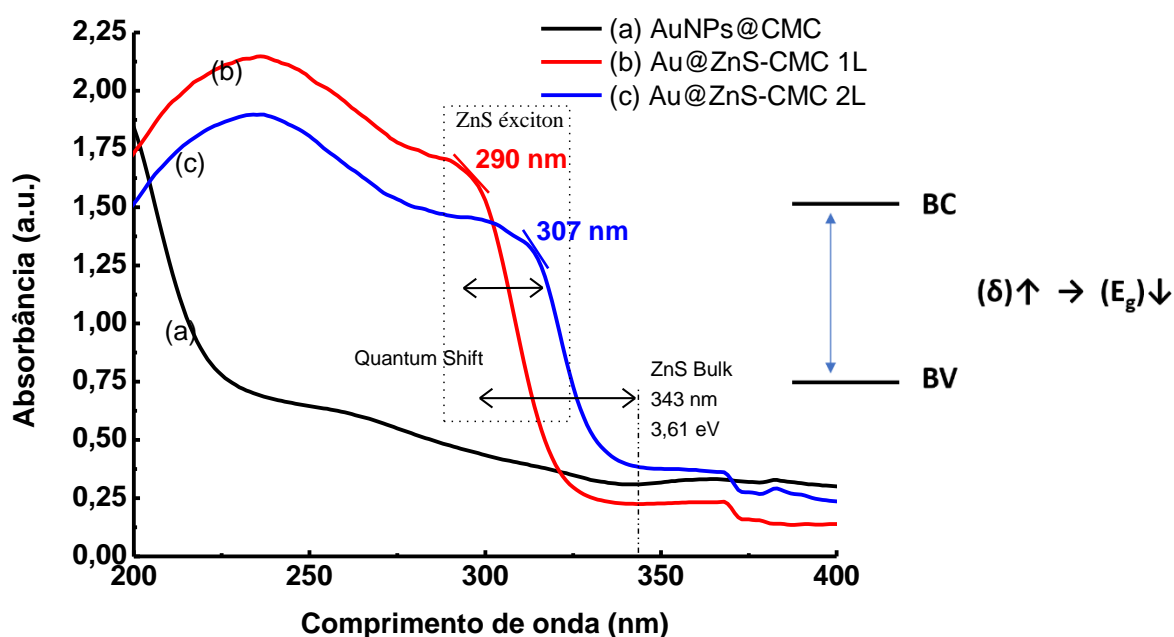


Figura 5.95 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC 1L e (c) Au@ZnS-CMC 2L na faixa entre 200 e 400 nm.

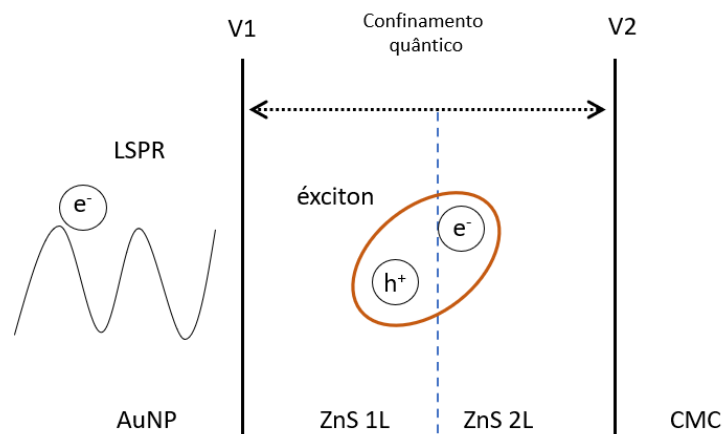


Figura 5.96 – Modelo de confinamento quântico na espessura da casca de ZnS.

### 5.5.9 Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica foram realizadas imagens de MET, apresentadas na figura 5.97. Como pode ser observado pelas imagens, houve um crescimento de uma segunda camada de ZnS@CMC sobre a camada já existente na nanoestrutura de Au@ZnS-CMC. Como resultado do complexo mecanismo de nucleação e crescimento, mediado pela CMC na superfície da casca de ZnS, a segunda camada apresentou uma heterogeneidade. Atribuímos essa característica morfológica a conformação assumida pela CMC na superfície da camada de ZnS previamente crescida.

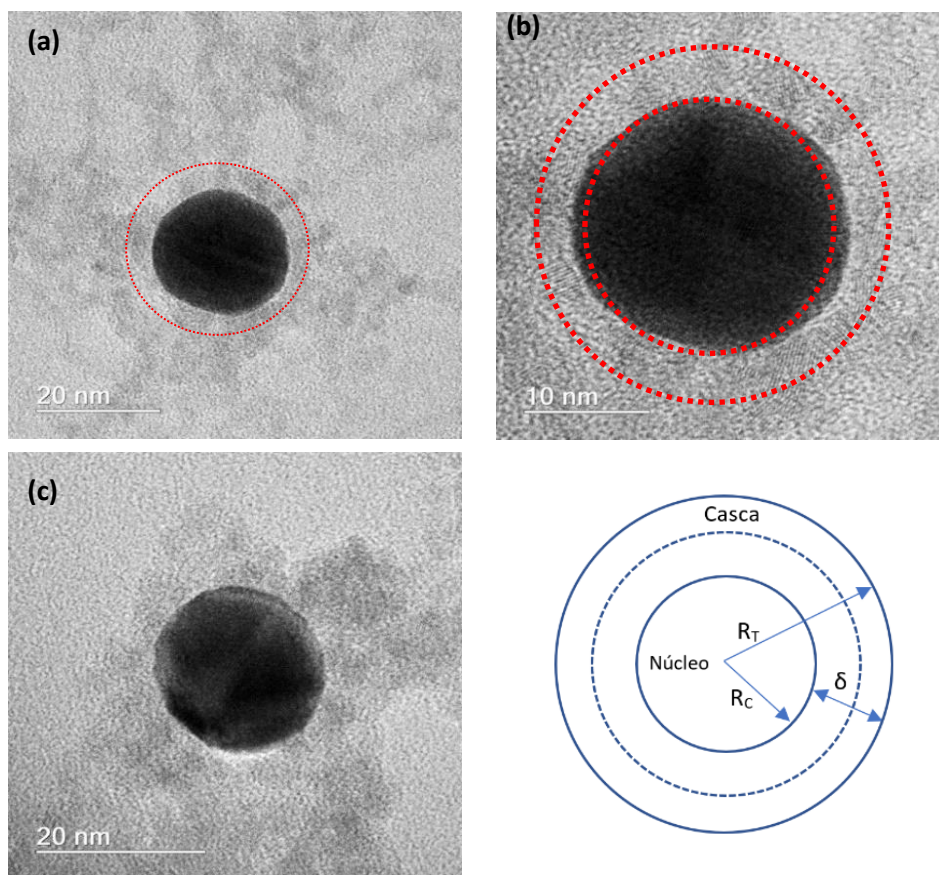


Figura 5.97 - Imagens da Au@ZnS-CMC com o crescimento de uma segunda camada de ZnS.

## 5.6 Nanoheterojunção Au@ZnS-CMC dopada com In<sup>3+</sup>.

Com o objetivo de demonstrar a possibilidade de modificação estrutural e nas características da nanoheterojunção, nesta parte do trabalho foi realizada a modificação da estrutura da casca semicondutora de ZnS com a incorporação de íons In<sup>3+</sup> (Au@Zn(In)S-CMC). Íons trivalentes, que seguindo o modelo de nucleação e crescimento mediado por CMC, podem provocar alterações nas propriedades ópticas do sistema Au@ZnS-CMC. Sulfeto de índio tem band gap de 2,2 eV no “bulk” (242-244). Assim, a modificação da estrutura do ZnS, com band gap de 3,61 eV no “bulk” e ~4 para nanocristais, pela adição de íons In<sup>3+</sup>, pode deslocar o band gap da casca para regiões de baixa energia do espectro, tornando possível a modulação das propriedades ópticas com a variação da razão ( $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ ) (242-244).

Na síntese de Au@Zn(In)S-CMC, os íons Zn<sup>2+</sup> e In<sup>3+</sup>, interagem por interação colombiana com os carboxilatos (COO<sup>-</sup>) presentes nas cadeias poliméricas da CMC, formando os complexos COO<sup>-</sup>/Zn<sup>2+</sup> e COO<sup>-</sup>/In<sup>3+</sup>, com elevada capacidade de formação de quelatos. Em seguida, íons S<sup>2-</sup>, resultantes da dissociação do sulfeto de sódio, reagem com os complexos na superfície das AuNPs@CMC, possibilitando a formação de núcleos e posterior crescimento de Zn(In)S@CMC através da mediação das cadeias poliméricas da CMC, como ilustrado na Fig. 5.98. Esse mecanismo de nucleação e crescimento, tem a tendência de apresentar significativa quantidade de defeitos, principalmente, lacunas e átomos intersticiais, devido a introdução de íons trivalentes (In<sup>3+</sup>) na estrutura do ZnS tridimensional da casca, como ilustrado na Fig. 5.98. Outros tipos de defeitos são ainda ampliados, tais como: defeitos unidimensionais, como, discordâncias; defeitos associados as interfaces entre regiões com diferentes estruturas cristalinas ou diferentes orientações cristalográficas; defeitos tridimensionais, associados ao crescimento de nanocristais em várias direções em torno das AuNPs@CMC e, ainda, a deformação mecânica promovendo a formação de imperfeições.

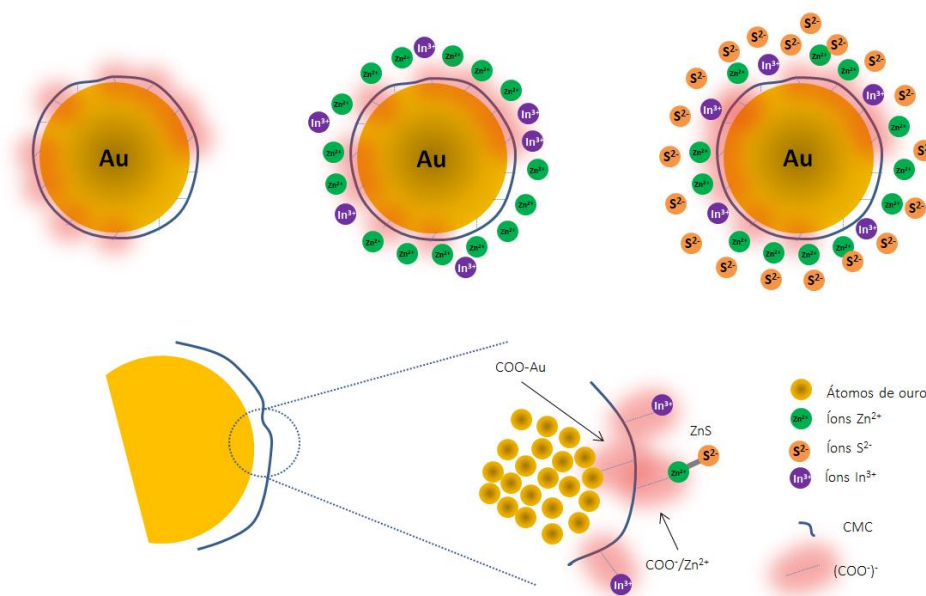


Figura 5.98 - Ilustração do processo de crescimento de casca na superfície de AuNPs@CMC, formando uma nanoheterojunção núcleo-casca dopada com índio Au@ZnS:In-CMC.

### 5.6.1 Síntese e caracterização de Zn(In)S@CMC

Foi realizada a síntese de ZnS@CMC com modificação da estrutura pela adição de íons  $\text{In}^{3+}$ , (Zn(In)S@CMC). Na figura 5.99 são apresentados os resultados de ZP e DLS para Zn(In)S@CMC (Zn:In 1:0,3). Os resultados demonstram significativa influência na carga superficial e no  $H_D$  dos nanomateriais testados devido a interação dos íons trivalentes ( $\text{In}^{3+}$ ) com os carboxilatos da CMC. No sistema Zn(In)S@CMC foi claramente observado a alteração significativa no  $H_D$ . Esse resultado é associado aos complexos  $\text{COO}^-/\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{COO}^-/\text{In}^{3+}$ . A maior interação entre os íons trivalentes ( $\text{In}^{3+}$ ) com os carboxilatos da CMC, modifica a conformação do polímero, com diminuição da repulsão entre as cadeias poliméricas e com conseqüente redução do  $H_D$  ( $\sim 35 \pm 3 \text{ nm} \rightarrow \sim 8 \pm 1 \text{ nm}$ ). Em relação a carga, foi observado uma redução de  $\sim -21 \pm 1 \text{ mV}$  para  $-18 \pm 2 \text{ mV}$ , devido a maior consumo de cargas negativas nas cadeias poliméricas na formação dos complexos  $\text{COO}^-/\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{COO}^-/\text{In}^{3+}$ .

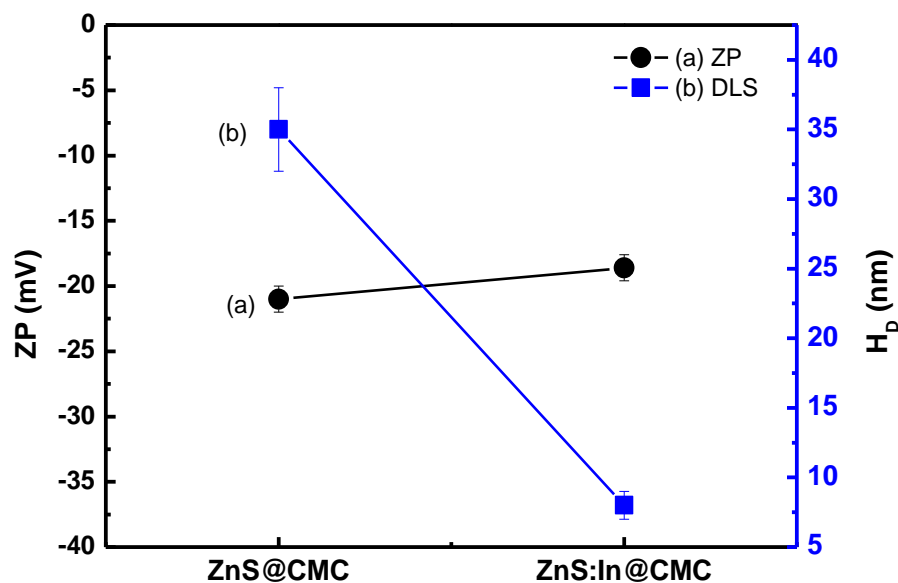


Figura 5.99 - Valores medidos de ZP e DLS nas amostras de ZnS@CMC e Zn(In)S@CMC. (Zn:In 1:0,3). DLS ( $n \geq 5$ ) e ZP ( $n \geq 15$ ).

### 5.6.2 Caracterização Espectroscópica

Para a caracterização óptica foi empregada à técnica de espectroscopia UV-Vis. Essa avaliação foi realizada pela banda de absorção associada à recombinação excitônica do semicondutor. Nas figuras 5.100 e 5.101 são mostrados os resultados de espectroscopia UV-Vis para síntese de ZnS@CMC comparada com Zn(In)S@CMC e os Tauc, respetivamente. A concentração de [Zn] e [S] foi mantida igual em todas as amostras [ $Zn^{2+} = 0,5mM$  e  $S^{2-} = 0,5mM$ ]. Como explorado no capítulo 5.4, nanocristais de ZnS@CMC tem band gap em torno de 3,61eV para o “bulk” e em torno de 4eV para nanocristais, assim é esperado absorção de energia pelo ZnS@CMC apenas na região do ultravioleta, em torno de 300nm. Por outro lado, a incorporação de  $In^{3+}$  tende a deslocar a absorção óptica para regiões de baixa energia, consequentemente maior comprimento de onda, devido ao menor band gap do sulfeto de índio (~2,2 eV). Na região espectral compreendida entre 190 e 450nm, foi observada uma banda em torno de 290nm correspondente a transição excitônica do ZnS@CMC e um significativo deslocamento desta banda nas amostras com  $In^{3+}$  na estrutura, como comprovado pelos deslocamentos na energia de band gap determinadas pelo plot Tauc na Fig. 5.101 (A) (3,9 eV  $\rightarrow$  3,3 eV). Este resultado é relacionado à presença de  $In^{3+}$  na estrutura do ZnS,

que provoca uma absorção excitônica em valores mais baixos de energia, devido a redução do band gap do material, mesmo para a menor dopagem ( $\text{Zn}:\text{In} = 1:0,1 - 10\%$ ). Como pode ser observado, a síntese com o elemento  $\text{In}^{3+}$  na estrutura do ZnS provocou a diminuição do band gap da casca, seguindo a variação de  $\text{Zn}^{2+}/\text{In}^{3+}$  Fig. 5.101 (B) de uma menor dopagem (10%), até a incorporação de maiores quantidade de  $\text{In}^{3+}$  (~70%).

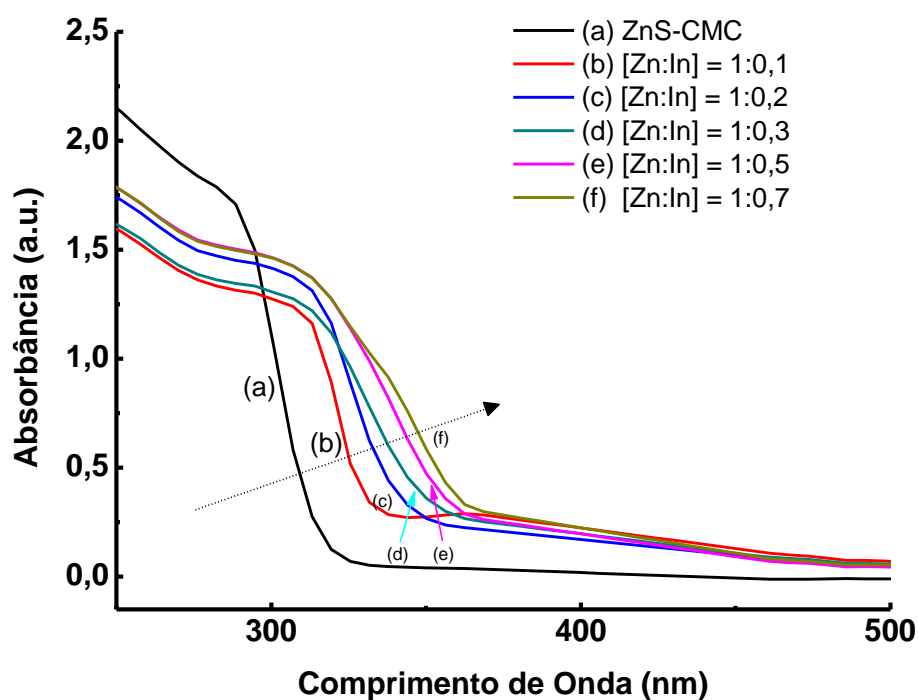


Figura 5.100 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) ZnS-CMC e (b-f) Zn(In)S@CMC em diferentes concentrações do precursor de índio ( $[\text{Zn}^{2+}]/[\text{In}^{3+}]$ ). A concentração de ZnS foi mantida igual em todas as amostras  $[\text{Zn}^{2+}] = 0,5\text{mM}$  e  $\text{S}^{2-} = 0,5\text{mM}$ ; ( $[\text{Zn}^{2+}]/[\text{In}^{3+}]$ ), (b) 1:0,1, (c) 1:0,2, (d) 1:0,3, (e) 1:0,5 e (f) 1:0,7.



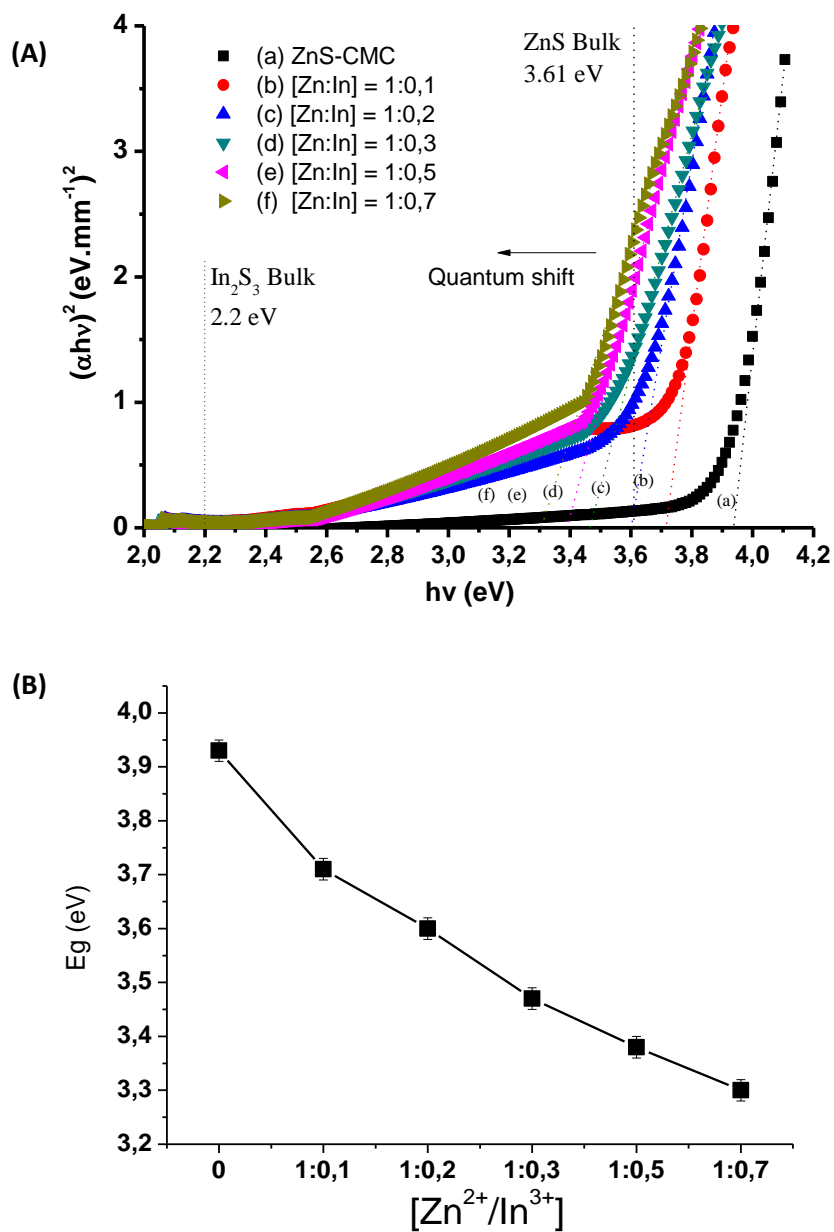


Figura 5.101 – (A) Tauc para amostras de (a) ZnS-CMC e (b-f) Zn(In)S@CMC em diferentes concentrações do precursor de índio ( $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ ). A concentração de ZnS foi mantida igual em todas as amostras  $[Zn^{2+} = 0,5mM$  e  $S^{2-} = 0,5 mM]$ ; (B) variação do band gap em função da razão ( $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ ).

Na nanoestrutura Zn(In)S@CMC, a presença de defeitos pela ação dos íons de índio na rede atua formando novos tipos de transições possíveis, como pode ser visualizado nos espectros de absorbância pela presença de bandas em torno de 344nm. Nesta condição, transições não-radiativas para estados de defeitos na estrutura (vacâncias de enxofre ( $V_S$ ) e metal ( $V_{Zn}$ ), e átomos intersticiais,  $I_S$  e  $I_{Zn}$ ) e posterior recombinação radiativa em energias mais baixas do que a emissão excitônica são possíveis. Medidas de fotoluminescência mostradas na figura 5.102, para, (a) ZnS@CM e (b) Zn(In)S@CMC, demonstram o “quenching” na emissão. Esse efeito tem sido recentemente publicado por Gaspera *et al* <sup>(245)</sup>, sendo atribuído a diminuição dos defeitos superficiais e a adição de múltiplos níveis de energia dentro do gap do ZnS, resultando em emissão de fótons com baixa energia (infravermelho), além da criação de caminhos para decaimento não-radiativo, principalmente associados a fônons, efeito já relatados para outros tipos de semicondutores <sup>(245-248)</sup>.

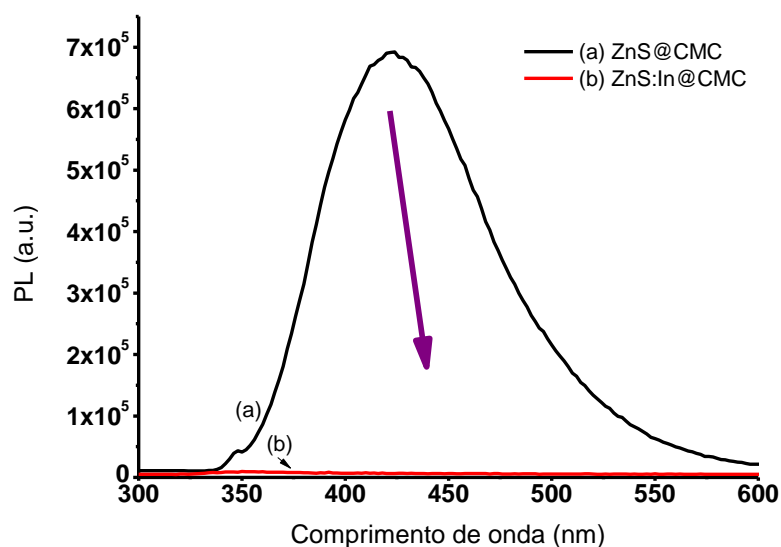


Figura 5.102 - Medidas de PL de amostras de (a) ZnS@CMC e (b) ZnS:In@CMC.

### 5.6.3 Análise morfológica de Zn(In)S@CMC

Características morfológicas, tamanhos e composição elementar das amostras de Zn(In)S@CMC foram caracterizadas por MET, juntamente com a análise EDS. As imagens de MET e espectro EDS são mostrados em Fig. 5.103(A) para amostras sintetizada com estequiometria (Zn:In 1:0,3). Como uma tendência geral, observou-se nanopartículas razoavelmente bem dispersas e uniformes para todas as amostras. O Zn(In)S@CMC apresentou preponderantemente um plano com espaçamento interplanar de  $3,2\text{\AA}$  (0,32 nm) que associamos ao plano (111) do ZnS, destacando nas imagens de MET possíveis defeitos na estrutura associados a presença de índio. O diâmetro médio medido foi de  $(4,5\pm 0,5)\text{nm}$ . A figura 5.103(B) apresenta o resultado de EDS de Zn(In)S. Pelo espectro medido são observados os picos referentes ao outro nas energias de ZnK $\alpha$  – 8,6KeV, ZnK $\beta$  – 9,5 KeV, SK $\alpha$  – 2,3KeV, InLa – 3,2KeV e InLb- 3,5KeV, que estão de acordo com os valores já publicados na literatura, conformando a composição química dos nanocristais sintetizados.

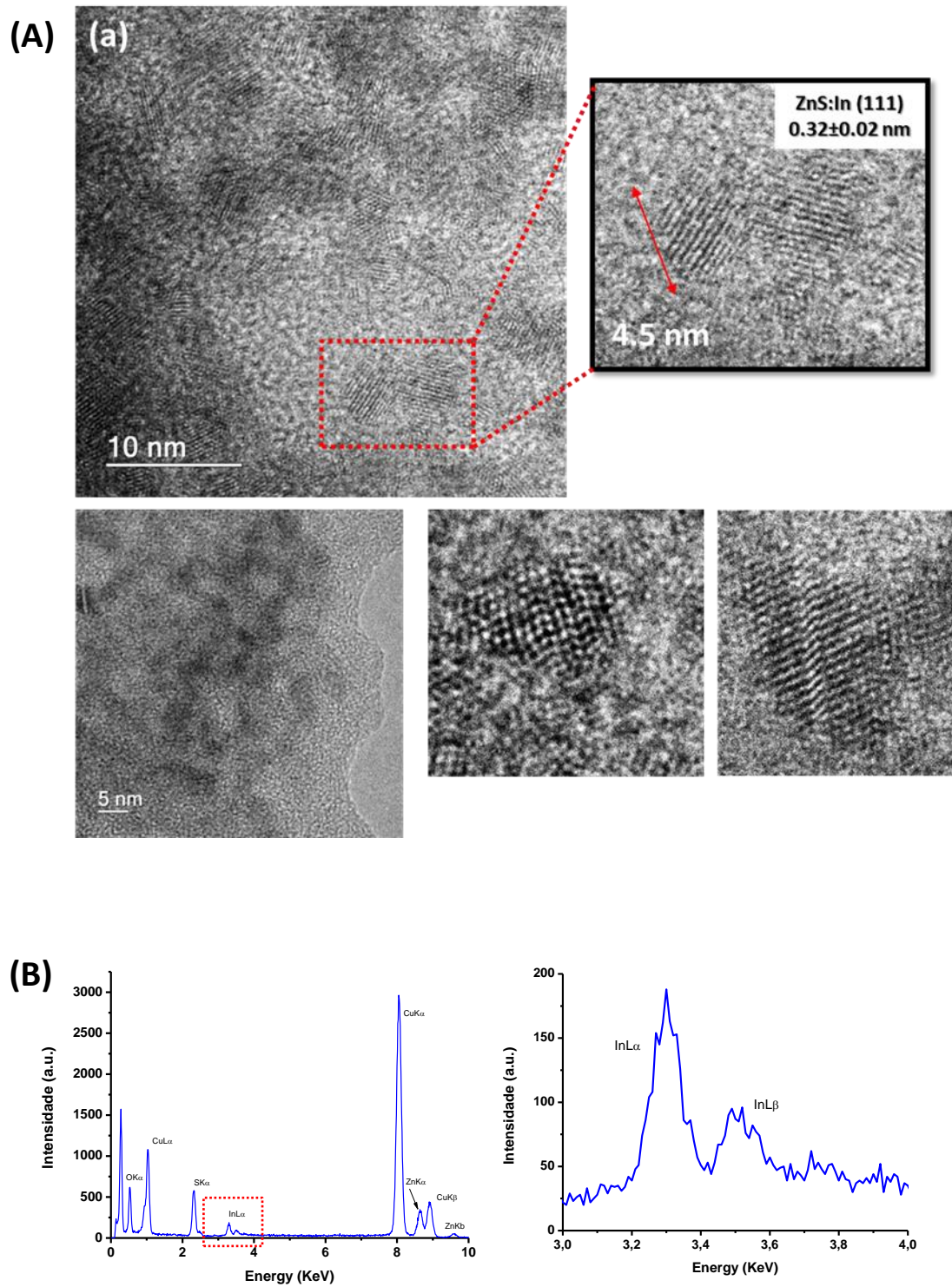


Figura 5.103 – (A) (a) Imagens de MET para Zn(In)S@CMC e (B) Espectro de EDS para Zn(In)S@CMC. (Zn:In 1:0,3)

#### 5.6.4 Síntese e caracterização de Au@Zn(In)S-CMC

Foi realizada a síntese de Au@ZnS-CMC com modificação da estrutura da casca pela adição de íons  $\text{In}^{3+}$  (Au@Zn(In)S-CMC). Na figura 5.104 são apresentados os resultados ZP e DLS. No sistema Au@Zn(In)S-CMC foi claramente observado a alteração na carga superficial devido a interação dos íons trivalentes ( $\text{In}^{3+}$ ) com os carboxilatos da CMC. Esse resultado é associado aos complexos  $\text{COO}^-/\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{COO}^-/\text{In}^{3+}$ . A maior interação entre os íons trivalentes ( $\text{In}^{3+}$ ) com os carboxilatos da CMC, com redução de  $\sim -45 \pm 2$  mV para  $-41 \pm 3$  mV, devido a maior consumo de cargas negativas nas cadeias poliméricas  $\text{COO}^-/\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{COO}^-/\text{In}^{3+}$ . A maior interação entre os íons trivalentes ( $\text{In}^{3+}$ ) com os carboxilatos da CMC modifica a conformação do polímero, com diminuição da repulsão entre as cadeias poliméricas, resultando em significativa redução do  $H_D$  ( $\sim 75 \pm 5$  nm  $\rightarrow$   $\sim 40 \pm 4$  nm).

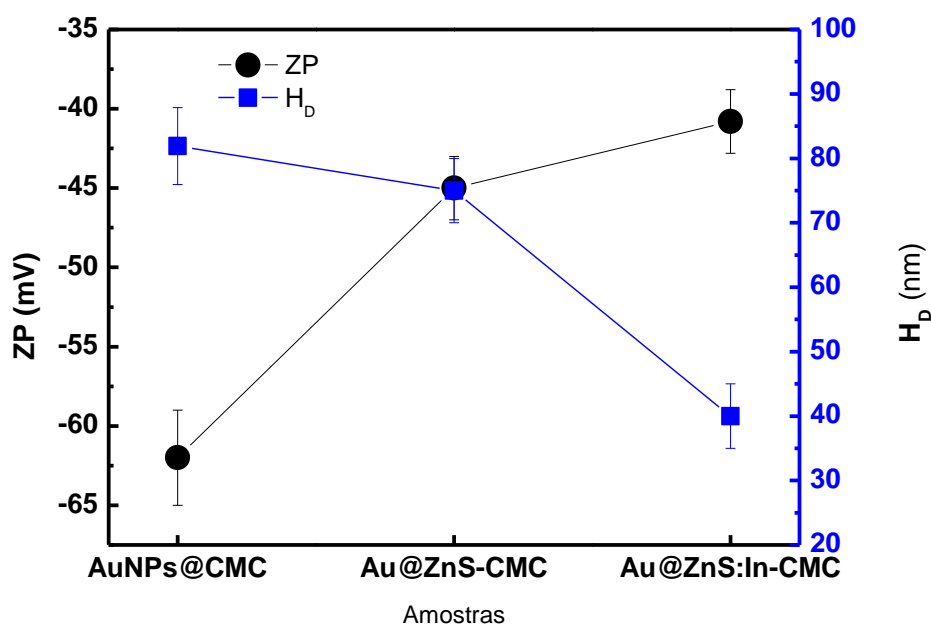


Figura 5.104 - Valores medidos de ZP e DLS com e sem a dopagem com In para amostras de Au@ZnS-CMC. (Zn:In 1:0,3). ( $n \geq 5$ ) e ZP ( $n \geq 15$ ).

A figura 5.105 apresenta os resultados de medidas de espectroscopia UV-Vis para amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC e (c-e) Au@Zn(In)S-CMC em função da razão  $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ . A concentração de AuNPs@CMC foi igual em todas as amostras, o mesmo valendo para concentração de ZnS [ $Zn^{2+} = 0,5mM$  e  $S^{2-} = 0,5mM$ ]; a razão  $Zn^{2+}/In^{3+}$  foi de (c) 1:0,1, (d) 1:0,3 e (e) 1:0,7. Como pode ser observado, o deslocamento batocrômico da banda de absorção excitônica é dependente do teor de índio utilizada durante a nucleação e crescimento da casca de ZnS-CMC. O mesmo efeito foi observado na síntese de ZnS:In@CMC, como mostrado na figura 5.100. Atribuimos esse resultado a mudança na estrutura de bandas do ZnS, que é proporcional a quantidade de  $In^{3+}$  inserido na estrutura cristalina do material.

A modificação da estrutura da casca de ZnS pela incorporação de íons  $In^{3+}$ , resultou em um deslocamento batocrômico do espectro de absorbância, devido a alteração da estrutura da rede cristalina do semiconductor, além de ampliar o efeito de “plasmon damping” sob o LSPR. No sistema Au@Zn(In)S-CMC, a probabilidade de defeitos na estrutura é significativamente maior do que em nanocristais de ZnS@CMC, devido a presença de íons de valência três ( $In^{3+}$ ), formando defeitos na estrutura e, ainda ao mecanismo de nucleação e crescimento mediado pela CMC, que atua formando uma estrutura tridimensional que acompanha a curvatura das faces cristalinas do ouro.

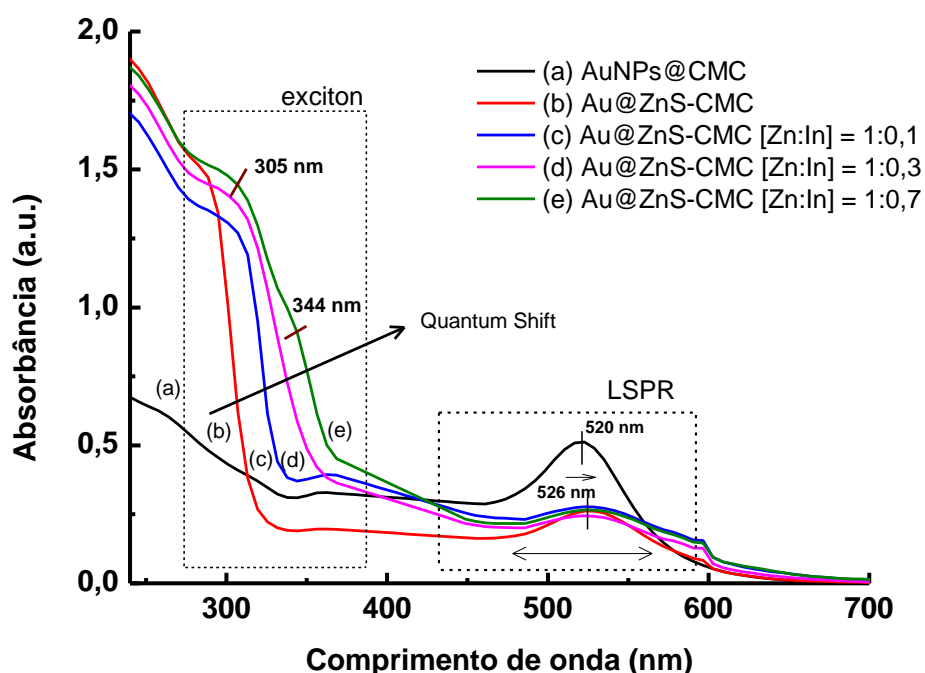


Figura 5.105 – Espectros UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC e (c-e) Au@Zn(In)S-CMC em função da razão  $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$  (c) 1:0,1, (d) 1:0,3 e (e) 1:0,7.

Na nanoestrutura Au@Zn(In)S-CMC, a presença de defeitos na rede atua formando novos tipos de transições possíveis, como pode ser visualizado nos espectros de absorvância, pela presença de bandas em torno de 344nm e pelo “onset” começando em torno de 450nm. Além disto, a probabilidade de presença de defeitos é significativamente maior devido ao mecanismo de nucleação e crescimento na superfície curva das AuNPs@CMC. Nesta condição, transições não-radiativas para estados de defeitos na estrutura (vacâncias de enxofre ( $V_S$ ) e metal ( $V_{Zn}$ ), e átomos intersticiais,  $I_S$  e  $I_{Zn}$ ) e posterior recombinação radiativa em energias mais baixas do que a emissão excitônica são possíveis.

Não entanto, medidas de fotoluminescência mostradas na figura 5.106, para, (a) ZnS@CMC, (b) Zn(In)S@CMC e (c) Au@Zn(In)S-CMC, demonstram “quenching” na emissão. Esse efeito tem sido recentemente publicado por Gaspera *et al* <sup>(245)</sup>, sendo atribuído a diminuição dos defeitos superficiais e a adição de múltiplos níveis de energia dentro do gap do ZnS, resultando em emissão de fótons com baixa energia (infravermelho), além da criação de caminhos para decaimento não-radiativo,

principalmente associados a fônons, efeito já relatados para outros tipos de semicondutores <sup>(246-248)</sup>. Atribuímos esse efeito de “quenching” observado na emissão para nanoheterojunções Au@Zn(In)S-CMC, levando em consideração a complexa estrutura de rede deste nanomaterial, devido ao intrincado mecanismo de nucleação e crescimento.

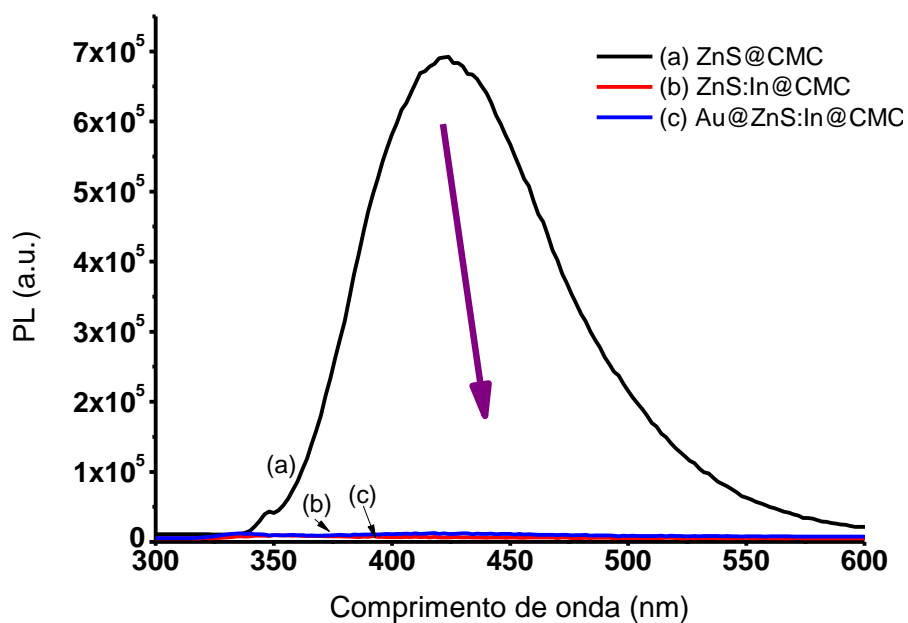


Figura 5.106 - Medidas de PL de amostras de (a) ZnS@CMC, (b) ZnS:In@CMC e ZnS@CMC e (c) Au@ZnS-CMC. (Zn:In 1:0,3)



### 5.6.5 Análise morfológica de Au@Zn(In)S-CMC

Características morfológicas, tamanhos e composição elementar do Au@Zn(In)S-CMC foram caracterizadas por MET, juntamente com a análise EDS. As imagens de MET e espectro EDS são mostrados em Fig. 5.107. Como uma tendência geral, observou-se nanopartículas razoavelmente bem dispersas e uniformes com forma predominante esférica para todas as amostras e com casca semicondutora recobrando as AuNPs. As nanopartículas de Au@Zn(In)S-CMC apresentam preponderantemente um plano com espaçamento interplanar de  $3,2\text{\AA}$  (0,32 nm) que associamos ao plano (111) do ZnS, e espessura de casca de  $(2,7 \pm 0,5)\text{nm}$ . Na figura 5.107(B) é ainda apresentado o resultado de EDS. Pelo espectro são observados os picos referentes as energias de  $\text{AuM}\alpha - 2,1\text{ KeV}$ ,  $\text{AuM}\beta - 2,2\text{KeV}$ ,  $\text{AuL}\alpha - 9,7\text{ KeV}$  e  $\text{AuL}\beta - 11,4\text{KeV}$ ,  $\text{ZnK}\alpha - 8,6\text{KeV}$ ,  $\text{ZnK}\beta - 9,5\text{ KeV}$ ,  $\text{SK}\alpha - 2,3\text{KeV}$ ,  $\text{InL}\alpha - 3,2\text{KeV}$  e  $\text{InL}\beta - 3,5\text{KeV}$ , confirmando a composição química dos nanocristais sintetizados.

Para caracterização química foi ainda utilizada a técnica de EELS para análise de distribuição elementar nas amostras de Au@Zn(In)S-CMC, cujos resultados são mostrados na figura 5.108. Nesta figura são apresentados em (a) e (b) uma imagem MET e MET no modo varredura das nanoestruturas núcleo-casca, respectivamente. Em (c) uma imagem combinada da distribuição de ouro e zinco, em (d) a distribuição de ouro pela medida da borda  $\text{O}_{2,3}$  em 54eV, em (e) uma imagem de distribuição de zinco pela medida da borda  $\text{M}_{2,3}$  em 87eV, e em (f) uma imagem de distribuição de índio pela medida da borda  $\text{M}_{4,5}$  443 eV.

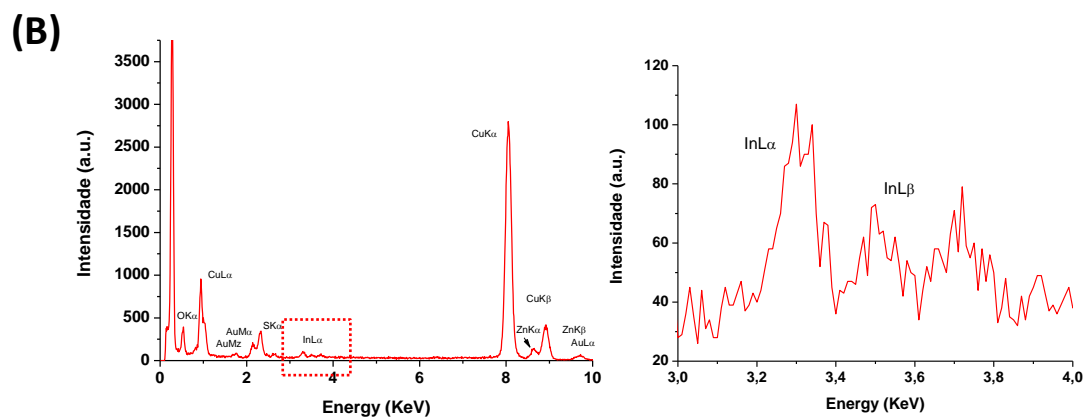
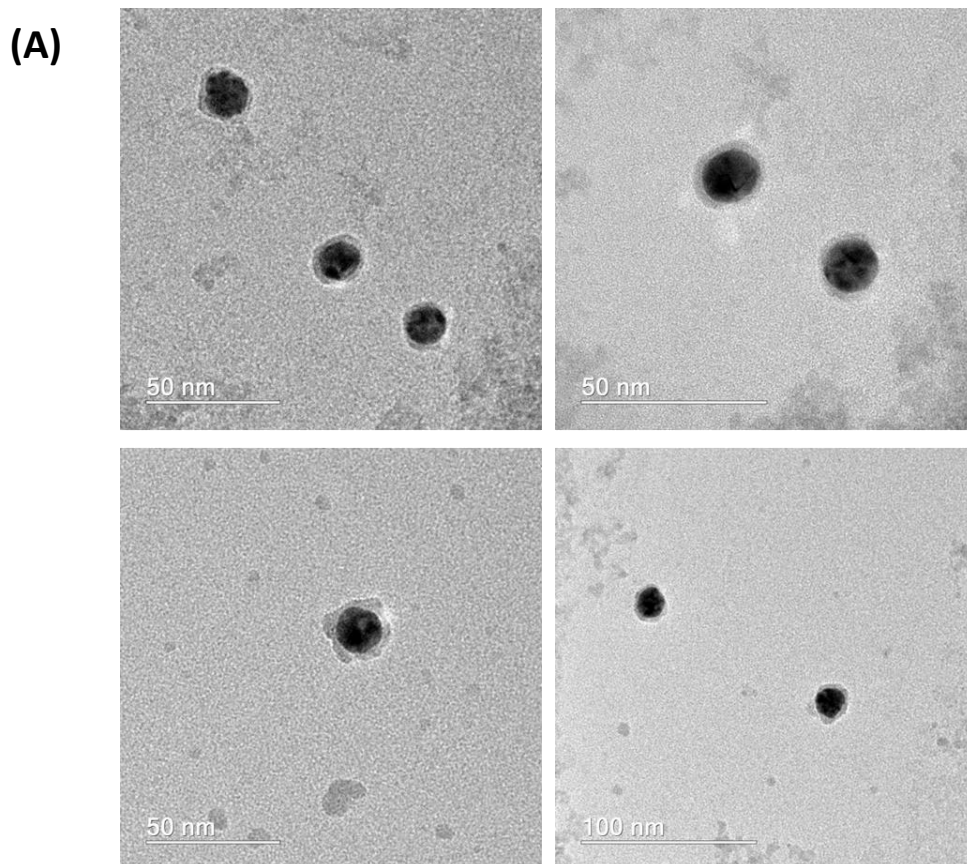


Figura 5.107 – (A) Imagens de MET para Au@ZnS:In e (B) Espectro de EDS para Au@ZnS:In. (Zn:In 1:0,3)

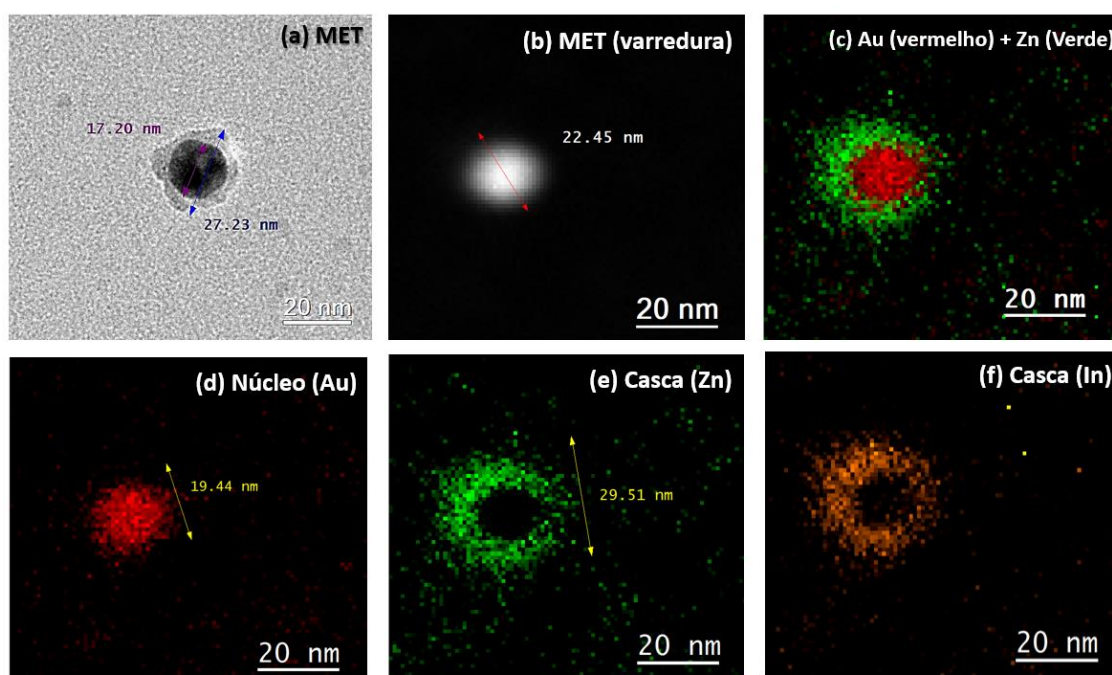


Figura 5.108 - Imagem MET (a) e MET no modo varredura (b) de Au@Zn(In)S-CMC. (c) Mapa de distribuição de Au e Zn, (d) mapa de distribuição de Au, (e) mapa de distribuição de Zn, (d) mapa de distribuição de In. (Zn:In 1:0,3).

O conjunto dos resultados obtidos para os sistemas Zn(In)S@CMC e Au@Zn(In)S-CMC, demonstram a efetiva modificação da casca de ZnS, conforme os resultados de caracterização morfológica e química. Por outro lado, a caracterização óptica, demonstrou a efetiva variação do band gap em função da razão  $[Zn^{2+}]/[In^{3+}]$ . Esse importante resultado, abre possibilidades de modulação das propriedades das nanoheterojunções Au@ZnS, através de parâmetros de síntese, com implicações em futuras aplicações. A inclusão de íons trivalentes ( $In^{3+}$ ) na estrutura cristalina da casca resultou na supressão da emissão de luz “quenching”, devido a complexa estrutura de defeitos, demonstrando que o mecanismo de nucleação e crescimento tem implicações nas características físico-químicas dos nanomateriais estudados.

## 5.7 Conclusões

Pelo conjunto dos resultados obtidos, foram obtidas dispersões coloidais de AuNPs@CMC cristalinas, com diâmetro em torno de 20 nm, estáveis e com características físico-químicas, coloidais e ópticas, dependentes do pH e do GS, associado ao efeito da protonação dos carboxilatos ( $\text{COO}^-/\text{COOH}$ ) nas cadeias poliméricas da CMC no mecanismo de nucleação e crescimento coloidal. AuNPs@CMC sintetizadas com CMC-77 apresentam distribuição homogênea de diâmetros e, maior velocidade de reação para pH alcalino. A síntese com cadeias poliméricas modificadas com o aminoácido arginina, resultou em nanopartículas cristalinas de diâmetro 12 nm, demonstrando o efeito da cadeia polimérica na nucleação e crescimento de AuNPs@CMC e da flexibilidade dos coloides desenvolvidos para modificações na química de reação e, sua influência nas características dos sistemas sintetizados. AuNPs@CMC nanoconjugados com a glicoproteína gp41 e AuNPs@CMC com arginina conjugados com anticorpos anti-HIV1, foram aplicados como biossensor para detecção de HIV com sensibilidade de pM, através de espalhamento de luz em dispersão coloidal, através de um inovador método de detecção referido como de LIA (Laser immunoassay). A síntese de QDs de ZnS apresentou nanocristais com diâmetro em torno de 3 nm e, características dependentes das condições de síntese, com significativa emissão de luz ( $\sim 430$  nm) e QY de 0.3 %, sendo aplicados para bioimagem de células cancerígenas de glioma. As condições químicas da cadeia polimérica ( $\text{RCOO}^- \rightarrow \text{COOH}$ ), juntamente com a estequiometria de reação (Zn:S), apresentou efeito fundamental na nucleação e crescimento dos nanocristais, influenciando nas propriedades ópticas. A casca de ZnS nanocristalina com espessura de 2,5 nm, garantiu o confinamento quântico na nanoheterojunção, resultando em emissão de luz ( $\sim 430$  nm), com o acoplamento plasmon/éxciton e mecanismos de transferência de carga/energia na interface influenciando as ressonâncias de LSPR e a emissão fotoluminescente. A inclusão de íons trivalentes ( $\text{In}^{3+}$ ) na estrutura cristalina da casca resultou em ajuste do band gap e na supressão da emissão de luz (*quenching*) devido a complexa estrutura de defeitos.

## Capítulo 6. Contribuições para a literatura

### 6.1. Artigos publicados em periódicos

**Caires, A.J.**; Mansur, H.S.; Mansur, A.A.P.; Carvalho, S.M.; Lobato, Z.I.P.; dos Reis, J.K.P. Gold Nanoparticle-Carboxymethyl Cellulose Nanocolloids for Detection of Human immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) using Laser Light Scattering Immunoassay. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 177, p. 377-388, 2019.

**Caires, A.J.**; Mansur, A.A.P.; Carvalho, S.M.; Isadora C. Carvalho, Mansur, H.S.; Green Synthesis of ZnS Quantum Dot/Biopolymer Photoluminescent Nanoprobes for Bioimaging Brain Cancer Cells. *Materials Chemistry and Physics*, v. 244, p. 122716, 2020.

### 6.2 Artigos publicados em colaboração

Mansur, H. S. ; Mansur, A. A.; **Caires, A.J.**; Mansur, R. L.; Oliveira, L. C. Composition-Tunable Optical Properties of  $Zn_x Cd_{(1-x)}S$  Quantum Dot-Carboxymethylcellulose Conjugates: Towards One-Pot Green Synthesis of Multifunctional Nanoplatforms for Biomedical and Environmental Applications. *Nanoscale Research Letters* (print), v. 12, p. 443, 2017.

Capanema, N. S. V.; Mansur, A.A.P.; Mansur, H. S.; **Caires, A.J.**; Carvalho, S. M.; Chagas, P.; Oliveira, L. C. Eco-friendly and Biocompatible Crosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels as Adsorbents for the Removal of Organic Dye Pollutants for Environmental Applications. *Environmental Technology*, v. 18, p. 1-42, 2017.

Capanema, N. S. V.; Mansur, A. A.; Mansur, H. S.; **Caires, A.J.**; Carvalho, S. M.; Oliveira, L. C. Superabsorbent Crosslinked Carboxymethyl Cellulose-PEG Hydrogels for Potential Wound Dressing Applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 101, p. 1-10, 2017.

Mansur, A. A. P.; Mansur, H. S.; Carvalho, S. M.; **Caires, A.J**; One-Pot Aqueous Synthesis of Fluorescent Ag-In-Zn-S Quantum Dot/Polymer Bioconjugates for Multiplex Optical Bioimaging of Glioblastoma Cells. *Contrast Media & Molecular Imaging*, v. 2017, p. 1-15, 2017.

Leonel, A. G.; Mansur, H. S.; Mansur, A. A. P.; **Caires, A.J**; Carvalho, S. M.; Outon, L. E. F.; Ardisson, J. D.; Krambrock, K. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles/carboxymethyl cellulose core-shell nanohybrids for killing cancer cells in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 1, p. 1, 2019.

Mansur, A.A.P.; **Caires, A.J**; Carvalho, S.M.; Capanema, S.V.; Isadora C. Carvalho; Mansur, H.S. Dual-functional supramolecular nanohybrids of quantum dot/biopolymer/chemotherapeutic drug for bioimaging and killing brain cancer cells in vitro. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 184, p. 110507, 2019.

Sousa, F. L. N.; Freitas, D. V.; Roberio, R.; Silva, S. E; **Caires, A.J**; Mansur, H. S.; Azevedo, W. M.; Navarro, M. Tunable emission of AgIn<sub>5</sub>S<sub>8</sub> and ZnAgIn<sub>5</sub>S<sub>8</sub> nanocrystals: electrosynthesis, characterization and optical application. *Materials Today Chemistry*, v. 16C, p. 100238, 2020.

Sousa, Felipe; Souza, Brenand; **Caires, A.J**; Azevedo, W. M.; Mansur, H.S.; Freitas, D. V.; Navarro, M. Aqueous electrosynthesis of silver indium selenide nanocrystals and photothermal properties. *Green Chemistry*, v. 1, p. 1, 2020.

## **6.2. Resumos publicados em anais de congressos internacionais**

**Caires, A.J**; Mansur, H.S.; Mansur, A.A.P.; Carvalho, S.M.; Lobato, Z.I.P.; dos Reis, J.K.P. Gold nanoparticles-carboxymethyl cellulose nanoimmunosensor for potential detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). In: *World Congress on Biosensors*, 2018, Miami. Gold nanoparticles-carboxymethyl cellulose nanoimmunosensor for potential detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1), 2018.

## Capítulo 7 – Sugestões de trabalhos futuros

De uma abordagem geral o nanomaterial desenvolvido neste trabalho pode ser descrito então como,  $M_x@W_yS-CMC_z$  onde  $M_x$  é um núcleo metálico (Au, Ag, Cu, ect),  $W_zS$  é um sulfeto, tais como CdS, ZnS, ect e  $CMC_z$  é uma modificação da CMC, tais como a introdução de aminoácidos e/ou outras moléculas de afinidade específica na cadeia polimérica. Essas características, combinadas em um nanomaterial em dispersão coloidal estável, com síntese aquosa e sem necessidade de infraestrutura sofisticada para produção, abre caminho para aplicações inovadoras em diversos campos de pesquisa interdisciplinar. Além disto, esse nanomaterial tem promissores desenvolvimentos em perspectiva, tendo em vista a possibilidade de utilização dos métodos desenvolvidos para variação das características da nanoheterojunção plasmônica fotoluminescente, tais como, variação das propriedades plasmônicas do núcleo pela utilização de outros tipos de metais, ou ainda, pela mudança de morfologia e tamanho do núcleo. Alterações na casca semicondutora podem levar a variações nas características de emissão do material, tais como, crescimento de outros tipos de material semicondutor, com características de absorção e emissão em diversas janelas espectrais.

Como sugestões para trabalhos futuros:

- Nucleação e crescimento de uma casca de ZnS na superfície de diferentes tipos de núcleo metálico (por exemplo AgNPs) pela mediação e estabilização do biopolímero CMC, para formação de nano-heterojunções metal/semicondutor com diferentes valores de LSPR e avaliação das propriedades ópticas.
- Nucleação e crescimento de uma casca de outros tipos de materiais semicondutores na superfície de AuNPs@CMC pela mediação e estabilização do biopolímero CMC, para formação de nanoheterojunções metal/semicondutor com diferentes valores de band gap e avaliação das propriedades ópticas.
- Aplicação de nanoheterojunções Au@ZnS-CMC e Au@ZnS:In-CMC.

## Apêndice A1

### Efeito da purificação através de centrifugação nas propriedades ópticas de nanoheterojunções Au@ZnS-CMC

A síntese da dispersão coloidal de Au@ZnS-CMC pode ocorrer com formação de ZnS@CMC livre. Para minimizar essa situação, as amostras de Au@ZnS-CMC foram centrifugadas para separação de possíveis QDts de ZnS@CMC livre na dispersão coloidal.

A avaliação do processo de síntese em relação à produção de estruturas núcleo-casca e de possível nucleação e crescimento de ZnS@CMC livre no coloide foi avaliada pelas análises de medidas de espectroscopia UV-Vis e PL nas etapas do processo de purificação através de centrifugação. A figura A1 apresenta os resultados das medidas de UV-Vis para os sistemas de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) amostra após a purificação por centrifugação e (d) sobrenadante resultante da centrifugação. As figuras A2 e A3 apresentam destaque para as regiões espectrais de 400 a 700nm e 190 a 400nm, respectivamente.

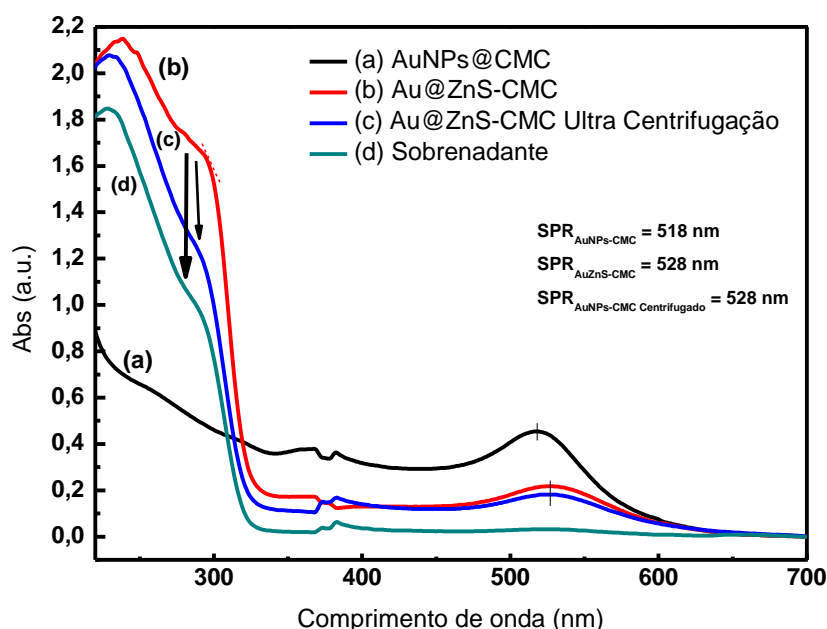


Figura A1 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) amostra após a purificação por centrifugação e (d) o sobrenadante resultante da centrifugação.



Os resultados evidenciam que a síntese ocorre com o crescimento de ZnS livre, como pode ser observado pela banda de absorção excitônica do ZnS nas figuras A1 e A3, na região em torno de 290nm. Pelos espectros, é ainda possível afirmar que a remoção do ZnS livre não altera o deslocamento observado do LSPR, que é devido a presença da casca de ZnS nas AuNPs@CMC. Mais importante, foi observado que o LSPR é amortecido devido ao crescimento da casca de ZnS, evidenciado pela redução da intensidade de absorção nestes sistemas.

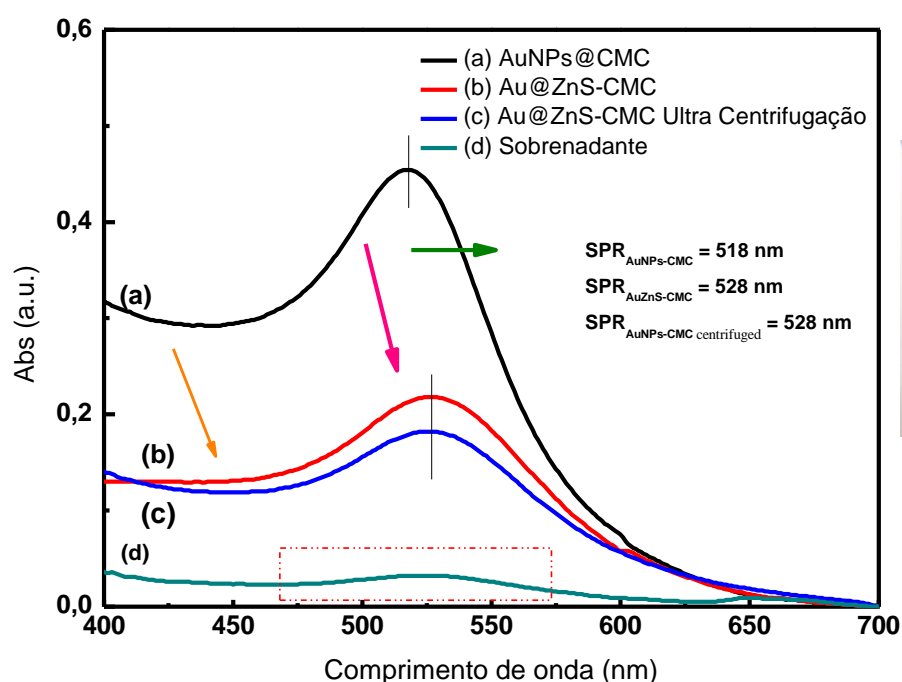


Figura A2 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) amostra após a purificação por centrifugação e (d) sobrenadante resultante da centrifugação (Inset: foto após a centrifugação mostrando Au@ZnS-CMC depositado no fundo do eppendorf).

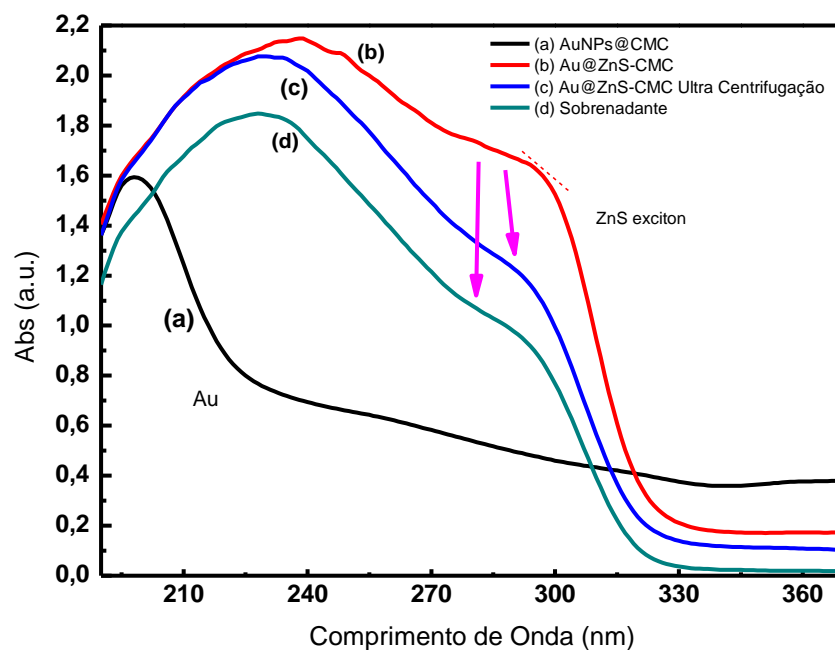


Figura A3 - Medidas de espectroscopia UV-Vis de amostras de (a) AuNPs@CMC, (b) Au@ZnS-CMC, (c) amostra após a purificação por centrifugação e (d) sobrenadante resultante da centrifugação.

O efeito do processo de centrifugação foi ainda avaliado por medidas de espectroscopia de fotoluminescência, sendo os resultados apresentados na figura A4. Pelos espectros medidos, foi possível concluir que a síntese ocorre com o crescimento de ZnS livre, como observado pela elevada emissão do sobrenadante resultado da purificação (ZnS livre), comprovando a discussão apresentada pelos resultados de UV-Vis. Contudo, a emissão do sistema núcleo-casca é ainda intensa mesmo após o processo de remoção do componente de ZnS livre, comprovando que a casca de ZnS integrada ao núcleo de AuNPs@CMC, apresentam emissão de luz característica do ZnS.

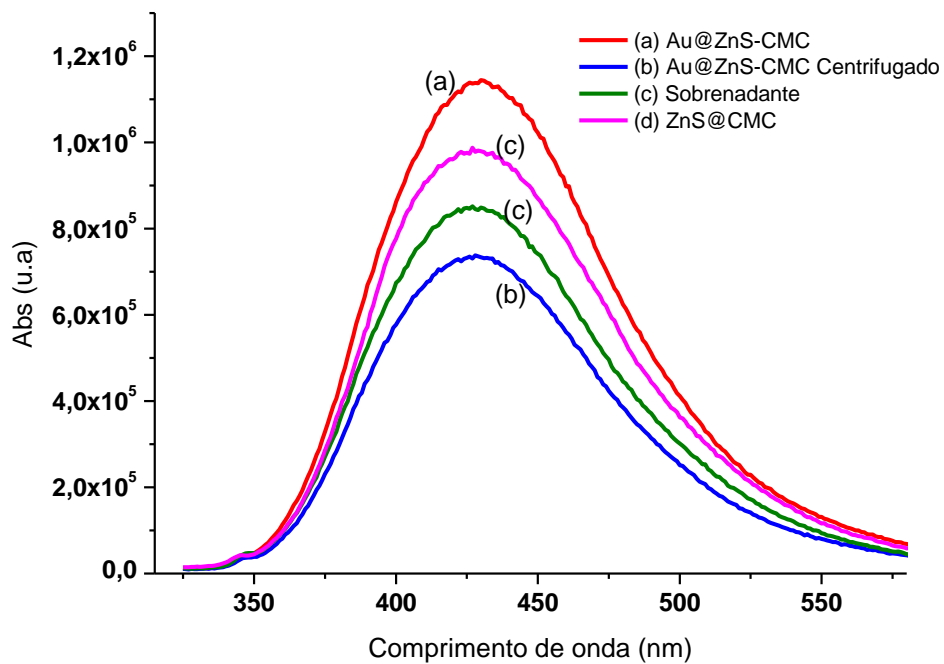


Figura A4 - Medidas de espectroscopia PL de amostras de (a) Au@ZnS-CMC, (b) Au@ZnS-CMC após a purificação por centrifugação, (c) sobrenadante resultante da centrifugação e (d) ZnS@CMC para comparação.

## Capítulo 9 – Referências bibliográficas

1. Lihong Jing, Stephen V. Kershaw, Yilin Li, Xiaodan Huang, Yingying Li, Andrey L. Rogach, Mingyuan Gao. Aqueous Based Semiconductor Nanocrystals. *Chem. Rev*, 116, 18, 10623-10730, 2016.
2. Michael M. Krause, Patanjali Kambhampati. Linking surface chemistry to optical properties of semiconductor nanocrystals. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 17, 18882-18894, 2015.
3. Jin Chang, Eric R. Waclawik. Colloidal semiconductor nanocrystals: controlled synthesis and surface chemistry in organic media. *RSC Adv*, 4, 23505-23527, 2014.
4. Andrew M. Smith, Shuming Nie. Semiconductor Nanocrystals: Structure, Properties, and Band Gap Engineering. *Acc. Chem. Res*, 43, 2, 190-200, 2010.
5. Pavel Zrazhevskiy, Xiaohu Gao, Multifunctional quantum dots for personalized medicine. *Nano Today*, 4, 5, 414-428, 2009.
6. Younan Xia, Yujie Xiong, Byungkwon Lim, Sara E. Skrabalak. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics ?. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 1, 60-103, 2009.
7. Huanjun Chen, Lei Shao, Qian Lia, Jianfang Wang. Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem. Soc. Rev*, 42, 7, 2679-2724, 2013.
8. Andrea C. Ferrari, Francesco Bonaccorso, Vladimir Fal'ko, Konstantin S. Novoselov, Stephan Roche, Peter Bøggild, Stefano Borini, Frank H. L. Koppens, Vincenzo Palermo, Nicola Pugno, José A. Garrido, Roman Sordan, Alberto Bianco, Laura. Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems. *Nanoscale*, 7, 4598-4810, 2015.
9. Michael F. L. De Volder, Sameh H. Tawfick, Ray H. Baughman, A. John Hart Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. *Science*, 6119, 339, 535-539, 2013.

10. Ruibin Jiang, Benxia Li, Caihong Fang, Jianfang Wang. Metal/Semiconductor Hybrid Nanostructures for Plasmon-Enhanced Applications. *Adv. Mater.*, 26, 5274-5309, 2014.
11. Lionel Nicole, Christel Laberty-Robert, Laurence Rozes, Clément Sanchez. Hybrid materials science: a promised land for the integrative design of multifunctional materials. *Nanoscale*, 6, 6267-6292, 2014.
12. Tupei Chen, Yang Liu. Semiconductor Nanocrystals and Metal Nanoparticles: Physical Properties and Device Applications (Advances in Materials Science and Engineering). s.l.: CRC Press Advances in Materials Science and Engineering, 2016.
13. Xuan Yang, Miaoxin Yang, Bo Pang, Madeline Vara, Younan Xia. Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chem. Rev.*, 115, 10410-10488, 2015.
14. Erik C. Dreaden, Alaaldin M. Alkilany, Xiaohua Huang, Catherine J. Murphy, Mostafa A. El-Sayed. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2740-2779, 2012.
15. Krishnendu Saha, Sarit S. Agasti, Chaekyu Kim, Xiaoning Li, Vincent M. Rotello. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.*, 112, 5, 2739-2779, 2012.
16. Zhiqin Yuan, Cho-Chun Hu, Huan-Tsung Chang, Chao Lua. Gold nanoparticles as sensitive optical probes. *Analyst*, 141, 1611, 2016.
17. Lukas Novotny, Bert Hecht. Principles of Nano-Optics. Cambridge University Press, 2012.
18. Carvalho, Isadora C.; Mansur, Alexandra A.P.; Carvalho, Sandhra M.; Florentino, Rodrigo M.; Mansur, Herman S. L-cysteine and poly-L-arginine grafted carboxymethyl cellulose/Ag-In-S quantum dot fluorescent nanohybrids for in vitro bioimaging of brain cancer cells. *International journal of biological macromolecules*, 133, 739-753, 2019.

19. Toshihide Takagahara, Kyozauro Takeda. Theory of the quantum confinement effect on excitons in quantum dots of indirect-gap materials. *Phys. Rev. B*, 46, 15578, 1992.
20. Freitas, Denilson V.; Passos, Sérgio G.B.; Dias, Jéssica M.M.; Mansur, Alexandra; Carvalho, Sandhra M.; Mansur, Herman; Navarro, Marcelo. Toward greener electrochemical synthesis of composition-tunable luminescent CdX-based (X = Te, Se, S) quantum dots for bioimaging cancer cells. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 250, 233-243, 2017.
21. Mansur, A.A.P.; DE Carvalho, Sandhra M. ; Mansur, H. S. . Bioengineered quantum dot/chitosan-tripeptide nanoconjugates for targeting the receptors of cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 780-789, 2016.
22. Mansur, H. S.; Mansur, A.A.P.;; Lobato, Z.I.P ; Carvalho, Sandhra M. ; Leite, Maria de Fátima . Surface biofunctionalized CdS and ZnS quantum dot nanoconjugates for nanomedicine and oncology: to be or not to be nanotoxic?. *International Journal of Nanomedicine (Online)*, 11, 4669-4690, 2016.
23. S. Iravani, H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci*, 9, 6, 385-406, 2014.
24. Panikkanvalappil R. Sajanlal, Theruvakkattil S. Sreeprasad, Akshaya K. Samal, Thalappil Pradeep. Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano Reviews & Experiments*, 2, 5883, 2011.
25. Hutter, E. Fendler, J.H. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Adv. Mater*, 16, 1685-1706, 2004.
26. Eleonora Petryayeva, Ulrich J. Krull. Localized surface plasmon resonance Nanostructures, bioassays and biosensing - A review. *Analytica Chimica Acta*, 1, 706, 8-24, 2011.

27. Jian Wang, Hong Zhi Zhang, Rong Sheng Li, Cheng Zhi Huang. Localized surface plasmon resonance of gold nanorods and assemblies in the view of biomedical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 429-443, 2016.
28. Plasmon-enhanced light-matter interactions and applications. *Nature Comput Mater*, 5, 45, 2019.
29. Leonel. Alice, Mansur. H.S; Mansur, A.A.P.; De Jesus. A. C, Carvalho, S. M, Krambrock. Klaus. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles/carboxymethyl cellulose core-shell nanohybrids for killing cancer cells in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 677-691, 2019.
30. Capanema, N.S.V.; Mansur, A.A.P.; Carvalho, Sandhra M.; Mansur, L. L. ; Ramos, Carolina P. ; Lage, A. P.; Mansur. H.S. Physicochemical properties and antimicrobial activity of biocompatible carboxymethylcellulose-silver nanoparticle hybrids for wound dressing and epidermal repair. *Journal of Applied Polymer Science*, 135, 45812, 2018.
31. Mansur, A.A.P; Mansur. H.S; Mansur, R. L. ; Carvalho, F. G. ; Carvalho, Sandhra M. .Bioengineered II-VI semiconductor quantum dot-carboxymethylcellulose nanoconjugates as multifunctional fluorescent nanoprobe for bioimaging live cells. *Spectrochimica acta part a-molecular and biomolecular spectroscopy*, 189, 393-404, 2017.
32. Debasis Bera, Lei Qian, Teng-Kuan Tseng, Paul H. Holloway. Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. *Materials*, 3, 4, 2260-2345, 2010.
33. A.I. Efros, A.L. Efros. Interband absorption of light in semiconductor sphere. *Sov. Phys. Semicond*, 16, 772, 1982.
34. A.I. Ekimov, A.A. Onushchenko, A.I. Efros. *JETP Lett*, 43, 292, 1986.
35. A.I. Ekimov, A.A. Onushchenko. *JETP Lett*, 40, 337, 1984.
36. A.I. Ekimov, A.I. Efros, A.A. Onushchenko. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. *Solid State Communications*, 56, 11, 921-924, 1985.

37. Herman S. Mansur, Alexandra A.P. Mansur, J.C. González. Synthesis and characterization of CdS quantum dots with carboxylic-functionalized poly (vinyl alcohol) for bioconjugation. *Polymer*, 4, 52, 1045-1054, 2011.
38. Fábio P. Ramanery, Alexandra A. P. Mansur, Herman S. Mansur; Synthesis and Characterization of Water-dispersed CdSe/CdS Core-shell Quantum Dots Prepared via Layer-by-layer Method Capped with Carboxylic-functionalized Poly(Vinyl Alcohol). *Materials Research*, 17, 133-140, 2014.
39. José Augusto Lucena dos Santos, Fabio Baum, Emerson Cristofer Kohlrausch, et al., “3-Mercaptopropionic, 4-Mercaptobenzoic, and Oleic Acid-Capped CdSe Quantum Dots: Interparticle Distance, Anchoring Groups, and Surface Passivation”. *Journal of Nanomaterials*, Article ID 2796746, 2019.
40. Tingting Gan, Nanjing Zhao, Gaofang Yin, Mengdi Tu, Jianguo Liuab, Wenqing Liu. Mercaptopropionic acid-capped Mn-doped ZnS quantum dots as a probe for selective room-temperature phosphorescence detection of  $Pb^{2+}$  in water. *New J. Chem*, 41, 13425-13434, 2017.
41. Reena K. Sajwan, Yana Bagbi, Purnima Sharma, Pratima R. Solanki. L-cysteine and 3-mercaptopropionic acid capped cadmium selenide quantum dots-based metal ion probes. *Journal of Luminescence*, 187, 126-132, 2017.
42. Chase C. Reinhart, Erik Johansson. Colloidal 3-Mercaptopropionic Acid Capped Lead Sulfide Quantum Dots in a Low Boiling Point Solvent. *J. Am. Chem. Soc*, 139, 16, 5827-5835, 2017.
43. Sarah D'Souza, Edith Antunes, Christian Litwinski, Tebello Nyokong. Photophysical behavior of zinc monoaminophthalocyanines linked to mercaptopropionic acid-capped CdTe quantum dots. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 220, 1, 11-19, 2011.
44. Santos, José Augusto Lucena dos. Síntese e caracterização de pontos quânticos de CdS, CdSe e CdTe para aplicação em células solares. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Química. 2016. Dissertação de Mestrado.



45. Lihong Jing, Stephen V. Kershaw, Yilin Li, Xiaodan Huang, Yingying Li, Andrey L. Rogach, Mingyuan Gao. Aqueous Based Semiconductor Nanocrystals. *Chem. Rev.*, 116, 18, 10623-10730, 2016.
46. C. Unni, Daizy Philip, S.L. Smitha, K.M. Nissamudeen, K.G. Gopchandran. Aqueous synthesis and characterization of CdS, CdS:Zn<sup>2+</sup> and CdS:Cu<sup>2+</sup> quantum dots. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 4, 72, 827-832, 2009.
47. Andrey L. Rogach, Thomas Franzl, Thomas A. Klar, Jochen Feldmann, Nikolai Gaponik, Vladimir Lesnyak, Alexey Shavel, Alexander Eychmüller, Yuri P. Rakovich, John F. Donegan. Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art. *J. Phys. Chem. C*, 111, 40, 14628-14637, 2007.
48. Qin Zhao, Xiaolong Rong, Hongbing Ma, Guanhong Tao. Aqueous synthesis of CdSe and CdSe/CdS quantum dots with controllable introduction of Se and S sources. *Mater Sci*, 48, 2135, 2013.
49. R.M. Hodlur, M.K. Rabinal. A new selenium precursor for the aqueous synthesis of luminescent CdSe quantum dots. *Chemical Engineering Journal*, 244, 82-88, 2014.
50. Jana, Nikhil R., Gearheart, Latha, Murphy, Catherine J. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*, 18, 13, 1389-1393, 2001.
51. Kim, Franklin, Song, Jae Hee and Yang, Peidong. Photochemical Synthesis of Gold Nanorods, *Journal of the American Chemical Society*, 13, 34, 14316-14317, 2002.
52. Jurate Virkutyte, Rajender S. Varma. Green synthesis of metal nanoparticles: Biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization. *Chem. Sci*, 2, 837-846, 2011.
53. Shakeel Ahmed, Mudasir Ahmad, Babu Lal Swami, Saiqa Ikram. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 1, 7, 17-28, 2016.

54. Priyanka Singh, Yu-Jin Kim, Dabing Zhang, Deok-Chun Yang. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 7, 34, 588-599, 2016.
55. Peter Logeswari, Sivagnanam Silambarasan, Jayanthi Abraham. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society*, 3, 19, 311-317, 2015.
56. Ashavani Kumar, Praveen Kumar Vemula, Pulickel M. Ajayan, George John. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature Materials*, 7, 236-241, 2008.
57. Pei Gan, Shi Han Ng, Yan Huang, Sam Fong Yau Li. Green synthesis of gold nanoparticles using palm oil mill effluent (POME): A low-cost and eco-friendly viable approach. *Bioresource Technology*, 113, 132-135, 2012.
58. Chandrakant K. Tagad, Kishor S. Rajdeo, Atul Kulkarni, Pooja More, R. C. Aiyer, Sushma Sabharwal. Green synthesis of polysaccharide stabilized gold nanoparticles: chemo catalytic and room temperature operable vapor sensing application. *RSC Advances*, 4, 24014-24019, 2014.
59. Haizhen Huang, Xiurong Yang. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydrate Research*, 15, 339, 2627-2631, 2004.
60. Fábio P. Ramanery, Alexandra A. P. Mansur, Herman S. Mansur. Biocompatible Fluorescent Core-Shell Nanoconjugates Based on Chitosan/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub> Quantum Dots. *Nanoscale Research Letters*, 11, 187, 2016.
61. Alexandra A.P. Mansur, Fábio P. Ramanery, Luiz C. Oliveira, Herman S. Mansur. Carboxymethyl chitosan functionalization of Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub> quantum dots: Towards eco-friendly fluorescent Core-Shell nanoprobe. *Carbohydrate Polymers*, 146, 455-466, 2016.
62. H S Mansur, A P Mansur. Nano-photocatalysts based on ZnS quantum dots/chitosan for the photodegradation of dye pollutants. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 76, 2015.

63. A P Mansur, H S Mansur, F G L M Borsagli, F P Ramanery. Bio-functionalized water-soluble ZnS quantum dots using carboxymethylchitosan. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 76, 2015.
64. Marcelo L. Larramendy, Sonia Soloneski. Green Nanotechnology - Overview and Further Prospects. s.l.: InTech, 2016.
65. Carlos A. Martínez Bonilla, Vladimir V. Kouznetsov. "Green" Quantum Dots: Basics, Green Synthesis, and Nanotechnological Applications. Sonia Soloneski Marcelo L. Larramendy. "Green Nanotechnology - Overview and Further Prospects". s.l.: InTech, 2016.
66. Linsong Li, Huaibin Shen, Changhua Zhou. "Green" synthesis of colloidal nanocrystals and their water-soluble preparation . US patent - US20120205598 A1 08, 16, 2011.
67. P. Bollella, C. Schulz, G. Favero, F. Mazzei, R. Ludwig, L. Gorton, R. Antiochia, Green Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles and their Application for Development of a Third Generation Lactose Biosensor, Electroanalysis, 29, 77, 2017.
68. Juliette S. BehraJohan Mattsson, Olivier J. Cayre, Eric S. J. Robles, Haiqiu Tang, Timothy N. Hunter. Characterization of Sodium Carboxymethyl Cellulose Aqueous Solutions to Support Complex Product Formulation: A Rheology and Light Scattering Study. ACS Appl. Polym. Mater, 1, 3, 344-358, 2019.
69. Heinze, T. and Koschella, A. Carboxymethyl Ethers of Cellulose and Starch - A Review. Macromol. Symp, 223, 13-40, 2005.
70. Alexandar Metodiev Zhivkov, Electric Properties of Carboxymethyl Cellulose, Cellulose - Fundamental Aspects, Theo van de Ven and Louis Godbout, IntechOpen 2013.
71. Feng He and Dongye Zhao. Manipulating the Size and Dispersibility of Zerovalent Iron Nanoparticles by Use of Carboxymethyl Cellulose Stabilizers, Environ. Sci. Technol, 41, 17, 6216-6221, 2007.

72. Caraschi, J. C., Campana, S. P. F., Influência do Grau de Substituição e da Distribuição de Substituintes Sobre as Propriedades de Equilíbrio de Carboximetilcelulose em Solução Aquosa. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 70-77, 1999.
73. Heinze, T., Erler, U., Nehls, I., Klemm. D., Determination of the substituent pattern of heterogeneously and homogeneously synthesized carboxymethyl cellulose by using high-performance liquid chromatography, *Macromolecular Materials and engineering*, 215, 93-106, 1994.
74. Keila Regina Santana Fagundes, Fabio Pereira Fagundes, Rosangela Balaban. Correlação entre propriedades físico-químicas da carboximetilcelulose e do carbonato de cálcio no desempenho de fluidos de perfuração aquosos. *RUnPetro*, 4, 1, 17-29, 2015.
75. C. V. Francis. Sodium Carboxymethylcellulose. *Anal. Chem*, 25, 6, 941-943, 1953.
76. A.A. Hebeish, M.H. El-Rafie, F.A. Abdel-Mohdy, E.S. Abdel-Halim, H.E. Emam. Carboxymethyl cellulose for green synthesis and stabilization of silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 3, 82, 933-941, 2010.
77. Mohamed Basuny, Ibraheem O. Ali, Ahmed Abd El-Gawad, Mostafa F. Bakr, Tarek M. Salama. A fast-green synthesis of Ag nanoparticles in carboxymethyl cellulose (CMC) through UV irradiation technique for antibacterial Applications. *J Sol-Gel Sci Technol*, 75, 530–540, 2015.
78. A.A. Hebeish, M.H. El-Rafie, F.A. Abdel-Mohdy, E.S. Abdel-Halim, H.E. Emam. Carboxymethyl cellulose for green synthesis and stabilization of silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 82, 2010, 933-941.
79. Mallikarjuna N. Nadagouda, Rajender S. Varma. Synthesis of Thermally Stable Carboxymethyl Cellulose/Metal Biodegradable Nanocomposites for Potential Biological Applications. *Biomacromolecules*, 8, 9, 2762-2767, 2007.

80. Jurate Virkutyte, Rajender S. Varma. Green synthesis of metal nanoparticles: Biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization. *Chem. Sci*, 2, 837, 2011.
81. C. Basavaraja, Jin Kyung Kim, Do Sung Huh. Characterization and temperature-dependent conductivity of polyaniline nanocomposites encapsulating gold nanoparticles on the surface of carboxymethyl cellulose, *Materials Science and Engineering: B*, 178, 2, 167-173, 2013.
82. Uryupina, O.Y., Vysotskii, V.V., A. I. Loskutov, A. V. Cherkasova, V. I. Roldugin. Formation of gold nanoparticles in aqueous solutions of cellulose derivatives and a study of the properties of these nanoparticles. *Russ J Appl Chem*, 86, 1268-1274, 2013.
83. Uryupina, O.Y., Vysotskii, V.V., V. V. Matveev, A. V. Gusel'nikova, V. I. Roldugin. Production of Gold nanoparticles in aqueous solutions of cellulose derivatives. *Colloid J*, 73, 551, 2011.
84. Fernando Menegatti de Melo, Allef Soares Fante, Vitor de M. Zamarion, Henrique Eisi Toma. SERS-active carboxymethyl cellulose-based gold nanoparticles: high-stability in hypersaline solution and selective response in the Hofmeister series. *New J. Chem*, 43, 8093-8100, 2019.
85. Junjun Tan, Ruigang Liu, Wen Wang, Wenyong Liu, Ye Tian, Min Wu, Yong Huang. Controllable Aggregation and Reversible pH Sensitivity of AuNPs Regulated by Carboxymethyl Cellulose. *Langmuir*, 26, 3, 2093-2098, 2010.
86. Xiaoyi Weia, Li Qia, Junjun Tanb, Ruigang Liu, Fuyi Wang. A colorimetric sensor for determination of cysteine by carboxymethyl cellulose-functionalized gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 671, 80-84, 2010.
87. Mohamed Basuny, Ibraheem O. Ali, Ahmed Abd El-Gawad, Mostafa F. Bakr, Tarek M. Salama. A fast green synthesis of Ag nanoparticles in carboxymethyl cellulose (CMC) through UV irradiation technique for antibacterial applications. *J Sol-Gel Sci Technol*, 75, 530-540, 2015.

88. Jing Chen, Jing Wang, Xin Zhang, Yeling Jin. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles by carboxymethyl cellulose sodium and silver nitrate. *Materials Chemistry and Physics*, 108, 421-424, 2008.
89. Capanema, N. S. V. ; Carvalho, I. C ; Mansur, A. A. P.; Carvalho, S. M. ; Lage, A.P. ; Mansur, H.S. Hybrid Hydrogel Composed of Carboxymethylcellulose-Silver Nanoparticles-Doxorubicin for Anticancer and Antibacterial Therapies against Melanoma Skin Cancer Cells. *ACS Applied Nano Materials*, 2, 1-16, 2019.
90. Capanema, N.S.V.; Mansur, A. A. P. ; Carvalho, S. M. ; Mansur, Lorena L. ; Ramos, Carolina P. ; Lage, A. P. ; Mansur, H. S. . Physicochemical properties and antimicrobial activity of biocompatible carboxymethylcellulose-silver nanoparticle hybrids for wound dressing and epidermal repair. *Journal of Applied Polymer Science*, 135, 45812, 2017.
91. Mansur, A.A.P., Mansur, H.S., Tabare, C. Paiva, A., Nadia S. V. Capanema., Eco-friendly AgInS<sub>2</sub>/ZnS quantum dot nanohybrids with tunable luminescent properties modulated by pH-sensitive biopolymer for potential solar energy harvesting applications. *J Mater Sci: Mater Electron*, 30, 16702-16717, 2019.
92. A.A.P. Mansur, H.S. Mansur, S.M. Carvalho, A.J. Caires, One-Pot Aqueous Synthesis of Fluorescent Ag-In-Zn-S Quantum Dot/Polymer Bioconjugates for Multiplex Optical Bioimaging of Glioblastoma Cells, *Contrast Media Mol. Imaging*, 3896107, 2017.
93. A.A.P. Mansur, H.S. Mansur, A.J. Caires, R.L. Mansur, L.C. Oliveira, Composition-Tunable Optical Properties of ZnxCd(1-x)S Quantum Dot-Carboxymethylcellulose Conjugates: Towards One-Pot Green Synthesis of Multifunctional Nanoplatforms for Biomedical and Environmental Applications, *Nanoscale Res. Lett*, 12, 443, 2017.
94. A.A.P. Mansur, F.G. de Carvalho, R.L. Mansur, S.M. Carvalho, L.Carlos de Oliveira, H.S. Mansur, Carboxymethylcellulose/ZnCdS fluorescent quantum dot nanoconjugates for cancer cell bioimaging, *Int. J. Biol. Macromol*, 96, 675-686, 2017.

95. L.G. Sillen, A.E. Martell, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, In: Lange's Handbook; The Chemical Society, London, 8.6-8.11, 1964
96. Merhari, Lhadi. *Hybrid Nanocomposites for Nanotechnology, Electronic, Optical, Magnetic and Biomedical Applications*. New Delhi, India : Springer US, 978-0-387-72398-3. 2009.
97. Macchione, Micaela & Biglione, Catalina & Strumia, Miriam. (2018). Design, Synthesis and Architectures of Hybrid Nanomaterials for Therapy and Diagnosis Applications. *Polymers*, 10, 527.
98. Christian Strelow, T. Sverre Theuerholz, Christian Schmidtke, Marten Richter, Jan-Philip Merkl, Hauke Kloust, Ziliang Ye, Horst Weller, Tony F. Heinz, Andreas Knorr, Holger Lange. Metal–Semiconductor Nanoparticle Hybrids Formed by Self-Organization: A Platform to Address Exciton–Plasmon Coupling. *Nano Letters*, 16, 8, 4811-4818, 2016.
99. Atsuhiko Tanaka, uri Nishino, Satoshi Sakaguchi, Takayuki Yoshikawa, Kazuya Imamura, Keiji Hashimoto, Hiroshi Kominami. Functionalization of a plasmonic Au/TiO<sub>2</sub> photocatalyst with an Ag co-catalyst for quantitative reduction of nitrobenzene to aniline in 2-propanol suspensions under irradiation of visible light. *Chem. Commun*, 49, 2551-2553, 2013.
100. Zhi-Da Gao, Hai-Feng Liu, Cheng-Yong Lia, Yan-Yan Song. Biotemplated synthesis of Au nanoparticles–TiO<sub>2</sub> nanotube junctions for enhanced direct electrochemistry of heme proteins. *Chem. Commun*, 49, 774-776, 2013.
101. Wenguang Fan, Simon Jewell, Yiyi She, Michael K. H. Leung. In situ deposition of Ag–Ag<sub>2</sub>S hybrid nanoparticles onto TiO<sub>2</sub> nanotube arrays towards fabrication of photoelectrodes with high visible light photoelectrochemical properties. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 16, 676-680, 2014.
102. S. F. Kou, W. Ye, X. Guo, X. F. Xu, H. Y. Sun, J. Yang. Gold nanorods coated by oxygen-deficient TiO<sub>2</sub> as an advanced photocatalyst for hydrogen evolution. *RSC Adv*, 6, 39144-39149, 2016.

103. Sun, Z., Yang, Z., Zhou, J., Yeung, M., Ni, W., Wu, H., Wang, J. A General Approach to the Synthesis of Gold–Metal Sulfide Core–Shell and Heterostructures. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 2881-2885, 2009.
104. W.-T. Chen, Y.-K. Lin , T.-T. Yang , Y.-C. Pu , Y.-J. Hsu. Au/ZnS core/shell nanocrystals as an efficient anode photocatalyst in direct methanol fuel cells. *Chem. Commun*, 49, 8486, 2013.
105. Wei-Ta Chen, Ting-Ting Yang, Yung-Jung Hsu. Au-CdS core/shell Nanocrystals with Controllable shell Thickness and Photoinduced Charge Separation Property. *Chem. Mater*, 20, 23, 7204-7206, 2008.
106. T.-T. Yang, W.-T. Chen , Y.-J. Hsu , K.-H. Wei , T.-Y. Lim , T.-W. Lin ., Interfacial Charge Carrier Dynamics in core/shell Au-CdS Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C*, 114, 26, 11414-11420, 2010.
107. Jiatao Zhang, Yun Tang, Kwan Lee, Min Ouyang. Nonepitaxial Growth of Hybrid core/shell Nanostructures with Large Lattice Mismatches. *Science*, 327, 1634-1638, 2010.
108. Wei-Ta Chen, Ting-Ting Yang, Yung-Jung Hsu. Au-CdS core/shell Nanocrystals with Controllable shell Thickness and Photoinduced Charge Separation Property. *Chemistry of Materials*, 20, 23, 7204-7206, 2008.
109. Yang Yu, Wei Wen, Xin-Yue Qian, Jia-Bin Liu, Jin-Ming Wu. UV and visible light photocatalytic activity of Au/TiO<sub>2</sub> nanoforests with Anatase/Rutile phase junctions and controlled Au locations. *Scientific Reports*, 7, 41253, 2017.
110. Pino D’Amico, Arrigo Calzolari, Alice Ruini, Alessandra Catellani. New energy with ZnS: novel applications for a standard transparent compound. *Scientific Reports*, 7, 16805, 2017.
111. Xiaosheng Fang, Tianyou Zhai, Ujjal K. Gautam, Liang Li, Limin Wu, Yoshio Bando, Dmitri Golberg. ZnS nanostructures: From synthesis to applications, *Progress in Materials Science*, 56, 2, 175-287, 2011.



112. Mary Debenham. Refractive indices of zinc sulfide in the 0.405–13- $\mu\text{m}$  wavelength range. *Applied Optics*, 23, 14, 2238-2239, 1984.
113. Fábio P. Ramanery, Alexandra A. P. Mansur, Fernanda G. L. M. Borsagli, Herman S. Mansur. Green and facile synthesis of water-soluble ZnS quantum dots nanohybrids using chitosan derivative ligands. *J Nanopart Res*, 16, 2504, 2014.
114. Alexandra A.P. Mansur, Herman S. Mansur, Fábio P. Ramanery, Luiz Carlos Oliveira, Patterson P. Souza, “Green” colloidal ZnS quantum dots/chitosan nanophotocatalysts for advanced oxidation processes: Study of the photodegradation of organic dye pollutants, *Applied Catalysis B: Environmental*, 158-159, 269-279, 2014.
115. Mansur AAP, Mansur HS, Carvalho SM, Lobato ZIP, Leite MF, Mansur LL. Fluorescent ZnS Quantum Dots-Phosphoethanolamine Nanoconjugates for Bioimaging Live Cells in Cancer Research. *ACS Omega*, 3, 11, 15679-15691, 2018.
116. Wei-Ta Chen, Yin-Kai Lin, Ting-Ting Yang, Ying-Chih Pu, Yung-Jung Hsu. Au/ZnS core/shell nanocrystals as an efficient anode photocatalyst in direct methanol fuel cells. *Chem. Commun*, 49, 8486-8488, 2013.
117. Prashant Kumar, Mahmud Diab, Kobi Flomin, Pazit Rukenstein, Taleb Mokari, Organic phase synthesis of noble metal-zinc chalcogenide core/shell nanostructures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 480, 159-165, 2016.
118. Jiatao Zhang, Yun Tang, Kwan Lee, Min Ouyang. Nonepitaxial Growth of Hybrid core/shell Nanostructures with Large Lattice Mismatches. *Science*, 327, 5973, 1634-1638, 2010.
119. Tobias A, Qing S, Jones M. Synthesis, Characterization, and Functionalization of Hybrid Au/CdS and Au/ZnS core/shell Nanoparticles. *J Vis Exp*, 2, (109):e53383, 2016.
120. Liu Huang, Jiaojiao Zheng, Lingling Huang, Jia Liu, Muwei Ji, Yuan Yao, Meng Xu, Jijia Liu, Jiatao Zhang, Yadong Li. Controlled Synthesis and Flexible Self-Assembly of Monodisperse Au@Semiconductor core/shell Hetero-Nanocrystals into Diverse Superstructures. *Chemistry of Materials*, 29, 5, 2355-2363, 2017.

121. Mulvaney, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir*, 12, 3, 788-800, 1996.
122. Allen C. Templeton, Jeremy J. Pietron, Royce W. Murray, Paul Mulvaney, Solvent Refractive Index and Core Charge Influences on the Surface Plasmon Absorbance of Alkanethiolate Monolayer-Protected Gold Clusters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104, 3, 564-570, 2000.
123. Oldfield, G., Ung, T. and Mulvaney, P. Au@SnO<sub>2</sub> Core-Shell Nanocapacitors. *Adv. Mater.*, 12: 1519-1522, 2000.
124. Maier, Stefan Alexander. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. s.l. : Springer US, XXVI, 224, 2007.
125. Katherine A. Willets, Richard P. Van Duyne. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu Rev Phys Chem*, 58, 267-297, 2007.
126. J M Pitarke, V M Silkin, E V Chulkov and P M Echenique. Theory of surface plasmons and surface-plasmon polaritons. *Rep. Prog. Phys.*, 70, 1-87, 2007.
127. Molly M. Miller, Anne A. Lazarides. Sensitivity of Metal Nanoparticle Surface Plasmon Resonance to the Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B*, 109, 46, 21556-21565, 2005.
128. Robert Schreiber, Jaekwon Do, Eva-Maria Roller, Tao Zhang, Verena J. Schüller, Philipp C. Nickels, Jochen Feldmann & Tim Liedl. Hierarchical assembly of metal nanoparticles, quantum dots and organic dyes using DNA origami scaffolds. *Nature Nanotech*, 9, 74-78, 2014.
129. Liu, J.; He, H.; Xiao, D.; Yin, S.; Ji, W.; Jiang, S.; Luo, D.; Wang, B.; Liu, Y. Recent Advances of Plasmonic Nanoparticles and their Applications. *Materials*, 11, 1833, 2018.
130. William R. Erwin, Holly F. Zarick, Eric M. Talberta, Rizia Bardhan. Light traing in mesoporous solar cells with plasmonic nanostructures. *Energy Environ. Sci*, 6, 1577-1601, 2016.

131. Xiang-Chao Ma, Ying Dai, Lin Yu, Bai-Biao Huang. Energy transfer in plasmonic photocatalytic composites. *Nature Light: Science & Applications*, 5, e16017, 2016.
132. Nanoscale spectroscopy with optical antennas. Palash Bharadwaj, Ryan Beams, Lukas Novotny. *Chemical Science*, 2, 136-140, 2011.
133. Vincenzo Giannini, Antonio I. Fernández-Domínguez, Susannah C. Heck, Stefan A. Maier. Plasmonic Nanoantennas: Fundamentals and Their Use in Controlling the Radiative Properties of Nanoemitters. *Chem. Rev*, 111, 6, 3888-3912, 2011.
134. Shobhit K. Patel, Christos Argyropoulos. Plasmonic nanoantennas: enhancing light-matter interactions at the nanoscale. *EPJ AI. Metamat*, 2, 4, 2015.
135. Prashant K. Jain, Kyeong Seok Lee, Ivan H. El-Sayed, Mostafa A. El-Sayed. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B*, 110, 14, 7238-7248, 2006.
136. Mark L. Brongersma, Naomi J. Halas, Peter Nordlander. Plasmon-induced hot carrier science and technology. *Nature Nanotechnology*, 10, 25-34, 2015.
137. Jiangtian Li, Scott K. Cushing, Fanke Meng, Tess R. Senty, Alan D. Bristow, Nianqiang Wu. Plasmon-induced resonance energy transfer for solar energy conversion. *Nature photonics*, 9, 601-608, 2015.
138. Craig F. Bohren, Donald R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. New York: Wiley, 1998.
140. Hajisalem G, Ahmed A, Pang Y, Gordon R.. Plasmon hybridization for enhanced nonlinear optical response. *Optics express*, 28, 20, 29930, 2012.
141. Jatish Kumar, K. George Thomas. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Investigations at the Nanorod Edges and Dimer Junctions. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2, 6, 2011.
142. Achermann, Marc. Exciton-Plasmon Interactions in Metal-Semiconductor Nanostructures. *J. Phys. Chem. Lett*, 1, 2837-2843, 2010.

143. Jakob Ebner, Andreas Trügler, and Ulrich Hohenester. Optical excitations of hybrid metal-semiconductor nanoparticles. *Eur. Phys. J. B*, 88, 11, 2015.
144. Christian Strelow, Sverre Theuerholz, Christian Schmidtke, Marten Richter, Jan-Philip Merkl, Hauke Kloust, Ziliang Ye, Horst Weller, Tony F. Heinz, Andreas Knorr, Holger Lange. Metal–Semiconductor Nanoparticle Hybrids Formed by Self-Organization: A Platform to Address Exciton–Plasmon Coupling. *Nano Lett*, 16, 4811-4818, 2016.
145. Huanjun Chen, Tian Minga, Lei Zhao, Feng Wang, Ling-Dong Sun, Jianfang Wang, Chun-Hua Yan. Plasmon–molecule interactions. *NanoToday*. 5, 494-505, 2010.
146. Jennifer A. Hollingsworth, Han Htoon, Andrei Piryatinski, Stephan Götzinger, Vahid Sandoghdara. When excitons and plasmons meet: Emerging function through synthesis and assembly. *MRS Bulletin*, 40, 768-776, 2015.
147. Yuan Pu, Fuhong Cai, Dan Wang, Jie-Xin Wang, and Jian-Feng Chen. Colloidal Synthesis of Semiconductor Quantum Dots toward Large-Scale Production: A Review *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 57, 6, 1790-1802, 2018.
148. Haizheng Zhong, Zelong Bai, and Bingsuo Zou. Tuning the Luminescence Properties of Colloidal I–III–VI Semiconductor Nanocrystals for Optoelectronics and Biotechnology Applications. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 3, 21, 3167-3175, 2012.
149. Fox, Mark. *Optical properties of Solids*. s.l. : Oxford University Press; 2 edition Oxford Master Series in Physics (Book 3), 2010.
150. Nir Waiskopf, Yuval Ben-Shahar, Uri Banin. Photocatalytic Hybrid Semiconductor-Metal Nanoparticles; from Synergistic Properties to Emerging Applications. *Advanced Materials*, 30, 41, 1706697, 2018.
151. Jia Liu, Jingwen Feng, Jing Gui, Tao Chen, Meng Xu, Hongzhi Wang, Huifang Dong, Hailong Chen, Xiaowei Li, Liang Wang, Zhuo Chen, Zhenzhong Yang, Jiajia Liu, Weichang Hao, Yuan Yao, Lin Gu, Yuxiang Weng, Yu Huang, Xiangfeng Duan, Jiatao Zhang, Yadong Li. Metal@semiconductor core-shell nanocrystals with

atomically organized interfaces for efficient hot electron-mediated photocatalysis. *Nano Energy*, 48, 44-52, 2018.

152. Cultrera, A. Effects of adsorbates on the electrical and optical properties of mesoporous semiconductors. University of Turin, 2014, 170. (Tese, doutorado em Chemical and Material Sciences).

153. Marc Achermann. Exciton-Plasmon Interactions in Metal-Semiconductor Nanostructures. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1, 2837-2843, 2010.

154. Denis G. Baranov, Martin Wersäll, Jorge Cuadra, Tomasz J. Antosiewicz, Timur Shegai. Novel Nanostructures and Materials for Strong Light–Matter Interactions. *ACS Photonics*, 5, 24-42, 2018.

155. Chuancheng Jia, Xixi Li, Na Xin, Yao Gong, Jianxin Guan, Linan Meng, Sheng Meng, Xuefeng Guo. Interface-Engineered Plasmonics in Metal/Semiconductor Heterostructures. *Adv. Energy Mater.*, 1600431, 2016.

156. K. Wu, J. Chen, J. R. McBride, T. Lian. Efficient hot-electron transfer by a plasmon-induced interfacial charge-transfer transition. *Science*, 6248, 349, 632-635, 2015.

157. Clavero, César. Plasmon-induced hot-electron generation at nanoparticle/metal-oxide interfaces for photovoltaic and photocatalytic devices. *Nature Photonics*, 8, 95-103, 2014.

158. Bob Y. Zheng, Hangqi Zhao, Alejandro Manjavacas, Michael McClain, Peter Nordlander & Naomi J. Halas. Distinguishing between plasmon-induced and photoexcited carriers in a device geometry. *Nat Commun*, 6, 7797, 2015.

159. Mark L. Brongersma, Naomi J. Halas, Peter Nordlander. Plasmon-induced hot carrier science and technology. *Nature Nanotechnology*, 10, 25-34, 2015.

160. Ingrid Aggeryd, Åke Olin. Determination of the degree of substitution of sodium carboxymethylcellulose by potentiometric titration and use of the extended henderson-

hasselbalch equation and the simplex method for the evaluation. *Talanta*, 32, 8, 645-649, 1985.

161. Hornbeck, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, 1: 2.1.1-2.1.22, 1992.

162. N.S.V. Capanema, A.A.P. Mansur, A.C. de Jesus, S.M. Carvalho, L.C. de Oliveira, H.S. Mansur, Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications, *Int. J. Biol. Macromol*, 106, 1218-1234, 2017.

163. Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc*, 11, 55-75, 1951.

164. Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Plech, A., Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B*, 110, 15700-15707, 2006.

165. Carla Daruich De Souza, Beatriz Ribeiro Nogueira, Maria Elisa C.M. Rostelato. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction, *Journal of Alloys and Compounds*, 798, 714-740, 2019.

166. Yogita Kumari, Gurmandeep Kaur, Rajesh Kumar, Sachin Kumar Singh, Monica Gulati, Rubiya Khursheed, Ayinkamiye Clarisse, K. Gowthamarajan, V.V.S. Narayana Reddy Karri, Ravichandran Mahalingam, Dipanjoy Ghosh, Ankit Awasthi, Rajan Kumar, Ankit Kumar Yadav, Bhupinder Kapoor, Pankaj Kumar Singh, Kamal Dua, Omji Porwal. Gold nanoparticles: New routes across old boundaries, *Advances in Colloid and Interface Science*, 274, 102037, 2019.

167. Junhui He, Toyoki Kunitake, Aiko Nakao. Facile In Situ Synthesis of Noble Metal Nanoparticles in Porous Cellulose Fibers. *Chemistry of Materials*, 15, 23, 4401-4406, 2013.

168. Poovathinthodiyil, Raveendran, Jie Fu, Scott L. Wallen. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 46, 13940-13941, 2003.

169. Thawatchai Maneerung, Seiichi Tokura, Ratana Rujiravanit. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing, *Carbohydrate Polymers*, 72, 1, 43-51, 2008.
170. Panagiotis Dallas, Virender K. Sharma, Radek Zboril, Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives, *Advances in Colloid and Interface Science*, 166, 1-2, 119-135, 2011.
171. Janaina F. Gomes, Amanda C. Garcia, Eduardo B. Ferreira, Cleiton Pires, Vanessa L. Oliveira, Germano Tremiliosi-Filho Luiz H. S. Gasparotto. New insights into the formation mechanism of Ag, Au and AgAu nanoparticles in aqueous alkaline media: alkoxides from alcohols, aldehydes and ketones as universal reducing agents. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 21683-21693, 2015.
172. Hossam E. Emam, Hanan B. Ahmed. Carboxymethyl cellulose macromolecules as generator of anisotropic nanogold for catalytic performance, *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 999-1009, 2018.
173. Jong-Won Park, Jennifer S. Shumaker-Parry. Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 136, 5, 1907-1921, 2014.
174. Fang Chen, Xiulan Li, Joshua Hihath, Zhifeng Huang, Nongjian Tao. Effect of Anchoring Groups on Single-Molecule Conductance: Comparative Study of Thiol-, Amine-, and Carboxylic-Acid-Terminated Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 49, 15874-15881, 2006.
175. Wolfgang Haiss, Nguyen T. K. Thanh, Jenny Aveyard, David G. Fernig, Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.*, 79, 11, 4215-4221, 2007.
176. Bart Goris, Sara Bals, Wouter Van den Broek, Enrique Carbó-Argibay, Sergio Gómez-Graña, Luis M. Liz-Marzán, Gustaaf Van Tendeloo. Atomic-scale determination of surface facets in gold nanorods. *Nature Materials*, 11, 930-935, 2012.

177. D. A. Muller, L. Fitting Kourkoutis, M. Murfitt, J. H. Song, H. Y. Hwang, J. Silcox, N. Dellby, O. L. Krivanek. Atomic-scale chemical imaging of composition and bonding by aberration-corrected microscopy. *Science*, 319, 1073-1076, 2008.
178. Carbó-Argibay, E., Rodríguez-González, B., Gómez-Graña, S., Guerrero-Martínez, A., Pastoriza-Santos, I., Pérez-Juste, J. and Liz-Marzán, L. M. The Crystalline Structure of Gold Nanorods Revisited: Evidence for Higher-Index Lateral Facets. *Angew. Chem. Int.*, 49, 9397-9400, 2010.
179. Nguyen T. K. Thanh, N. Maclean, S. Mahiddine. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem. Rev.*, 114, 7610-7630, 2014.
180. Tao Yao, Zhihu Sun, Yuanyuan Li, Zhiyun Pan, He Wei, Yi Xie, Masaharu Nomura, Yasuhiro Niwa, Wensheng Yan, Ziyu Wu, Yong Jiang, Qinghua Liu, and Shiqiang Wei. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 22, 7696-7701, 2010.
180. Xiong Liu, Qiu Dai, Lauren Austin, Janelle Coutts, Genevieve Knowles, Jianhua Zou, Hui Chen, Qun Huo. A One-Step Homogeneous Immunoassay for Cancer Biomarker Detection Using Gold Nanoparticle Probes Coupled with Dynamic Light Scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 9, 2780-2782, 2008.
181. Alexandra A. P. Mansur, Herman S. Mansur, Amanda Soriano-Araújo, and Zélia I. P. Lobato. Fluorescent Nanohybrids Based on Quantum Dot–Chitosan–Antibody as Potential Cancer Biomarkers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 14, 11403-11412, 2014.
182. Allen P. Minton. Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences, *Analytical Biochemistry*, 501, 4-22, 2016.
183. Vincenzo Amendola, Moreno Meneghetti. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV–vis Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113, 11, 4277-4285, 2009.
184. Wolfgang Haiss, Nguyen T. K. Thanh, Jenny Aveyard, David G. Fernig. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Analytical Chemistry*, 79, 11, 4215-4221, 2007.



185. K. Vimala, K. Samba Sivudu, Y. Murali Mohan, B. Sreedhar, K. Mohana Raju, Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates: A rational methodology for antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, 75, 3, 463-471, 2009.
186. Vincenzo Amendola, Roberto Pilot, Marco Frasconi, Onofrio M Maragò, Maria Antonia Iatì. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29, 20, 2017.
187. Dorian Hanaor, Marco Michelazzi, Cristina Leonelli, Charles C. Sorrell. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO<sub>2</sub>, *Journal of the European Ceramic Society*, 32, 1, 235-244, 2012.
188. Molly Thomas, Mehraj Ud Din Sheikh, Devendra Ahirwar, Mustri Bano, Farid Khan. Gold nanoparticle and graphene oxide incorporated strontium crosslinked alginate/carboxymethyl cellulose composites for o-nitroaniline reduction and Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 505, 115-129, 2017.
189. Linh T. Cuba-Chiem, Le Huynh, John Ralston, and David A. Beattie. In Situ Particle Film ATR FTIR Spectroscopy of Carboxymethyl Cellulose Adsorption on Talc: Binding Mechanism, pH Effects, and Adsorption Kinetics. *Langmuir*, 24, 15, 8036-8044, 2008.
190. Mansur, A.; Mansur, H.; González, J. Enzyme-Polymers Conjugated to Quantum-Dots for Sensing Applications. *Sensors*, 11, 9951-9972, 2011.
191. Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci*, 2:21-5, 2011.
192. Xiong Liu, Qun Huo. A washing-free and amplification-free one-step homogeneous assay for protein detection using gold nanoparticle probes and dynamic light scattering. *Journal of Immunological Methods*, 349, 1-2, 38-44, 2009.

193. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*, 8, 4, 409-427, 2016.
194. Cheng Du, Zhe Hu, Sen-Dong Hu, Yue-Zhi Lin, Xiaojun Wang, Yi-Jing Li. Development and Application of an Indirect ELISA for the Detection of gp45 Antibodies to Equine Infectious Anemia Virus, *Journal of Equine Veterinary Science*, 62, 76-80, 2018.
195. Jean W. Lee, Viswanath Devanarayan, Yu Chen Barrett, Russell Weiner, John Allinson, Scott Fountain, Stephen Keller, Ira Weinryb, Marie Green, Larry Duan, James A. Rogers, Robert Millham, Peter J. O'Brien, Jeff Sailstad, Masood Khan, Chad RayJohn A. Wagne. Fit-for-Purpose Method Development and Validation for Successful Biomarker Measurement. *Pharm Res*, 23, 312, 2006.
196. O'Connell, M.A., Belanger, B.A., Haaland, P.D., *Chemometr. Intell. Lab.* 20, 97-114, 1993.
197. Cumberland WN, Fong Y, Yu X, Defawe O, Frahm N, De Rosa S. Nonlinear Calibration Model Choice between the Four and Five-Parameter Logistic Models. *J Biopharm Stat*, 25, 5, 972-983, 2015.
198. Azadeh, M., Gorovits, B., Kamerud, J., MacMannis, S., Safavi, A., Sailstad, J., *AAPS J.* 20, 22, 2018.
199. H. S. Mansur, Quantum dots and nanocomposites, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol*, 2, 113-129, 2010.
200. H.S. Mansur, A.A. P. Mansur, A. Soriano-Araújo Z.I.P. Lobato, Beyond biocompatibility: an approach for the synthesis of ZnS quantum dot-chitosan nano-immunoconjugates for cancer diagnosis, *Green Chem*, 17, 1820-1830, 2015.
201. J. Tauc, A. Menth, States in the gap, *J. Non-Cryst. Solids*, 8-10, 569-585, 1972.
202. M. Mall, L. Kumar, Optical studies of Cd<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> Co-doped ZnS nanocrystals, *J. Lumin*, 130, 660-665, 2010.

203. R.K. Rana, L. Zhang, J.C. Yu, Y. Mastai, A. Gedanken, Mesoporous Structures from Supramolecular Assembly of in situ Generated ZnS Nanoparticles. *Langmuir*, 19, 5904-5911, 2003.
204. M.A. Osman, A.A. Othman, W.A. El-Said, A.G. Abd-Elrahim, A.A. Abu-sehly, Thermal annealing and UV irradiation effects on structure, morphology, photoluminescence and optical absorption spectra of EDTA-capped ZnS nanoparticles, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 49, 055304, 2016.
205. R. Chen, D. Li, B. Liu, Z. Peng, G.G. Gurzadyan, O. Xiong, H. Sun, Optical and excitonic properties of crystalline ZnS nanowires: toward efficient ultraviolet emission at room temperature, *Nano Lett.*, 10, 4956-4961, 2010.
206. S. Wageh, Z.S. Ling, X. Xu-Rong, Growth and optical properties of colloidal ZnS nanoparticles, *J. Cryst. Growth.*, 255, 332-337, 2003.
207. W.G. Becker, A.J. Bard, Photoluminescence and photoinduced oxygen adsorption of colloidal zinc sulfide dispersions, *J. Phys. Chem.*, 87, 4888-4893, 1983.
208. D. Denzler, M. Olschewski, K. Sattler, Luminescence studies of localized gap states in colloidal ZnS nanocrystals, *J. Appl. Phys.*, 84, 2841-2845, 1998.
209. G. Xu, S. Zeng, B. Zhang, M.T. Swihart, K.-T. Yong, P.N. Prasad, New Generation Cadmium-Free Quantum Dots for Biophotonics and Nanomedicine, *Chem. Rev.*, 116, 12234-12327, 2016.
210. A.A.P. Mansur, H.S. Mansur, A. Soriano, Z.I.P. Lobato, Fluorescent Nanohybrids Based on Quantum Dot–Chitosan–Antibody as Potential Cancer Biomarkers, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6, 11403-11412, 2014.
211. N.S.V. Capanema, A.A.P. Mansur, A.C. de Jesus, S.M. Carvalho, L.C. de Oliveira, H.S. Mansur, Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, 106, 1218-1234, 2017.
212. M.F. Shukur R. Ithnin, M.F.Z. Kadir, Electrical properties of proton conducting solid biopolymer electrolytes based on starch–chitosan blend, *Ionics*, 20, 977-999, 2014.

213. V. Zeleňák, Z. Vargová, K. Györyová, Correlation of infrared spectra of zinc (II) carboxylates with their structures, *Spectrochim. Acta, Part A*, 66, 262-272, 2007.
214. C.C.R. Sutton, G. da Silva, G.V. Franks, Modeling the IR spectra of aqueous metal carboxylate complexes: Correlation between bonding geometry and stretching mode wavenumber shifts, *Chem. Eur. J.*, 21, 6801-6805, 2015.
215. J.F. Moulder, W.F. Stickle, P.E. Sobol, K.D. Bomben, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*, Perkin-Elmer Corporation, Eden Prairie, Minnesota, USA, 1992.
216. G. Zorn, S.R. Dave, T. Weidner, X. Gao, D.G. Castner, Direct characterization of polymer encapsulated CdSe/CdS/ZnS quantum dots, *Surf. Sci.*, 648, 339-344, 2016.
217. D. Barreca, A. Gasparotto, C. Maragno, E. Tondello, T.R. Spalding, Analysis of nanocrystalline ZnS thin films by XPS, *Surf. Sci. Spectra.*, 9, 51-64, 2002.
218. M.C. López, J.P. Espinos, F. Martín, D. Leinen, J.R. Ramos-Barrado, Growth of ZnS thin films obtained by chemical spray pyrolysis: The influence of precursors, *J. Cryst. Growth*, 285, 66-75, 2008.
219. A.A.P. Mansur, S.M. Carvalho, Z.I.P. Lobato, M. F. Leite, A. S. Cunha Jr., H.S. Mansur, Design and Development of Polysaccharide-Doxorubicin-Peptide Bioconjugates for Dual Synergistic Effects of Integrin-Targeted and Cell-Penetrating Peptides for Cancer Chemotherapy, *Bioconjugate Chem.*, 29, 1973-2000, 2018.
220. Plasmon-enhanced light-matter interactions and applications. *Nature Comput Mater*, 5, 45, 2019.
221. Reji Philip, Panit Chantharasupawong, Huifeng Qian, Rongchao Jin, Jayan Thomas. Evolution of Nonlinear Optical Properties: From Gold Atomic Clusters to Plasmonic nanocrystals. *Nano Lett.*, 12, 4661-4667, 2012.
222. Wei-Ta Chen, Ting-Ting Yang, Yung-Jung Hsu. Au-CdS Core-Shell Nanocrystals with Controllable Casca Thickness and Photoinduced Charge Separation Property. *Chem. Mater.*, 20, 23, 7204-7206, 2008.

223. Tsutomu Hirakawa, Prashant V. Kamat. Charge Separation and Catalytic Activity of Ag@TiO<sub>2</sub> Core-Shell Composite Clusters under UV-Irradiation. *J. AM. CHEM. SOC.*, 127, 3928-3934, 2005.
224. Bárbara Louise L. D. Silva, Bernardo S. Costa, Edwin E. Garcia-Rojas. Binary and Ternary Mixtures of Biopolymers and Water: Viscosity, Refractive Index, and Density. *Int J Thermophys*, 37, 79, 2016.
225. Pino D'Amico, Arrigo Calzolari, Alice Ruini, Alessandra Catellani. New energy with ZnS: novel applications for a standard transparent compound. *Scientific Reports*, 7, 16805, 2017.
226. Xiaosheng Fang, Tianyou Zhai, Ujjal K. Gautam, Liang Li, Limin Wu, Yoshio Bando, Dmitri Golberg. ZnS nanostructures: From synthesis to applications, *Progress in Materials Science*, 56, 2, 175-287, 2011.
227. Benjamin Foerster, Vincent A. Spata, Emily A. Carter, Carsten Sönnichsen, Stephan Link. Plasmon damping depends on the chemical nature of the nanoparticle interface. *Science Advances*, 5, 3, 2019.
228. Silvina Segui, Juana L. Gervasoni, Néstor R. Arista. Plasmon damping in the free-electron gas model of solids, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 408, 217-222, 2017.
229. Amit Jaiswal & Pallab Sanpui & Arun Chattopadhyay, Siddhartha Sankar Ghosh. Investigating Fluorescence Quenching of ZnS Quantum dots by Silver Nanoparticles. *Plasmonics*, 6, 125-132, 2011.
230. Anirban Samanta, Yadong Zhou, Shengli Zou, Hao Yan, Yan Liu. Fluorescence Quenching of Quantum Dots by Gold Nanoparticles: A Potential Long Range Spectroscopic Ruler. *Nano Letters*, 14, 9, 5052-5057, 2014.
231. Grégory Schneider, Gero Decher. Distance-Dependent Fluorescence Quenching on Gold Nanoparticles Ensheathed with Layer-by-Layer Assembled Polyelectrolytes. *Nano Lett.*, 6, 3, 530-536, 2006.

232. M. Haridas, L. N. Tripathi, J. K. Basu. Photoluminescence enhancement and quenching in metal-semiconductor quantum dot hybrid arrays. *Appl. Phys. Lett.*, 98, 063305, 2011.
233. Pierre Viste, Jérôme Plain, Rodolphe Jaffiol, Alexandre Vial, Pierre Michel Adam, Pascal Royer. Enhancement and Quenching Regimes in Metal–Semiconductor Hybrid Optical Nanosources. *ACS Nano*, 4, 2, 759-764, 2010.
234. Ruibin Jiang, Benxia Li, Caihong Fang, Jianfang Wang. Metal/Semiconductor Hybrid Nanostructures for Plasmon-Enhanced Applications. *Adv. Mater.*, 26, 5274-5309, 2014.
235. Thomas Pons, Igor L. Medintz, Kim E. Sapsford, Seiichiro Higashiya, Amy F. Grimes, Doug S. English, Hedi Mattoussi. On the Quenching of Semiconductor Quantum Dot Photoluminescence by Proximal Gold Nanoparticles. *Nano Letters*, 7, 10, 3157-316, 2007.
236. Marc Achermann. Exciton–Plasmon Interactions in Metal–Semiconductor Nanostructures. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1, 19, 2837-2843, 2010.
237. Huaiyong Zhu, Xi Chen, Zhanfeng Zheng, Xuebin Ke, Esa Jaatinen, Jincui Zhao, Cheng Guo, Tengfeng Xie, Dejun Wang. Mechanism of supported gold nanoparticles as photocatalysts under ultraviolet and visible light irradiation. *Chem. Commun.*, 7524-7526, 2009.
238. B. Balamurugana, Toshiro Maruyama. Evidence of an enhanced interband absorption in Au nanoparticles: Size-dependent electronic structure and optical properties. *Applied Physics Letters*, 87, 143105, 2005.
239. Benedikt Westenfelder, Johannes Biskupek, Jannik C. Meyer, Simon Kurasch, Xiaohang Lin, Ferdinand Scholz, Axel Gross, Ute Kaiser. Bottom-up formation of robust gold carbide. *Sci Rep*, 5, 8891, 2015.
240. P H Michael Böttger, Spyros Diplas, Espen Flage-Larsen, Øystein Prytz, Terje G Finstad. Electronic structure of thermoelectric Zn-Sb. *J Phys Condens Matter.*, 23, 26, 265502, 2011.

241. Jucheol Park, Sung Heo, Jae-Gwan Chung, Heekoo Kim, HyungIk Lee, Kihong Kim, Gyeong-Su Park. Bandgap measurement of thin dielectric films using monochromated STEM-EELS, *Ultramicroscopy*, 109, 9, 1183-1188, 2009.
242. Rujie Li, Libin Tang, Qing Zhao, Thuc Hue Ly, Kar Seng Teng, Yao Li, Yanbo Hu, Chang Shu, Shu Ping Lau. In<sub>2</sub>S<sub>3</sub> Quantum Dots: Preparation, Properties and Optoelectronic Application. *Nanoscale Res Lett.*, 14, 161, 2019.
243. Ching-Hwa Ho, Min-Han Lin, Yi-Ping Wang, Ying-Sheng Huang, Synthesis of In<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and Ga<sub>2</sub>S<sub>3</sub> crystals for oxygen sensing and UV photodetection, *Sensors and Actuators A: Physical*, 245, 119-126, 2016.
244. Ching-Hwa Ho, The study of below and above band-edge imperfection states in In<sub>2</sub>S<sub>3</sub> solar energy materials, *Physica B: Condensed Matter*, 407, 15, 3052-3055, 2012.
245. Enrico Della Gaspera, Joseph Griggs, Taimur Ahmed, Sumeet Walia, Edwin L. H. Mayes, Arrigo Calzolari, Alessandra Catellani, Joel van Embden. Augmented band gap tunability in indium-doped zinc sulfide nanocrystals. *Nanoscale*, 11, 3154, 2019.
246. Yanxia Liu, Hongliang Zhang, Xiuyun An, Caitian Gao, Zhenxing Zhang, Jinyuan Zhou, Ming Zhou, Erqing Xie. Effect of Al doping on the visible photoluminescence of ZnO nanofibers, *Journal of Alloys and Compounds*, 506, 2, 772-776, 2010.
247. X. D. Pi, R. Gresback, R. W. Liptak, S. A. Campbell, U. Kortshagen, Doping efficiency, dopant location, and oxidation of Si nanocrystals. *Appl. Phys. Lett.*, 92, 123102, 2008.
248. D. Mocatta, G. Cohen, J. Schattner, O. Millo, E. Rabani, U. Banin, Heavily Doped Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots. *Science*, 332, 77-81, 2011.