

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS PGMAT**

Jelver Alexander Sierra Restrepo

**SISTEMAS BIOMIMÉTICOS NA SÍNTESE DE  
NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA APLICAÇÕES  
BIOMÉDICAS E BIOTECNOLÓGICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais  
Orientador: Prof. Dr. André Avelino Pasa  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sierra Restrepo, Jelver Alexander

Sistemas biomiméticos na síntese de nanopartículas de ouro para aplicações biomédicas/ biotecnológicas / Jelver Alexander Sierra Restrepo ; orientador, André Avelino Pasa ; coorientador, Tânia Beatriz Creczynski Pasa. - Florianópolis, SC, 2015.

114 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

Inclui referências

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. Nanopartículas de ouro . 3. Química verde. 4. Hesperetina. 5. Compósito Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Au. I. Pasa, André Avelino . II. Creczynski Pasa, Tânia Beatriz. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. IV. Título.

Jelver Alexander Sierra Restrepo

**SISTEMAS BIOMIMÉTICOS NA SÍNTESE DE  
NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA APLICAÇÕES  
BIOMÉDICAS E BIOTECNOLÓGICAS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de  
“Doutor em Ciência e Engenharia dos Materiais”, e aprovada em sua  
forma final pelo Programa

Florianópolis, 30 de Março de 2015.

---

Prof. Dr. Antonio Pedro Novaes de Oliveira  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. André Avelino Pasa  
Orientador  
Universidade Federal de  
Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Beatriz  
Creczynski-Pasa  
Co-orientadora  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

---

Prof., Dr. Alexandre Lago  
Universidade Federal de  
Santa Catarina

---

Dr.<sup>a</sup> Cristiani Campos  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

---

Prof. Dr. Giovanni Zangari  
University of Virginia,  
Charlottesville VA, USA

---

Prof. Dr. Guilherme Mariz de  
Oliveira Barra  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

---

Prof. Dr. Ricardo Faccio  
Universidad de la República,  
Uruguay



Este trabalho é dedicado a minha família



## AGRADECIMENTOS

A materialização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio, o estímulo e o comprometimento da minha família e de muitos amigos e colegas dentro e fora do laboratório. Sou muito grato aos meus orientadores, professor André Avelino Pasa e professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pela confiança depositada em mim e pelo convite para fazer parte dos grupos de pesquisa que lideram. Agradeço imensamente a liberdade que eles me deram para desenvolver a pesquisa do meu próprio jeito.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) pela oportunidade de treinamento e utilização do Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Ao professor Dante Franceschini da UFF pela ajuda com as medidas de XPS.

Aos alunos de iniciação científica Caio Vanoni, Jocelane Zoldan e Maria Fernanda Burigo pelo trabalho.

À família GEIMM, Maurícia Fritzen Garcia, Evelyn Winter, Daiane Rosolen, Ariana Centa, Tatiane Cristofolini, Julia Cisilotto, Leônidas de Mello Jr, Débora Mocellin, Najla Saleh, Ícaro Andrade, Débora Joppi, Vera Werlang, Jefferson Araújo Gonçalves, Leontina Manuel, pela acolhida e as risadas.

Aos recém professores Fabiola Monteiro e Frederico Pittella pelas discussões científicas.

Às colegas do turno da noite Gabriela Souza, Milene Dalmina, Carine da Pizzol, Adny Silva, Laura Sartori, Iara Kretzer. Não teria sido tão divertido sem vocês.

Aos meus grandes amigos, Rodrigo Garcez, Tatiane de Andrade Maranhão e Vânia Lima pela acolhida e parceria nos momentos mais difíceis e nos que pensei em desistir. Vocês tornaram a cidade em um novo lar.

À Luana Benetti pela ajuda com o XRD.

Aos meus amigos *nerds* pela válvula de escape das sextas-feiras, Rafael Szpoganicz (Aylash) Daniel Stähelin, Rodrigo Schiavon (Rowl), Guilherme Peres, Fernando Ribas (Kbum) e Gustavo Flores.

Aos amigos aleatórios de lugares aleatórios, Diogo Chagas, Murilo Souza (Seven Tron), Lucas Brandão, Debora Zamarioli, André Pavanati, Diego Aguiar, Stefania Latini, Nick D'Agostino, Kelly Vinente, também presentes nas conquistas e dificuldades.

À Katalina Muñoz e Julian Londoño, os meus bons amigos desde a faculdade que sempre acreditaram na minha capacidade de trabalho e me acompanham até hoje.

À minha mãe Angela Restrepo, à minha avó Eligia Arboleda e à minha pequena família Luis Fernando, Fannier, Johan, Valeria, Camilo, Susana, Mariana, e ao Rob por entender a minha ausência, pelo seu apoio e amor incondicionais.

Aos amigos que não enumerei aqui cometendo uma grande injustiça, mas que fugiram da minha cabeça nos dias da escrita.

*Hic Sunt Dracones*



## RESUMO

Esta tese descreve o desenvolvimento de duas rotas sintéticas rápidas e eficazes para produção de nanoestruturas de ouro: nanopartículas de ouro estabilizadas com a hesperetina (Ht), um flavonoide de cítricos, conhecido por seus efeitos anti-inflamatório, anti-hipertensivo e antiaterogênico; e um compósito de nanopartículas de óxido de ferro@ouro ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$ ). As nanoestruturas foram facilmente preparadas sob condições brandas, seguindo os princípios de química verde. Na primeira parte da tese, apresenta-se o desenvolvimento do método de síntese das nanopartículas de ouro com Ht (HtAuNP), realizada à temperatura ambiente e em uma única etapa. As HtAuNP foram então caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Espectrometria de Emissão de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS), Difração de Raios-X e Espectrofotometria UV-Vis. Além disso, realizou-se um estudo, usando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) para avaliação da interação  $\text{Au}^{3+}:\text{Ht}$ . Assim, observou-se que a redução do ácido cloroáurico em condições alcalinas, e na presença de Ht, gerou suspensões concentradas ( $4\text{-}7\text{ mmolL}^{-1}$ ) e uniformes de HtAuNP de forma esférica, medindo aproximadamente 15 nm e com distribuição estreita de tamanho ( $<15\%$ ). As HtAuNP, armazenadas entre  $2\text{-}8^\circ\text{C}$ , mostraram-se estáveis pelo período de 12 meses, sem alteração de forma. Os cálculos teóricos sugeriram uma reação inicial de complexação entre a Ht e o ouro, com a posterior transferência de elétrons da Ht ao ouro, resultando na redução dos íons  $\text{Au}^{3+}$  para  $\text{Au}^0$ . Na segunda parte da tese, o conhecimento da reação de redução do  $\text{HAuCl}_4$  pela Ht permitiu o desenvolvimento do compósito  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  com comportamentos magnéticos e plasmônicos. Primeiramente, utilizou-se o método de co-precipitação de cloretos de ferro (II) e (III), para síntese de nanopartículas de óxido de ferro ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) com medida aproximada de 9 nm. Na presença de  $\text{HAuCl}_4$ , as nanopartículas sintetizadas foram então dispersas por irradiação ultrassônica para adsorção dos íons de  $\text{AuCl}_4^-$  em sua superfície. Posteriormente, o ouro foi reduzido em ambiente alcalino, acrescido de Ht e com adição lenta do modificador de pH. O compósito  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  foi caracterizado usando os mesmos métodos utilizados para as HtAuNP. O  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  apresentou uma banda SPR forte em torno de 580 nm, e sua morfologia foi consistente com uma mistura de nanopartículas de óxido de ferro decoradas com nanopartículas de ouro,

juntamente com estruturas do tipo *core-shell*, formando agregados discretos com tamanho aproximado de 55 nm. Essas nanopartículas têm potencial de utilização em uma ampla gama de aplicações que demandem ambas as propriedades, magnética e óptica.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de ouro, compósito, óxido de ferro, química verde, hesperetina, DFT.

## ABSTRACT

This dissertation reports two synthesis procedures with a reduced use of toxic chemicals and solvents for gold nanoparticles and a composite of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  nanoparticles, according to the principles of green chemistry, methods that are highly sought after nanoparticles production, particularly for use in biomedical/biotechnological applications. In the first part, a fast single-pot method at room temperature to synthesize AuNP, using hesperetin (Ht), a flavonoid from citrus fruits known for its anti-inflammatory, antihypertensive and antiatherogenic effects is reported. Experimentally, the HtAuNP and  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  were characterized using high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), dynamic light scattering (DLS), X-ray photoelectron spectrometry (XPS) and UV-Vis spectrophotometry. Also, a theoretical study to assess the interaction of hesperetin with  $\text{Au}^{3+}$  ions was also performed by quantum chemical calculation using density functional theory (DFT). The reduction of chloroauric acid in alkaline conditions in presence of hesperetin yielded concentrated suspensions of uniform 15 nm spherical HtAuNP with a narrow size distribution (<15%) that remain stable for at least a year at 2-8 °C, without changing their shape over time. Our theoretical calculations suggest the electron transfer from hesperetin to gold as a consequence of complexation, reducing  $\text{Au}^{3+}$  ions to  $\text{Au}^0$ . In the second part, iron oxide-gold nanoparticles displaying both magnetic and plasmonic behaviors were synthesized. Here, iron oxide nanoparticles (NPs) prepared by coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) chlorides. These bare nanoparticles ~ 9 nm were then dispersed in the presence of  $\text{HAuCl}_4$  using ultrasonic irradiation to adsorb  $\text{AuCl}_4^-$  ions on their surface. Gold was subsequently reduced in an alkaline environment by adding the flavonoid hesperetin with the further drop-addition of pH modifier within a frame time of 10 minutes.  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  composite synthesized under the aforementioned conditions suggests morphology consistent with bare magnetite decorated with gold nanoparticles along with core-shell magnetite-gold particles, forming discrete aggregates (55 nm by DLS), displaying a strong SPR band around 580 nm. As prepared these nanoparticles could be used for a wide range of applications taking advantage of both magnetic and optical properties.

**Keywords:** Green chemistry, gold nanoparticles, hesperetin, density functional theory (DFT).



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais dos flavonoides usados na síntese de nanopartículas de ouro: hesperetina, hesperidina, diosmina, rutina naringenina e quercetina .....	40
Figura 2. Transformações estruturais da hesperetina até hesperetina chalcona na forma aniônica em solução alcalina.....	42
Figura 3. Mecanismos possíveis de estabilização das nanopartículas de ouro a) estabilização por repulsões eletrostáticas e b) por impedimento estérico.....	51
Figura 4. Espectros de absorção UV-Vis típicos de nanopartículas de ouro produzidas por redução de $\text{HAuCl}_4$ com flavonoides de cítricos..	61
Figura 5. Impacto da ordem de adição dos reagentes na síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas por hesperetina (HtAuNP). .....	63
Figura 6. Espectros no UV-Vis das HtAuNP produzidas em diferentes condições e análise de distribuição de tamanho. ....	65
Figura 7. Cinética de formação das HtAuNP e reprodutibilidade do método de síntese.....	67
Figura 8 Análise do tamanho, morfologia e carga das HtAuNP. ....	69
Figura 9. Efeito da diluição e centrifugação na estabilidade e armazenamento das HtAuNP.....	70
Figura 10. Espectros de fotoemissão total e relativo ao orbital Au 4f de filmes de HtAuNP depositados em substrato de silício.....	71
Figura 11. Espectro de fotoemissão relativo ao orbital C 1s de filmes hesperetina e HtAuNP depositados em substrato de silício.....	72
Figura 12. Espectro de fotoemissão relativo ao orbital O 1s de filmes hesperetina e HtAuNP depositados em substrato de silício.....	73
Figura 13. Estruturas geométricas finais otimizadas da hesperetina. ....	74
Figura 14. Estruturas dos complexos $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$ 1:1 (1) e (2), antes (painel superior) e depois (painel inferior) da otimização.....	77

Figura 15. Estruturas geométricas finais dos complexos $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$ nas proporções a) 2:1 e b) 1:2. ....	78
Figura 16. Espectros ópticos e mapas de diferença de densidade eletrônica (EDDM) entre o estado fundamental e os estados excitados mais intensos "f" para os complexo $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$ nas proporções a) 1:2 e b) 2:1. ....	79
Figura 17. Estruturas geométricas finais dos complexos $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$ na proporção 1:2. Em coordenação quádrupla (3) e dupla (4). ....	81
Figura 18. Espectros ópticos e mapas de diferença de densidade eletrônica (EDDM) entre o estado fundamental e os estados excitados mais intensos "f" para os complexo $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$ na proporção 1:2 a) caso (3) e b) caso (4). ....	81
Figura 19. Potencial zeta de nanopartículas de óxido de ferro. ....	83
Figura 20. Difração de raios X em ângulo rasante das nanopartículas de óxido de ferro $\text{Fe}_m\text{O}_m$ ....	84
Figura 21. Espectros de fotoemissão de filmes de nanopartículas de óxido ferro ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) usado na síntese do compósito óxido de ferro@ouro. ....	85
Figura 22. Micrografia TEM e análise de distribuição de tamanho de nanopartículas de óxido ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). ....	86
Figura 23. Espectros UV-Vis de nanopartículas de óxido de ferro, de óxido de ferro/Au e de óxido de ferro/Au/Ht e distribuição de tamanho por DLS. ....	87
Figura 24. Difração de raios X em ângulo rasante do compósito $\text{Fe}_m\text{O}_m@\text{Au}$ . ....	88
Figura 25. Espectros de fotoemissão de filmes do compósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{Au}/\text{Ht}$ purificado e depositado em substrato de silício. ....	89
Figura 26. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do compósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{Au}/\text{Ht}$ ....	91

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Os 12 princípios da química verde e da engenharia verde podem ser adequados à nanotecnologia.....	27
Tabela 2. Síntese extracelular de nanopartículas de ouro mediada por plantas.....	47
Tabela 3. Rendimento da reação de redução do $\text{HAuCl}_4$ pelo flavonoide hesperetina medido por FAAS.....	64
Tabela 4. Energias HOMO-LUMO, diferença de energia (Gap), ângulo diedro, energias de formação e as cargas Mülliken para o átomo de ouro.....	75
Tabela 5. Propriedades ópticas do complexo estável Au:Ht (2) em proporção 1:1.....	77



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\text{AuCl}_4^-$	: Íon cloroaurato
$\text{AuCl}_4^-/\text{Au}^0$	: Par de íons cloroaurato e ouro metálico
mV	: milivolt
AuNP	: Nanopartículas de ouro
$\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{AuNP}$	: Compósito de nanopartículas de maguemita e ouro
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	: Compósito de nanopartículas de magnetita e ouro
DLS	: Espalhamento de luz dinâmico. Do inglês, Dynamic Light Scattering
UV-Vis	: Ultravioleta visível
AC	: Antes de Cristo
0D	: Dimensionalidade zero
nm	: Nanômetro
DMA	: Analisador de mobilidade diferencial
$\text{Au}^0$	: Ouro metálico
$\text{HAuCl}_4$	: Ácido Cloro Áurico
$^\circ\text{C}$	: Grau centígrado
NP	: Nanopartícula
$\text{SiO}_2$	: Sílica
$\text{TiO}_2$	: Dióxido de titânio
$\text{AlO}_3$	: Alumina
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	: Magnetita
$\text{NaBH}_4$	: Borohidreto de sódio
IgG	: Imunoglobulina G
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	: Maguemita
EPR	: Efeito de permeabilidade e retenção aumentados
dG	: Energia Livre de Gibbs
$d\sigma$	: Variação de área superficial
$\gamma$	: Tensão superficial interfacial.
PEG-SH	: Tiol do Polietileno glicol
Au-S	: Ligação covalente ouro enxofre
$\text{M}\Omega\text{.cm}$	: Mega ohms por centímetro
HCl	: Ácido clorídrico
$\text{HNO}_3$	: Ácido nítrico
$\text{N}_2$	: Nitrogênio molecular
rpm	: Revoluções por minuto
g	: Força centrífuga em gravidades
FAAS	: Espectroscopia de absorção atômica de chama
EUA	: Estados Unidos da América
$\text{FeCl}_3$	: Óxido de ferro (III)

FeCl <sub>2</sub>	: Óxido de ferro (II)
NH <sub>4</sub> OH	: Hidróxido de amônio
MGOe	: Megagauss-oersteds
He-Ne	: Hélio-Neônio
SD	: Desvio padrão
TEM	: Microscopia eletrônica de transmissão
SAED	: Difração de área selecionada
KeV	: Kilo elétron-volt
LDRX	: Laboratório de Difração de Raios-X
UFSC	: Universidade Federal de Santa Catarina
CuK $\alpha$	: Banda de radiação K $\alpha$ do átomo de cobre
AlK $\alpha$	: Banda de radiação K $\alpha$ do átomo de alumínio
$\lambda$	: Comprimento de onda
XPS	: Espectroscopia de emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X
mbar	: milibar
GL30	: Curva 70%Gauss- 30% Lorentz
HR-CS FAAS	: Espectrômetro de absorção atômica com atomização em chama com fonte contínua e de alta resolução
mm	: milímetro
LOD	: Limite de detecção
LOQ	: Limite de quantificação
mg	: miligrama
DFT	: Teoria funcional de densidade
a.u.	: Unidades Arbitrárias
PCM	: Modelo Contínuo Polarizável
TD-DFT	: Teoria funcional de densidade dependente do tempo
SPR	: Banda de plasmons de superfície
SHE	: Eletrodo padrão de hidrogênio
Ep	: Potencial de oxidação
NaOH	: Hidróxido de sódio
KOH	: Hidróxido de potássio
pH	: Potencial de hidrogênio
$\lambda_{\text{máx}}$	: Comprimento de onda máximo
Ht	: Hesperetina
Au:Ht	: Complexo Ouro:Hesperetina
FWHM	: Largura de pico a meia altura

HtAuNP	: Nanopartículas de ouro estabilizadas com hesperetina
A <sub>522</sub>	: Absorbância no comprimento de onda 522 nm
A <sub>650</sub>	: Absorbância no comprimento de onda 650 nm
vol	: Diâmetro ponderado em Volume
NaCl	: Cloreto de sódio
Hc	: Hesperetina chalcona
Hc <sup>-4</sup>	: Hesperetina chalcona, forma aniônica
Ht <sup>-3</sup>	: Hesperetina fenolato, forma aniônica
HOMO	: Orbital Molecular ocupado mais alto
LUMO	: Orbital Molecular ocupado mais baixo
Å	: Angstrom
LMCT	: Transferência de carga ligante-metal simples e mista
ILCT	: Transferência de carga intra-ligante
MLCT	: Transferência de carga metal-ligante
EDDM	: Mapas de diferença de densidade eletrônica
LSPR	: Ressonância localizada de plasmons de superfície
PZC	: Ponto de carga zero
KNO <sub>3</sub>	: Nitrato de potássio
ICSD	: Inorganic Crystal Structure Database
Fcc	: Face de corpo centrado
SG	: Grupo espacial
FFT	: Transformada rápida de Fourier
EROS	: Espécies reativas do oxigênio



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Nanopartículas de ouro .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2</b>	<b>Métodos de síntese.....</b>	<b>32</b>
2.2.1	<i>Top-down</i> .....	32
2.2.2	Métodos térmicos baseados em aerossóis .....	34
2.2.3	<i>Bottom-up</i> .....	36
<b>2.3</b>	<b><i>Sistemas biomiméticos</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>2.4</b>	<b>Aplicações na área biomédica/biotecnológica .....</b>	<b>48</b>
<b>2.5</b>	<b>Estabilidade .....</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>DETALHES EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2</b>	<b>Síntese das nanopartículas de ouro .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3</b>	<b>Síntese das nanopartículas de óxido de ferro .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4</b>	<b>Síntese do compósito de óxido de ferro/ouro .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5</b>	<b><i>Métodos de caracterização</i>.....</b>	<b>55</b>
3.5.1	<i>Espectrofotometria UV-Visível</i> .....	55
3.5.2	<i>Análises de tamanho de partícula</i> .....	55
3.5.3	<i>Medidas de potencial zeta</i> .....	56
3.5.4	Microscopia eletrônica de transmissão .....	56
3.5.5	<i>Difração de raios X</i> .....	56
3.5.6	Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS).....	57
3.5.7	Espectroscopia de absorção atômica de chama FAAS .....	57
3.5.8	<i>Estudos computacionais</i> .....	58
<b>3.6</b>	<b>Estudos de estabilidade.....</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Nanopartículas de ouro .....</b>	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Simulações computacionais.....</b>	<b>73</b>
4.2.1	Molécula hesperetina isolada .....	74
4.2.2	Moléculas de Hesperetina carregadas .....	75
4.2.3	Interações no sistema $Au^{+3}:Ht^{-3}$ .....	76
4.2.4	Interações no sistema $Au^{+3}:Hc^{-4}$ .....	80
4.2.5	Correlação entre os cálculos de DFT e resultados experimentais.....	81
<b>4.3</b>	<b>Compósito de nanopartículas magnético-plasmônicas mediada pelo flavonoide hesperetina .....</b>	<b>82</b>
4.3.1	Caraterização das nanopartículas de óxido de ferro $Fe_mO_n$ .....	82

4.3.2 Caraterização dos compósitos magneto-plasmônicos	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @Au/Ht.....	86
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>6 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da última década, a nanotecnologia deixou de ser uma especialidade emergente de grandes promessas, restritas à academia, para se transformar em uma das principais linhas temáticas de pesquisa do mundo inteiro. Espera-se que a nanotecnologia gere um grande impacto econômico, social e ambiental com aplicações abrangendo disciplinas como medicina, física, química, biologia e ciência dos materiais, entre outras.

No caso de materiais nanoestruturados, e particularmente de nanopartículas, dada a ampla faixa de aplicações possíveis, a produção mundial aumenta concomitantemente com os investimentos em nanotecnologia. Foi previsto que a produção anual de nanopartículas desde o ano de 2010 oscilaria entre  $10^4$ - $10^5$  toneladas. Além disso, estimou-se que as transações de produtos baseados em nanotecnologia alcançarão um trilhão de dólares em 2015 (Kumar *et al.*, 2012). É por essas razões que, devido à vasta aplicabilidade e distribuição prevista das nanopartículas no comércio, deve-se pensar em critérios especiais nas fases de desenho e produção para minimizar os riscos, como a quantidade de resíduos, requisitos essenciais durante a transição de um produto em desenvolvimento com esta tecnologia para a respectiva comercialização.

Dos nanomateriais espera-se que i) apresentem novas propriedades dependentes do tamanho (tanto favoráveis quanto desfavoráveis), intermediárias entre o nível molecular e o particulado; ii) incorporem uma ampla faixa de composições (orgânicas, inorgânicas e híbridas) e iii) apresentem um alto grau de funcionalização na superfície. Isso as habilitaria para inúmeras aplicações como catalisadores, dispositivos magnéticos, compósitos poliméricos, sensores, tintas, produtos cosméticos e farmacêuticos, revestimentos e adesivos. Assim, a própria natureza dos materiais é razão suficiente para a implementação de metodologias de menor impacto ambiental no desenvolvimento e aplicação desta relativamente nova tecnologia.

Durante os últimos 20 anos, estima-se que pelo menos um terço da população mundial teve o nível de vida melhorado, e conseqüentemente, ocorreram mudanças nos perfis de consumo, aproximando-nos a um panorama de escassez de recursos, considerando que a estimativa de crescimento da população nos próximos 30-40 anos, ultrapassará dois bilhões de pessoas. Tal aumento populacional acarretará um incremento no uso de água, energia e matérias primas,

justificando-se o desenvolvimento sustentável como o principal desafio do século 21 (Apelian, 2012).

Em geral, na produção de produtos nanotecnológicos empregam-se reagentes perigosos, com um alto consumo de energia, nem sempre os rendimentos são altos e são necessárias inúmeras etapas de purificação difíceis, que geram grandes quantidades de resíduos. Em 1998, Anastas e Warner (Anastas e Warner, 1998) esboçaram uma série de princípios desenhados para reduzir o uso e a geração de substâncias perigosas nos processos de desenvolvimento, manufatura e uso de produtos químicos, a denominada Química Verde. Estes pesquisadores apresentaram, basicamente, uma série de estratégias na pesquisa visando o desenvolvimento de processos de alta precisão e baixa geração de resíduos, aspectos cruciais para a viabilidade comercial de um produto.

A química verde oferece múltiplas oportunidades para o desenvolvimento de processos e materiais em tamanho nanométrico. A correta adequação dos princípios da química verde poderia, entre outros aspectos, melhorar a percepção pública sobre a nanotecnologia, já que esta aproximação pode ser facilmente explicada e usada para mostrar uma atitude responsável no desenvolvimento tecnológico. Em 2009, Dalh e colaboradores adaptaram esses princípios na publicação “Toward a Greener Nanosynthesis”, oportunidade em que os autores denominaram de nanociência verde (Dahl, Maddux e Hutchison, 2007) (Tabela 1). Contudo, neste trabalho, o termo nanotecnologia verde parece mais apropriado.

#### *Desenho e planejamento de nanomateriais e métodos de produção e a relação com os princípios da química verde.*

A seguir, descreve-se mais detalhadamente as relações entre os princípios da química verde e a adequação ao que foi denominado como nanotecnologia verde e que são apresentados na Tabela 1. Primeiramente, o princípio de *diminuição de resíduos* agrupa três princípios chave da química verde: prevenção do desperdício (P1), usar solventes e auxiliares mais seguros (P5) e evitar derivatizações desnecessárias (P8). Adequar esses princípios a nanotecnologia, visaria eliminar purificações que utilizem grandes quantidades de solvente e em seu lugar desenvolver métodos de nanosíntese seletivos, que gerem partículas de maior pureza e monodispersidade, ou desenvolver melhores métodos de purificação, como a nanofiltração, para minimizar o uso de solvente. Adicionalmente, poderia-se usar aproximações *bottom-up* mais eficientes, com um número reduzido de passos (Dahl, Maddux e Hutchison, 2007).

**Tabela 1. Os 12 princípios da química verde e da engenharia verde podem ser adequados à nanotecnologia.**

	Princípios da química verde	Princípios da engenharia verde	Planejamento de nanomateriais e métodos de produção
P1	Prevenção do desperdício	É melhor prevenir resíduos, que tratá-los ou limpá-los, depois de serem gerados.	Projetar para diminuir resíduos (P1, P5, P8).
P2	Economia de átomos	Diversidade de materiais em produtos com multicomponentes deve ser minimizada, para promover fácil desmontagem e retenção de valor.	Projetar processos mais seguros (P3, P5, P7, P12).
P3	Síntese química com menos riscos	Operações de separação e purificação devem ser planejadas minimizando o consumo de energia e o uso de materiais.	Projetar nanomateriais mais seguros (P4, P12)
P4	Desenho de produtos químicos mais seguros	Projetistas precisam assegurar, tanto quanto possível, que todo o material e energia utilizados ou produzidos não gerem riscos ambientais.	Projetar materiais para menor impacto ambiental (P7, P10)
P5	Solventes e auxiliares mais seguros	Produtos, processos e sistemas devem focar mais no resultado (output) desejado, e não apenas no insumo (input), no que diz respeito ao uso de energia e materiais.	Projetar para o uso eficiente de materiais (P2, P5, P9, P11)
P6	Busca pela eficiência energética	Produtos, processos e sistemas devem ser planejados para maximizar a eficiência no uso de materiais, energia, espaço e tempo.	Projetar para o uso eficiente da energia (P6, P9, P11)
P7	Uso de fontes renováveis de matéria prima	Insumos de materiais e energia devem ser renováveis e não exauríveis.	
P8	Evitar derivatizações desnecessárias	Projetar soluções com atributos ou capacidades desnecessários deve ser considerado uma falha de projeto.	
P9	Uso de catalisadores	A complexidade do projeto deve ser vista como um investimento, quando diz respeito a decisões sobre opções de reciclagem, reutilização ou descarte benéfico.	
P10	Desenho para degradação e Desenho para vida útil	O objetivo de um projeto deve ter como meta a durabilidade, mas não de imortalidade.	
P11	Análise em tempo real e controle do processo para evitar poluição	O projeto de produtos, processos e sistemas deve incluir integração e interconexão, em relação à avaliação de fluxos de energia e materiais.	
P12	Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes	Produtos, processos e sistemas devem ser projetados visando o desempenho também no término de seu ciclo de vida útil, "afterlife"	

**Adaptado de (Dahl, Maddux e Hutchison, 2007). Os princípios estão numerados e são comparados entre si quando possível e finalmente condensados em propostas para aplicação em nanotecnologia.**

*O desenho de processos mais seguros* agruparia os princípios de síntese química com menos riscos (P3), o uso de solventes/ e auxiliares mais seguros (P5), a utilização de fontes renováveis de matéria prima (P7) e de uma química intrinsecamente segura para prevenir acidentes (P12). Esses princípios sugerem o uso de métodos de síntese avançados que usem reagentes e solventes mais benignos dos que já foram usados

nas fases iniciais do descobrimento (desenho e desenvolvimento) do material, além de matérias primas derivadas de fontes renováveis, quando possível, identificando substitutos para reagentes pirofóricos ou altamente tóxicos (Dahl, Maddux e Hutchison, 2007).

O princípio de *projetar nanomateriais mais seguros* está relacionado com os princípios do desenho de substâncias químicas mais seguras (P4) e química intrinsecamente segura para prevenir acidentes (P12) da química verde. Na prática, esses princípios seriam adaptados à nanotecnologia, determinando o impacto do tamanho, da área superficial e da funcionalização das superfícies das nanopartículas. Assim, esse conhecimento adquirido pode ser usado para desenhar estruturas mais seguras e com propriedades físicas desejadas, evitando incorporar elementos tóxicos nos produtos (Dahl, Maddux e Hutchison, 2007).

O *impacto ambiental minimizado*, como sugerido nos princípios de uso de fontes renováveis de matéria prima (P7) e projetar para degradação (P10), entende-se como estudar a degradação do material e a sua disposição final no ambiente. O objetivo seria, desenvolver produtos, cujos materiais fossem degradados em subprodutos inócuos em um intervalo de tempo razoável. Na síntese de nanopartículas, uma aproximação apropriada seria evitar incorporar elementos perigosos desde o começo. Uma estratégia interessante inclui a utilização de métodos ou sistemas biomiméticos em meios aquosos nos quais as partículas são formadas e estabilizadas com a ajuda de moléculas inócuas ou intrinsecamente benignas para o ambiente (Dahl, Maddux e Hutchison, 2007).

Adequar os princípios de procura pela economia de átomos (P2), uso de solventes e auxiliares mais seguros (P5), uso de catalisadores (P9) e monitoramento em tempo real e controle para evitar poluição (P11) cimentaria as bases de projetar os processos para o *uso eficiente dos materiais*. O caminho a seguir é o de desenvolver estratégias sintéticas que sejam compactas e otimizem a incorporação de matérias primas nos produtos ao usar a aproximação “bottom-up.” Além disso, deve-se optar pelo uso de catalisadores e meios de reação alternativos para aumentar a seletividade das reações e desenvolver métodos de análise em tempo real que possam guiar o processo quando a síntese for complexa (Dahl, Maddux e Hutchison, 2007).

Finalmente, os princípios de *desenho para eficiência energética* (P6), uso de catalisadores (P9) e o controle do processo para evitar a poluição (P11) poderiam ser resumidos na execução de projetos desenhados para o uso eficiente da energia, a fim de desenvolver rotas sintéticas a temperatura ambiente, ao invés de temperaturas elevadas.

Adicionalmente a estes princípios, o monitoramento em tempo real do processo permitiria maximizar a eficiência e minimizar o uso de energia (Dahl, Maddux e Hutchison, 2007).

Enfim, a química verde pode ter um papel determinante no desenvolvimento de produtos nanotecnológicos, com o máximo de benefícios para a sociedade e o ambiente.

Tendo em mente que um dos princípios da engenharia é o do desenho sob restrições, neste trabalho de doutorado o principal desafio e aporte ao conhecimento foi adaptar os princípios da química verde, particularmente na produção de nanopartículas de ouro e óxidos de ferro e um compósito contendo os dois materiais.

As moléculas orgânicas estudadas no decorrer deste trabalho de doutorado pertencem a família dos flavonoides. Em plantas, os flavonoides e ácidos fenólicos funcionam como protetores frente ao estresse oxidativo, sequestrando as espécies reativas do oxigênio que são subprodutos do sistema de transporte de elétrons na fotossíntese. Devido ao fato de apresentarem potenciais redox baixos ( $230 < E_p < 750$  mV), os flavonoides são termodinamicamente capazes de reduzir espécies altamente oxidantes com potenciais redox entre 2130–1000 mV, como a maioria das espécies reativas de oxigênio, e esta propriedade também valeria para o par  $AuCl_4^-/Au^0$ , cujo potencial redox é 1002 mV. Além disso, são capazes de quelar metais de transição (Pietta, 2000) e, por possuírem baixa toxicidade, são excelentes candidatos para reduzir o íon cloroaurato na síntese biomimética de nanopartículas de ouro.

Avaliou-se as variáveis relativas ao controle da morfologia e homogeneidade do cristal, bem como a composição da superfície dos sistemas nanoestruturados, proporcionando uma potencial aplicação na área biomédica. Contribuiu-se com o desenvolvimento e otimização de métodos de síntese simples de AuNP e  $Fe_2O_3@AuNP$  em meio aquoso, eficientes, rápidos e ambientalmente sustentáveis. A redução do ouro e a estabilização das nanopartículas foram realizadas utilizando o mesmo agente.

Este trabalho está dividido em três partes. A primeira reúne a revisão da literatura acerca dos temas de síntese de nanopartículas de ouro e compósitos de óxido de ferro/ouro e estabilidade coloidal, assim como as aplicações na área biomédica e a síntese biomimética como métodos de síntese alternativos. Na segunda parte, intitulada Detalhes Experimentais, encontra-se a descrição pormenorizada dos procedimentos de síntese e caracterização das nanoestruturas produzidas e na terceira parte os Resultados e Discussão, que soma duas seções. O objetivo principal da primeira parte é mostrar que é possível

sintetizar nanopartículas de ouro estáveis usando soluções a concentrações superiores as encontradas na literatura (4-7 mmolL<sup>-1</sup>), sugerindo partes do mecanismo de redução e estabilização em solução por combinação de técnicas de DLS, UV-Vis e modelagem molecular. A outra seção inclui os resultados da obtenção e do compósito Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@AuNP bem como a caracterização físico-química.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Esta primeira seção compila alguns conceitos e resultados de pesquisa apresentados na literatura relativos ao tema abordado nesta tese. Inicia-se com métodos de síntese de nanopartículas de ouro e compósitos de óxido de ferro/ouro e as aplicações das nanoestruturas na área biomédica. Ainda, é abordada a síntese biomimética usando produtos derivados de organismos vivos como alternativa ou possibilidade na síntese destes materiais.

### 2.1 Nanopartículas de ouro

Em termos físicos, uma nanopartícula é considerada uma nanoestrutura amorfa ou cristalina confinadas nas 3 dimensões no intervalo 10-100 nm ou também denominadas 0-D (Zhang *et al.*, 2009). Em geral, apresentam uma dispersidade relativamente grande no tamanho ( $\geq 15\%$ ), quando comparadas com outros tipos de nanoestruturas de menor tamanho como os *nanoclusters* (1-10 nm,  $< 15\%$  de dispersidade). No entanto, para aplicações farmacêuticas ou biomédicas, a faixa de tamanho que têm sido adotada oscila entre 5 e 300 nm, incluindo os colóides tradicionais. Devido a alta relação área superficial/volume, a energia superficial e ao confinamento espacial, as nanopartículas metálicas apresentam características físicas, químicas, eletrônicas, elétricas, mecânicas, magnéticas, térmicas, óticas e propriedades biológicas opostas às apresentadas pelo material estendido ou “bulk”.

O ouro (do latim *aurum*, "brilhante") é um elemento símbolo de riqueza e poder. Conhecido desde a antiguidade, é utilizado como agente terapêutico na medicina tradicional chinesa desde 2.500 AC, e no passado mais recente para o tratamento de doenças como a artrite reumatoide. Soluções vermelhas de ouro coloidal são comercializadas atualmente na Índia como rejuvenescedores e revitalizantes (Patra *et al.*, 2010).

É bem conhecido que entre as nanopartículas (NP) de metais nobres, as de ouro (AuNP) apresentam um amplo espectro de aplicação, podendo ser funcionalizadas para a obtenção de superfícies homogêneas e definidas e podem ser utilizadas por exemplo, em fotônica, no armazenamento de informação, em células fotovoltaicas, catalisadores, sistemas de detecção ópticos e eletrônicos, produtos terapêuticos e diagnósticos. (Cai *et al.*, 2008; Chen, Mwakwari e Oyelere, 2008; Daniel e Astruc, 2004; Ranjan *et al.*, 2010; Sardar *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006) Apesar de algumas aplicações similares poderem ser

encontradas em diferentes materiais, como *quantum dots*. As AuNP são consideradas relativamente inócuas, devido à menor reatividade do ouro.

A dimensão e a forma das nanopartículas regem suas propriedades óticas, além da constante dielétrica do meio circundante. Em formulações de nanopartículas de ouro esféricas, as bandas de plasmon deslocam-se para o vermelho com o aumento do diâmetro das partículas. Nanopartículas com formas diferentes à esférica, apresentam comportamentos diferentes, como os *nanorods* de ouro, que mostram duas bandas de ressonância de plasmon de superfície, a primeira relativa à sua seção transversal na faixa 520-530 nm e a segunda à sua seção longitudinal em comprimentos de onda mais longos, na região do infravermelho (Mody *et al.*, 2010).

## 2.2 Métodos de síntese

A síntese de nanomateriais e a organização das estruturas em arranjos ordenados funcionais e operacionais são aspectos cruciais na área da nanotecnologia, já que a expectativa é a obtenção de um produto uniforme (com domínio da morfologia, do tamanho e da distribuição do tamanho de partícula), reprodutível e cujas propriedades físicas e químicas sejam controladas dentro de uma ampla faixa de tamanhos e composições. Contudo, o desenvolvimento de métodos simples e versáteis para a preparação de nanopartículas com essas características é uma tarefa desafiante, subordinada à rigorosa reprodutibilidade das condições experimentais de síntese.

Para a produção de nanopartículas metálicas e cerâmicas em geral, têm sido reportadas diversas estratégias sintéticas que usam métodos tanto químicos como físicos. O objetivo dessa seção é mostrar, e sem a ambição de esgotar o assunto, a diversidade e as possibilidades dos métodos mais utilizados para a preparação de nanopartículas de ouro e compósitos de ouro com óxidos de ferro. Os métodos foram divididos em dois grandes grupos: estratégias de preparação *Bottom-up* e *Top-down*. No primeiro grupo, o de construção de baixo para cima, os átomos são organizados em estruturas de tamanho nanométrico, e o segundo grupo, no qual o material volumétrico ou *bulk* é reduzido gradativamente a tamanho nanométrico.

### 2.2.1 *Top-down*

Esta abordagem consiste na obtenção de nanoestruturas partindo-se do material em escala maior (sólidos macro e microscópicos), sendo estes manipulados até atingirem a escala de tamanho desejada. Existe uma grande variedade de métodos para a fabricação de nanopartículas

metálicas que poderiam ser agrupados em grandes grupos como mecânico-energéticos, de fabricação térmicas, de alta energia e de partículas, de litografia e métodos químicos. Alguns deles serão abordados, em relação à síntese de nanopartículas de ouro. (Sardar *et al.*, 2009).

### 2.2.1.1 Moagem

Desde a antiguidade, já se dominava a síntese de nanopartículas de ouro. Porém, naquela época, eram obtidos filmes com partículas de até 50 nm usando principalmente métodos de atrito (Huaizhi e Yuantao, 2000). Atualmente, macro ou micropartículas são moídas em moinhos de bolas ou outros mecanismos, para reduzir o tamanho. Esse método de mecano-síntese envolve um recipiente rotativo preenchido com um meio rígido de moagem. Ele opera sobre o princípio de atrito mecânico:

$$\sigma_F = \sqrt{\frac{\gamma E}{c}} \quad \text{Equação 1.}$$

Em que:

$\sigma_F$  é a tensão que na propagação de trincas que conduz a falha catastrófica;  $\gamma$  é a energia de superfície do material,  $E$  é o módulo de Young e  $c$  é o comprimento da trinca.

As bolas transmitem energia cinética ao material em volume ou *bulk*, o recipiente começa a girar, e assim, as bolas transmitem energia cinética para o material mais mole, ocorrendo vários fenômenos de compactação, rearranjo, deformação elástica e plástica, além de soldagem. A redução do tamanho de partícula acontece devido à fratura e fragmentação das partículas. No final do processo, as partículas resultantes são classificadas com ar para recuperar as nanopartículas. Pimpang et al desenvolveram um método de moagem de, no mínimo, 8 horas para a obtenção de nanopartículas de ouro de 140-150 nm estabilizadas em polivinil álcool a 5% (Pimpang *et al.*, 2008), o que sugere alto consumo energético e de tempo deste método.

Cabuil, em uma revisão sobre nanopartículas magnéticas, indica que, o primeiro método desenvolvido para a síntese de nanopartículas de magnetita foi a moagem. No entanto, é um método que demora em média 1000 horas e só permite obter nanopartículas revestidas com surfactante (Cabuil, 2006). Não foram encontrados na literatura estudos de produção dos compósitos de óxido de ferro e ouro através deste método.

### 2.2.2 Métodos térmicos baseados em aerossóis

Na pirólise, um precursor na fase de vapor (líquido ou gás) é forçado através de um orifício sob pressão elevada e queimado. O sólido resultante (uma versão de fuligem) é purificado com ar, para separar as nanopartículas de subprodutos gasosos. O processo envolve i) a geração de gotas de uma solução de precursor, ii) encolhimento da gota devido à evaporação e iii) formação de partículas sólidas. Gotas são tipicamente geradas por atomização de dois fluidos (atomização do líquido por ar em alta velocidade) ou da atomização ultrassônica (sem ar). Os fluidos de atomização têm a vantagem do alto rendimento, mas também a desvantagem de apresentar distribuições de tamanho de gota grandes (o que resulta em uma ampla faixa de distribuição de tamanho de partícula); já que, frequentemente, a pirólise gera agregados e aglomerados, em vez de partículas isoladas (Tsai *et al.*, 2002). Por outro lado, a atomização ultrassônica tem a desvantagem de apresentar baixos volumes de produção, entretanto possui a vantagem de gerar uma distribuição estreita de tamanho de gota e, portanto, a distribuição de tamanho de partícula estreita.

O método é baseado na propriedade de certos sais de ouro que, ao contrário de muitos sais de outros metais, decompõem-se ao serem aquecidos a baixa temperatura produzindo o ouro metálico e espécies gasosas que dependem da natureza do sal. No caso do  $\text{HAuCl}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , o sal decompõe-se em  $\text{Au}^0$  e vapores de  $\text{H}_2\text{O}$  e compostos clorados como  $\text{HCl}$  e  $\text{Cl}_2$  (Montero, Chialvo, de e Chialvo, 2009).

Em uma variação desta técnica, Magnusson e colaboradores (Magnusson *et al.*, 1999) criaram um método direto, em que foi usado ouro de alta pureza e colocado em um forno aquecido a  $1650^\circ\text{C}$  para gerar vapor de ouro, que é arrastado em um gás carreador, e, uma vez fora da área aquecida, o ouro condensa em forma de partículas que coalescem. Esse aerossol é passado através de um dispositivo de carga, para criar elétrons livres e partículas carregadas positivamente. Os elétrons carregam as partículas neutras e o efeito líquido é uma soma de nanopartículas neutras e outras carregadas positiva e negativamente. Posteriormente, o aerossol passa em um analisador de mobilidade diferencial (DMA) que classifica as nanopartículas baseado no respectivo diâmetro aerodinâmico. Após o DMA, o aerossol é constituído por partículas carregadas positiva ou negativamente e com o mesmo tamanho, dependendo da polaridade do campo elétrico no dispositivo. Finalmente, para dar forma esférica às partículas que apresentam uma forma fractal não muito compacta, as mesmas devem ser sinterizadas em um segundo forno.

### 2.2.2.1 Ablação a laser

A ablação a laser é um método de remoção de material de uma superfície sólida por irradiação com um feixe de laser. No laser de baixo fluxo, o material é aquecido pela energia do laser absorvida, evapora ou sublima, formando-se o chamado feixe de *clusters*. Em um fluxo maior, o material é convertido em plasma. A profundidade ao longo da qual a energia do laser é absorvida, e a quantidade de material removido por pulso de laser único, depende das propriedades ópticas do material e do comprimento de onda do laser (Itina, 2011).

As vantagens deste método incluem a relativa simplicidade do processo, a ausência de reagentes químicos na preparação final, a elevada pureza das nanopartículas obtidas, a variedade de materiais e a dispersão *in situ* das nanopartículas em uma variedade de líquidos, permitindo manipulação segura e estável dos coloides. No entanto, a faixa de distribuição de tamanho das partículas resultante é geralmente elevada, devido à aglomeração e ejeção de grandes fragmentos durante a ablação.

É considerado um método limpo que gera nanopartículas de ouro puro, evitando precursores químicos, agentes redutores e agentes estabilizantes. Assim, a superfície nua das nanopartículas carregadas torna-se altamente disponível para a funcionalização, sendo particularmente interessante para aplicações biomédicas na conjugação com ácidos nucleicos (Petersen e Barcikowski, 2009), com moléculas usadas em terapia gênica ou sensores utilizados em diagnóstico.

Recentemente, um estudo mostrou que foi possível controlar o tamanho das AuNP pela modificação dos parâmetros do laser, tais como a fluência e o comprimento de onda, variando as condições de focalização. Estes parâmetros têm um papel importante na formação de AuNP monodispersas e nos mecanismos de crescimento das nanopartículas (Elsayed *et al.*, 2013).

### 2.2.2.2 Desbaste iônico (*Sputtering*)

Alguns métodos físicos envolvem a produção de átomos em fase gasosa ou nanoclusters de ouro. Um dos métodos mais simples para a produção de átomos de ouro em fase gasosa é evaporar termicamente ouro sob alto vácuo, seguindo-se da deposição do Au<sup>0</sup> sobre um substrato cristalino.

Quando um alvo é bombardeado por partículas pesadas à alta velocidade ocorre a erosão do material alvo. O processo, quando ocorre em condições de uma descarga luminescente em fase gasosa entre um ânodo e um cátodo, é denominado de desbastamento iônico ou

*sputtering* e é conduzido pela troca de momento entre os íons e átomos no material, devido à colisões (Sigmund, 1987). A deposição por desbastamento iônico de metais sobre a superfície de determinados tipos de líquidos gera nanopartículas metálicas dispersas na fase líquida. Em um trabalho recente, Hatakeyama e colaboradores (Hatakeyama *et al.*, 2011) prepararam AuNP de 2 a 8 nm em polietileno glicol (PEG) utilizando como meio de captura a técnica de deposição de desbastamento iônico. Os dados mostraram que a estrutura de AuNP é dependente da temperatura de preparação do PEG, no intervalo de 20-60 °C. Observou-se a obtenção de esferas à 20 °C, enquanto que a anisotropia aumentou com o aumento da temperatura.

O método de desbaste iônico é um método de alta qualidade, ou seja, gera nanopartículas com superfícies limpas e distribuição de tamanho de partícula uniforme. No entanto, para aplicações industriais tais partículas são limitadas devido aos altos custos e às baixas taxas de produção.

Todavia, as sínteses de nanoestruturas em fase de vapor acontecem em condições reacionais severas e não garantem a totalidade de reação do sistema, o que pode derivar tanto na presença de impurezas nos produtos quanto na baixa cristalinidade, além do uso considerável de energia e tempo.

### 2.2.3 *Bottom-up*

O conceito de *bottom-up* baseia-se na construção de estruturas em tamanho nanométrico a partir de átomos ou moléculas ligados quimicamente. Este conceito é usado nos métodos de via úmida e na síntese biomimética de nanopartículas metálicas.

#### 2.2.3.1 Redução química

Os métodos de via úmida são os mais utilizados na preparação de nanopartículas de ouro. São baseados na redução de um sal metálico (tipicamente do íon  $\text{AuCl}_4^-$ ) em presença de um estabilizador e com ajuda de uma fonte de energia externa, como radiação ultravioleta, ultrassom ou aquecimento. Esses métodos permitem o controle de tamanho e a concentração das partículas dispersas.

##### 2.2.3.1.1 *Nanopartículas de ouro*

Processos livres de produtos químicos tóxicos e solventes orgânicos são critérios importantes nas abordagens da química verde para a síntese de nanopartículas. Em 1951, Turkevich *et al.* (Turkevich, Stevenson e Hillier, 1951) desenvolveu a estratégia de adicionar uma

quantidade e citrato de sódio (reduzidor e estabilizador) em uma solução  $0,25 \text{ mmolL}^{-1}$  de ácido cloroáurico em ebulição e deixado em refluxo para produzir AuNP biocompatíveis, com uma distribuição de tamanho estreita e facilmente manipuláveis em diversas aplicações, contudo, essas partículas perdem a estabilidade coloidal, sofrendo agregação quando concentradas. Sendo o método mais utilizado, a redução com citrato ainda poderia ser considerada a principal abordagem para atender a crescente demanda por AuNP, devido ao baixo custo, o uso de água como solvente e pouca toxicidade do produto final. No entanto, o método não é livre de inconvenientes. Alguns autores como Li et al (Li *et al.*, 2011) destacaram que, com o método original, os rendimentos obtidos são muito baixos e as quantidades de água e energia utilizadas neste procedimento são altas. Assim, modificaram o método otimizando e aumentando em dez vezes a concentração de sal de ouro usado como precursor ( $\text{HAuCl}_4$  no caso) mantendo a distribuição de tamanho, simplesmente por adição de hidróxido de sódio no reator e controle da temperatura num intervalo de 70-85 °C.

O anterior contrasta com os outros métodos químicos que, embora eficientes, permitem a adsorção de algumas espécies químicas tóxicas na superfície da partícula. Por exemplo os que tradicionalmente, têm utilizado agentes redutores tóxicos ou que contaminam fortemente ambientes aquáticos. como o borohidreto de sódio (Brust *et al.*, 1994), cloreto de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (Hueso *et al.*, 2013), trifenilfosfina (Sharma *et al.*, 2009), e hidroxilamina (Tódor *et al.*, 2014), entre outros. Adicionalmente, as reações, acontecem em alguns casos, em solventes orgânicos, também tóxicos. Alguns desses processos, como o método de Brust envolvem múltiplos passos de transferência de fase dos íons de ouro desde a fase aquosa até a fase orgânica, seguido pela redução e a estabilização. Esses métodos apresentam vantagens importantes e referem-se à possibilidade de sintetizar NP em concentrações altas, com um controle fino do tamanho, da dispersidade e da natureza química da superfície da nanopartícula (por exemplo, funcionalizando com tióis, aminas, aminoácidos, etc.). Além disso, as AuNP podem ser secas e armazenadas em pó sem agregação irreversível e, adicionalmente, podem organizar-se espontaneamente em arranjos hexagonais altamente empacotados formando monocamadas ao evaporar o solvente. Tais propriedades podem ser controladas variando a separação entre as partículas ao estabilizá-las com alcanotióis de diferentes comprimentos de cadeia, o que ainda não é uma tarefa trivial, em certos casos, dependendo do comprimento da cadeia do alcanotiol, este pode ser degradado na

superfície do ouro deixando unicamente o átomo de enxofre (Fischer *et al.*, 2012).

No método desenvolvido por Brust e colaboradores (Brust *et al.*, 1994) (um dos mais utilizados para síntese de *nanoclusters* de ouro), o  $\text{AuCl}_4^-$  é transferido a tolueno ou clorofórmio usando brometo de tetraalquilamônio e reduzido com borohidreto de sódio em presença de alcanotióis. As nanopartículas assim produzidas são de caráter hidrofóbico e estão recobertas com ligantes fortemente aderidos, que as fazem difíceis de dispersar em água e podem atrapalhar a sua funcionalização para aplicações biomédicas/biotecnológicas, em que dispersões aquosas são desejáveis.

A decomposição térmica na presença de agentes tensoativos e polímeros (como estabilizadores) de compostos organometálicos, e complexos metal-surfactante, produz nanopartículas bem cristalizadas com distribuições de tamanho estreitos, as principais desvantagens são a reação a temperatura perto de 200 °C e purificação entediante que requer várias etapas (Jia e Schüth, 2011; Wang *et al.*, 2005).

Entre as vantagens da síntese em meio aquoso, a água demonstra ser um excelente solvente para uma boa quantidade de íons metálicos e uma grande variedade de agentes estabilizantes. No caso do ouro, sendo o processo de um único passo, a síntese em meio aquoso é consideravelmente mais simples do que o método de múltiplos passos de Brust em meio orgânico. Isto permite a organização de camada por camada (*layer by layer*) quando a superfície é funcionalizada, e o controle da forma é possível, como quando micelas são usadas como molde ou *template* de estruturas auto-organizadas. Finalmente, uma das maiores vantagens desses processos é a fácil bioconjugação da superfície do ouro com DNA, enzimas, anticorpos, pequenas moléculas, entre outras moléculas.

No entanto, apesar dos avanços já realizados, existem algumas dificuldades na obtenção de dispersões concentradas em fase aquosa devido às interações iônicas. Em relação ao controle e distribuição de tamanho, as nanopartículas preparadas em meio aquoso são difíceis de serem separadas da solução para formar pós dispersáveis em água depois do armazenamento. Além disso, as AuNP não se organizam espontaneamente em estruturas com arranjo hexagonal ao evaporar o solvente, como acontece em nanopartículas sintetizadas em solvente orgânico. Outros problemas estão relacionados com os subprodutos do agente redutor, múltiplos passos requeridos e a altas concentrações utilizadas de agentes estabilizantes.

### 2.2.3.1.2 Flavonoides de cítricos como redutores do ouro

Os sucos de cítricos têm uma composição complexa e contêm diversos compostos que mostram forte atividade antioxidante e de eliminação de radicais livres, incluindo os flavonoides. Como normalmente a atividade antioxidante de uma substância é diretamente relacionada à sua capacidade redutora (Scampicchio *et al.*, 2006), espera-se que os elétrons gerados durante a reação de oxidação dos flavonoides tenham a capacidade de reduzir os íons  $\text{Au}^{3+}$  a átomos de ouro metálico  $\text{Au}^0$ . Recentemente, Sujitha & Kannanand, (Sujitha e Kannan, 2013) bem como Tai *et al.* (Tai *et al.*, 2011) sintetizaram nanopartículas de ouro AuNP de diferentes tamanhos e formas em misturas de reação de  $\text{HAuCl}_4$  com sucos cítricos, particularmente laranja e limão. Nas condições utilizadas pelos autores, a redução foi atribuída aos ácidos ascórbico e cítrico, enquanto que a estabilização foi adjudicada as proteínas presentes nos sucos, contudo a contribuição de outros componentes com alto poder redutor como os flavonoides não pode ser descartada. Um exemplo disso, é a síntese sonoquímica de nanopartículas de ouro por Das *et al.* na qual o flavonoide quercetina reduziu os íons de  $\text{HAuCl}_4$  e a cetrimida estabilizou a superfície das nanopartículas, permitindo o uso ulterior como agente terapêutico em um modelo *in vitro* de infecção de macrófagos murinos com parasitas do gênero *Leishmania*. (Das *et al.*, 2013)

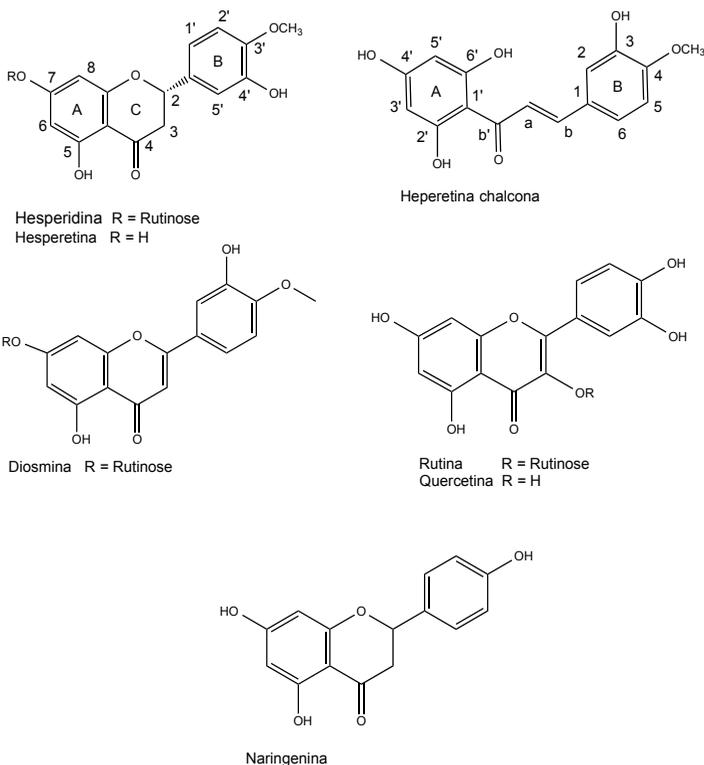
Em plantas, os flavonoides são produzidos a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e malonato. A estrutura básica mostrada na Figura 1 é formada por um núcleo de flavano, que consiste de 15 átomos de carbono ordenados em três anéis ( $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ ), descritos como A, B e C. Os diferentes tipos de flavonoides são classificados segundo o nível de oxidação e os perfis de substituição do anel C, enquanto que os compostos individuais entre classes se diferenciam nos perfis de substituição nos anéis A e B. Dentre as principais classes de flavonoides, encontram-se flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavononóis, flavan-3-óis e antocianinas, entre outros.

Em geral, os flavonoides participam de reações redox nas quais podem atuar tanto como antioxidantes (doadores de elétrons) quanto pró-oxidantes (aceptores de elétrons), dependendo do ambiente químico.

No estudo do comportamento eletroquímico da hesperetina observa-se que a molécula apresenta um potencial de oxidação de 479 mV vs o eletrodo padrão de hidrogênio (SHE) (Abou Samra *et al.*, 2011) da mesma forma a diosmina (512 mV), quercetina (330 mV), naringenina (600 mV), rutina (400 mV), e hesperidina (400 mV), o que

indica uma relativa facilidade para doar os elétrons necessários para reduzir o par  $\text{AuCl}_4^-/\text{Au}^0$  (Ep 1002 mV vs SHE).

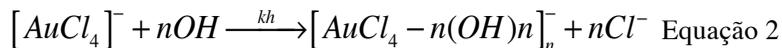
**Figura 1. Fórmulas estruturais dos flavonoides usados na síntese de nanopartículas de ouro: hesperetina, hesperidina, diosmina, rutina naringenina e quercetina .**



**As posições dos átomos em cada anel estão ressaltadas.**

Mesmo sendo comumente aceito que os flavonoides glicosilados são solúveis em água, enquanto as respectivas agliconas são praticamente insolúveis, a hesperetina e os demais flavonoides foram praticamente insolúveis em água e precipitaram em condições ácidas (independente da sua condição de glucósido ou aglicona), solubilizando unicamente em meio alcalino (NaOH,  $\text{NaCO}_3$  ou KOH  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  pH 11). Esta condição acelera a reação de oxidação do flavonoide

(Lattanzio *et al.*, 2009), considerando que o potencial de oxidação é deslocado a valores mais baixos (-59 mV por unidade de pH). Além disso, o meio alcalino induz a substituição sucessiva dos átomos de cloro no  $\text{HAuCl}_4$  por hidroxilas, gerando a aparição de produtos intermediários instáveis  $[\text{AuCl}_{4-n}(\text{OH})]_n$  mais fáceis de reduzir (Streszewski *et al.*, 2012), conforme a equação:



Assim, a hipótese de trabalho adotada foi que, devido ao potencial de redução padrão mais elevado do par  $\text{Au}_{(aq)}^{3+} / \text{Au}^0$ , (1450 mV versus o eléctrodo padrão de hidrogénio, SHE), comparado com o da hesperetina (470 mV) e os demais flavonoides, a redução do ouro é viável termodinamicamente. Podendo ser usada para desenvolver um método de síntese.

No caso da hesperetina, quando dissolvida em um meio alcalino, acontece a desprotonação das hidroxilas nos carbonos 7, 3' e 5 (nessa ordem), seguida da abertura do anel de pirano (anel C) até se formar hesperetina chalcona como mostrado na Figura 2. Contudo, a reação é reversível e, ao acidificar o meio, a hesperetina chalcona transforma-se de volta em hesperetina.

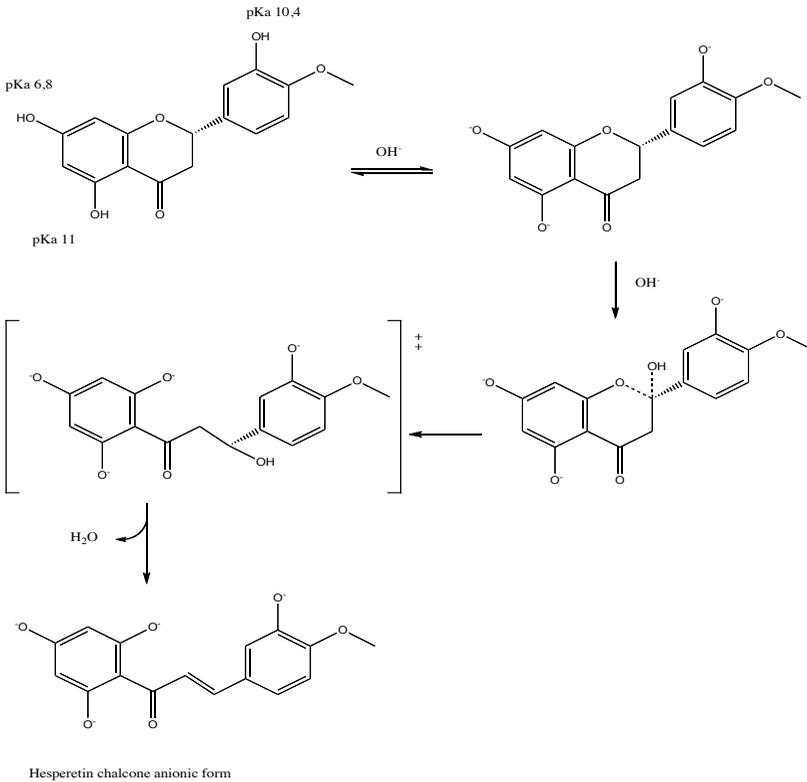
### 2.2.3.1.3 Compósitos de óxidos de ferro/ouro

As nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetita e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  maguemita) têm sido intensamente estudadas em sistemas biológicos e apresentam grande aplicabilidade, devido, em parte, a biocompatibilidade e especificidade. Assim, na área biomédica, são exploradas aplicações em separações magnéticas *in vitro* tanto de células como de biomoléculas, em sistemas nanocarreadores, na destruição *in situ* de células tumorais pelo fenômeno de hipertermia e como agentes de contraste (Laurent *et al.*, 2008). Porém, o uso potencial em aplicações biomédicas apresenta algumas restrições, já que é preciso realizar o revestimento na sua superfície com agentes biocompatíveis e, além disso, precisa-se de nanopartículas com valores elevados de magnetização, tamanho abaixo dos 100 nm, com uma distribuição de tamanho estreita e estabilidade coloidal em condições fisiológicas.

Entre os óxidos de ferro, a magnetita apresenta propriedades importantes para a aplicação na área biomédica, como baixa toxicidade e alta magnetização de saturação. Contudo, as nanopartículas de magnetita têm problemas de estabilidade significativas em condições fisiológicas (pH e força iônica), pois tendem a se aglomerar ou a sofrer

oxidação na superfície, reduzindo magnetização de saturação (Salado *et al.*, 2012). Apesar disso, têm se desenvolvido aplicações com nanopartículas oxidadas.

**Figura 2. Transformações estruturais da hesperetina até hesperetina chalcona na forma aniônica em solução alcalina.**



**Fonte: Adaptado de (Mauro, Di *et al.*, 1999)**

O ouro, como mencionado anteriormente, é atraente em aplicações na área biomédica pela facilidade da redução dos seus sais, estabilidade química, biocompatibilidade e propriedades óticas quando estruturado em tamanho nanométrico, em que a oscilação coletiva dos elétrons livres absorvem radiação na região visível e/ou infravermelho do espectro eletromagnético, denominado ressonância localizada de plasmons de superfície (LSPR). Apesar de uma grande variedade de metais apresentar a propriedade LSPR, partículas de ouro e prata são as

mais estudadas, em parte devido à estabilidade em tamanho nanométrico, aos coeficientes de extinção molar elevados e à alta sensibilidade da banda de LSPR, aos câmbios no ambiente dielétrico do meio no qual são dispersas. Em imageamento óptico, por exemplo, uma vantagem das nanopartículas de ouro, diferentemente dos fluoróforos orgânicos, não sofrem fotobranqueamento, nem apresentam a bi-estabilidade ótica (intermitência) e toxicidade dos quantum dots (Salgueiriño-Maceira e Correa-Duarte, 2007).

Outro requisito importante para o uso de nanopartículas na área biomédica é a superfície hidrófila que garanta a estabilidade coloidal da formulação em condições fisiológicas. Portanto, a forma mais adequada para a síntese, seria o uso de abordagens sintéticas em meios aquosos. Assim, a síntese do núcleo de óxido de ferro e o subsequente revestimento de ouro, ocorrendo ambos em meio aquoso, oferece uma vantagem significativa em futuras aplicações. Isto porque as nanopartículas sintetizadas em água são basicamente hidrofílicas e, por conseguinte, mais fáceis de serem adaptadas às condições requeridas para a funcionalização como, por exemplo, biomoléculas. Além disso, estão livres de resíduos de reagentes tóxicos frequentemente utilizados em síntese orgânica (Krystofiak *et al.*, 2013).

Atualmente, os sistemas de nanocompósitos estão aumentando em complexidade, tanto em termos de estrutura, quanto em funcionalidades. Esta complexidade basicamente tem sido gerada pelos novos métodos de síntese motivando progressos mais rápidos. Aliás, os avanços e o entendimento de procedimentos como reações de acoplamento químico, precipitação de sílica e redução de sais metálicos têm permitido a utilização rotineira em uma gama bastante ampla de procedimentos para produzir nanocompósitos. Este progresso tem permitido a obtenção de produtos versáteis de praticamente qualquer estrutura desejada, como tem sido amplamente descrito na literatura (Salgueiriño-Maceira e Correa-Duarte, 2007). No entanto, na síntese de nanocompósitos formados por mais de um material, o arranjo de uma grande interface entre os dois materiais só é observado quando os parâmetros de rede dos dois componentes não diferem significativamente ou quando o controle das variáveis da síntese garantem uma baixa energia interfacial. Cumprindo-se estes pré-requisitos, pode-se obter nanocompósitos híbridos, do tipo *core-shell*. Muitos estudos que têm sido publicados alcançaram o objetivo de depositar um filme inorgânico fino e uniforme na superfície dos óxidos de ferro ( $\text{Au}^0$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{AlO}_3$ ) (Ding *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009; Lyon *et al.*, 2004; Peng, Liang e Qiu, 2011).

Segundo a literatura, existem duas morfologias observadas em compósitos nanoestruturados de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@Au$ : a estrutura de núcleo-casca ou *core-shell* e a heteroestrutura de óxido de ferro decorado com nanopartículas de ouro, em que há só uma interação parcial entre a superfície do óxido com o metal. Ambas têm ganhado muita atenção e vários métodos relatando a síntese deste tipo de nanocompósitos têm sido publicados.

Fundamentalmente, o recobrimento de nanocristais magnéticos de óxidos de ferro com uma casca fina de ouro proporcionaria todas as qualidades atraentes do ouro para sua aplicação na área biomédica, junto com as propriedades magnéticas dos óxidos de ferro, permitindo a posterior manipulação com um campo magnético externo (Liu *et al.*, 2008). A casca de ouro, além de proteger o óxido de ferro da oxidação em meio aquoso e melhorar a sua estabilidade coloidal proporciona uma superfície para a funcionalização com proteínas (Liu *et al.*, 2008) ou ácidos nucleicos (Kouassi e Irudayaraj, 2006; Zhou *et al.*, 2012) ou, ainda, permite outras funcionalizações já conhecidas na superfície de ouro (Kalska-Szostko *et al.*, 2012; Salado *et al.*, 2012).

Como mencionado, obter diretamente este tipo de nanopartículas compósitas com propriedades desejadas como a monodispersão em meio aquoso, é desafiante. O desafio reside na complexidade em controlar os processos de nucleação e de crescimento dos cristais à temperatura ambiente, que geralmente resulta em nanopartículas com uma baixa cristalinidade ou uma baixa magnetização de saturação, além de uma ampla distribuição de tamanho. Isto contrasta com as abordagens em meios não aquosos, a temperaturas elevadas, nas quais a nucleação e o crescimento são bem delimitados, proporcionando controle sobre o tamanho, a cristalinidade e a forma das nanopartículas (Salado *et al.*, 2012). Estes autores, optaram pelo método em meio não aquoso para preparar *core-shells* hidrofóbicos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  fazendo crescer a casca de ouro em partículas de magnetita, previamente formadas pela decomposição solvotérmica a 200 °C de acetilacetato de ferro (III), em uma mistura difenil éter, 1,2-hexadecanediol, oleilamina e ácido oleico. Em seguida, ouro (III) foi decomposto a 180-190 °C na presença de 1,2-hexadecanediol, oleilamina, ácido oleico e as sementes de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . As nanopartículas hidrofóbicas resultantes foram tornadas hidrofílicas pela funcionalização com o polímero poli (anidrido maleico-alt-1-octadeceno).

Procedimentos de síntese em meio aquoso de nanopartículas *core-shell* de óxidos de ferro e ouro têm sido amplamente reportados,

contudo, poucos autores obtêm uma morfologia *core-shell* propriamente demonstrada. Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2011) usaram  $\text{NaBH}_4$ , sem conseguir a redução do ouro na superfície do óxido de ferro. Um dos processos mais bem sucedidos na síntese de nanopartículas *core-shell* do composto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  propostos até agora inclui o trabalho de Lyon *et al.* (Lyon *et al.*, 2004). No seu método de redução direta, foi utilizada uma suspensão de nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  de  $\sim 9$  nm em solução aquosa de hidróxido tetrametilamônio seguido da adição de citrato de sódio e  $\text{HAuCl}_4$  às nanopartículas e a adição iterativa de hidroxilamina para reduzir gradualmente o excesso de  $\text{HAuCl}_4$ , fazendo crescer a casca de Au envolta do óxido de ferro, obtendo no final um composto  $\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Au}$  *core-shell* de aproximadamente 60 nm. Porém, a hidroxilamina apresenta algumas propriedades pouco atraentes, uma vez que pode explodir sob aquecimento, como aconteceu com a explosão de duas fábricas que manipulavam hidroxilamina em 1999. Ainda, trata-se de um composto irritante ao aparelho respiratório, à pele, aos olhos e outras mucosas. Pode ser absorvido através da pele, é perigoso se ingerido, além de ser considerado um possível composto mutagênico (Stolarski *et al.*, 1987).

Em um método usando o citrato como redutor do ouro na superfície de óxido de ferro Pham *et al.* (Hien Pham, Cao e Sim, 2008) sintetizaram nanopartículas magnéticas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  revestidas com ouro para a separação biológica da proteína IgG. A IgG foi ligada com sucesso na superfície do ouro através de interações eletrostáticas. Os tamanhos das nanopartículas dispersáveis em meio aquoso, sintetizadas facilmente, variaram de 15 a 40 nm. Entretanto, a presença de uma estrutura *core-shell* é duvidosa.

### 2.3 *Sistemas biomiméticos*

O termo biomimético refere-se à aplicação de princípios biológicos na formação de materiais, sendo a biorredução o principal processo envolvido na síntese de nanopartículas. Os primeiros relatos de síntese biomimética de nanopartículas mostraram a utilidade das bactérias como nanofábricas e, posteriormente obteve-se sucesso usando fungos, actinomicetes e mais recentemente plantas, tanto no extracelular como intracelular ou na biomassa (Prathna *et al.*, 2010).

O uso de plantas como fonte renovável e sustentável na síntese de das AuNP oferece mais vantagens do que o uso de procariotas ou fungos, já que estes precisam de metodologias de maior custo para manter as culturas microbianas. Além disso, a redução dos íons metálicos na produção de nanopartículas é mais lenta, os processos de

obtenção e purificação são mais complicados e os possíveis contaminantes limitam o uso das nanopartículas produzidas desta forma para a área biomédica.

A primeira evidência avaliada em plantas foi a bioacumulação de AuNP nas raízes da alfafa, cuja localização depende da presença de enzimas específicas ou proteínas envolvidas na síntese (Gardea-Torresdey *et al.*, 2002). Este princípio foi usado em práticas de mineração, em que a recuperação do metal *bulk* pode ser um processo relativamente simples, mas a recuperação das nanopartículas é maçante e custoso, já que precisa de enzimas para a degradação do material celulósico que as contém.

É por isso que tem sido desenvolvido métodos de síntese extracelular de AuNP utilizando plantas, sugerindo-se que diversos produtos do metabolismo secundário, algumas enzimas, proteínas, e outros agentes redutores envolvidos em sistemas e reações de transporte/troca de elétrons, sejam os responsáveis pela biorredução. Têm sido reportadas inúmeras metodologias usando extratos ou biomassa de plantas que visam o desenvolvimento de processos mais simples, eficientes e rápidos. Sendo os métodos de fácil controle supõe-se que as mudanças de escala seriam mais simples (Tabela 2).

Para facilitar a pesquisa sistemática sobre o efeito da forma nas propriedades das NP, é desejável que o sistema reacional possa ser desenhado para fornecer tantas formas diferentes quanto possível, objetivo que pode ser atingido usando extratos de plantas. Além disso, há também uma necessidade de se aderir aos padrões rigorosos de pureza, composição e estrutura alcançadas na química de moléculas pequenas, orgânicas, inorgânicas e organometálicas. Este não é um objetivo fácil de atingir na prática (em alguns casos é impossível) e só pode ser alcançado tendo uma composição definida. O material deve apresentar uma aplicabilidade prática e visar a possível comercialização, principalmente na área biomédica, em que a pureza, desempenho, facilidade e custo da síntese são condições *sine qua non*.

Uma das possíveis desvantagens de usar extratos de plantas é a complexidade da matriz e a influência de vários sinais de estresse bióticos e abióticos no metabolismo secundário, que alteram consideravelmente os níveis expressos de metabólitos secundários (Pavarini *et al.*, 2012), e acarretaria em grandes dificuldades ou esforços maiores na padronização dos processos de síntese. É por isso que o uso de substâncias puras já isoladas de plantas como alternativa na síntese biomimética, como proposto neste trabalho, é uma alternativa mais interessante (Prathna *et al.*, 2010).

**Tabela 2. Síntese extracelular de nanopartículas de ouro mediada por plantas.**

Nome comum	Nome científico	Parte	Partícula	Morfologia	Tamanho (nm)
Gerânio	<i>Pelargonium graveolens</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Decaédros, icosaédros	20-40
Gerânio	<i>P. graveolens</i>	Caule	Au <sub>0</sub>	Esféras	8,3-23,8
Gerânio	<i>P. graveolens</i>	Raiz	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos	11,4-34
Capim-limão	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos	50-1800
Neem	<i>Azadirachta indica</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos, hexágonos	50-35
Sarandi	<i>Emblica officinalis</i>	Fruta	Au <sub>0</sub>	-	15-25
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Triângulos planos, hexágonos	20-40
Babosa	<i>Aloe barbadensis</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos	50-350
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Placas, triângulos	55-80
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos, triângulos truncados	20,6 ± 7,09
Hortelã	<i>Coleus amboinicus</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos truncados, hexágonos	4,6-55,1
Eucalipto	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	-	1,25-17,5
Gerânio rosa	<i>P. roseum</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	-	2,5-27,5
Chá	<i>Camellia sinensis</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Triângulos	~40
Hena	<i>Lawsonia inermis</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos	7,5-65
Quebra Pedra	<i>Phyllanthus amarus</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Hexágonos, triângulos, bastões, esferas	18-38
Alôes do cabo	<i>Aloe ferox</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos	6-35; 4-45, 50
Hibiscos	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos, hexágonos, dodecaédros	14
Goiaba	<i>Psidium guajaba</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos, hexágonos	27±3
Magnólia japonesa	<i>Magnolia kobus</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Pentágonos, hexágonos, esferas	5-300
Caqui	<i>Diopyros kaki</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	triângulos, Pentágonos, hexágonos, esferas	~300
Escutellaria	<i>Scutellaria barbata</i>	Planta	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos	5-30
Catinga-de-mulata	<i>Tanacetum vulgare</i>	Fruta	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos	11
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	Botão floral	Au <sub>0</sub>	Triângulos	100-300
Amêndoa	<i>Terminalia catappa</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras	21,9
Feijão-da-florida	<i>Mucuna pruriens</i>	Semente	Au <sub>0</sub>	Esféras	6-17,7
Banana	<i>Musa paradisiaca</i>	Casca	Au <sub>0</sub>	Microcubos, microcubos	300
Beterraba	<i>Beta vulgaris</i>	Polpa	Au <sub>0</sub>	Nanobastão	25, 160, 20
Beterraba	<i>Beta vulgaris</i>	Polpa	Au <sub>0</sub>	Nanocubos	30
Centela	<i>Centella asiatica</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Triângulos, hexágonos	9,3-10,9
Tramazeira	<i>Sorbus aucuparia</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos, hexágonos	18
Rosa japonesa	<i>Rosa rugosa</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Triângulos, hexágonos	11
Quinóia	<i>Chenopodium album</i>	Planta	Au <sub>0</sub>	Quase esferas	10
Chá verde	<i>Camellia sinensis</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras	~20
Oliveira	<i>Olea europaea</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Triângulos, hexágonos, esferas	50-100
Calistemo	<i>Callistemon viminalis</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Triângulos, esferas	~90
Ginseng coreano	<i>Panax ginseng</i>	Raiz	Au <sub>0</sub>	Esféras	16,2±3
Estévia	<i>Stevia rebaudiana</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Octaédros	8-20
Manga	<i>Mangifera indica</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras	17
Manjerição	<i>Ocimum sanctum</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Hexágonos	30
Árvore-do-caril	<i>Murraya koenigii</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras	20
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Nanoprismas, esferas	25
Mogno-brasileiro	<i>Swietenia mahogany</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos, hexágonos	
Caju	<i>Anacardium occidentale</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Esféras	6,5, 17
Grão-de-bico	<i>Cicer arietinum</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	Triângulos, prismas	~25
Anacardo oriental	<i>Semecarpus anacardium</i>	Folha	Au <sub>0</sub>	-	13-55
Alfafa	<i>Medicago sativa</i>	Biomassa	Au <sub>0</sub>	Decaédros, icosaédros	30-60
Pera	<i>Pyrus sp.</i>	Fruta	Au <sub>0</sub>	Triângulos, placas hexagonais	200-500; 12-20
Rosa	<i>Rosa hybrida</i>	Fruta	Au <sub>0</sub>	Esféras, triângulos, hexágonos	10
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	rizoma	Au <sub>0</sub>	Esféras, partículas irregulares	8,27 - 18,31
Tuia da china	<i>Platyclusus orientalis</i>	folhas	Au <sub>0</sub>	Esféras e quase-esferas	5, 30, 80

**Fonte: Reproduzido de (Narayanan e Sakthivel, 2011)**

### Compósitos de óxidos de ferro/Ouro

Mesmo tendo sido publicados vários trabalhos relatando a síntese de nanopartículas compósitas de ouro e óxido de ferro em meio aquoso, até agora somente os trabalhos de Haratifar *et al.* e Dizaji *et al.* (Norouz Dizaji, Yilmaz e Piskin, 2015) (Haratifar *et al.*, 2009) voltaram a atenção na síntese verde de nanopartículas metálicas de ouro e prata, usando uma aproximação de semi-biossíntese na qual os núcleos magnéticos (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) foram sintetizados utilizando o método co-

precipitação de sais de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  em meio alcalino e a redução de  $\text{HAuCl}_4$  na superfície de óxido usando extratos de *Eucalyptus camaldulensis* ou *Ligustrum vulgare*. Foram obtidos compósitos com tamanhos variando entre 6-20 nm, os autores, sugerem mas não provam a existência do *core-shell*.

## 2.4 Aplicações na área biomédica/biotecnológica

As nanopartículas de ouro têm emergido como ferramentas promissoras em biotecnologia e biomedicina tanto em aplicações diagnósticas como terapêuticas, valendo-se das propriedades e características do ouro em escala nanométrica: i) apresenta uma baixa toxicidade intrínseca, ii) suas propriedades de absorção de energia e conversão em calor podem ser otimizadas em função da forma e tamanho, iii) o tamanho reduzido ( $< 100$  nm) propicia a vetorização até o tumor (efeito de permeabilidade e retenção aumentados, EPR) (Kobayashi, Watanabe e Choyke, 2014), iv) sua propriedade de plasmon intensificado as transformam em agentes de contraste para imageamento e v) capacidade para adsorver uma grande variedade de ligantes na superfície. Por conseguinte, AuNP tornaram-se candidatos ideais para a detecção molecular, agentes de contraste para imageamento de elevada eficiência molecular, bem como agentes carreadores de fármacos ou biomoléculas como DNA, RNA, aptâmeros e anticorpos, permitindo o desenvolvimento tanto de dispositivos de diagnóstico, sensores e métodos terapêuticos.

Os dispositivos de diagnóstico baseados em AuNP são criados explorando as propriedades das nanopartículas; alguns deles utilizam a mudança de cor das AuNP quando agregadas e a troca de ligantes para construir sensores colorimétricos. Outra estratégia é a utilização das AuNP como núcleo a ser funcionalizado com uma grande variedade de ligantes na superfície dirigidos contra biomarcadores tumorais, gerando nanossondas de imageamento altamente específicas e seletivas para a detecção do câncer, usando as AuNP em métodos eletroquímicos acoplados com a deposição do metal para aumentar o sinal e portanto, a sensibilidade.

No caso da utilização em aplicações terapêuticas, o mais estudado até agora é na área de vetorização de terapias contra o câncer. Neste caso, as nanopartículas de ouro devem ser funcionalizadas, ou seja, em suas superfícies devem existir ligantes (anticorpos, DNA, aptâmeros, RNA, moléculas pequenas) que reconheçam de forma específica as células do tumor.

Outra possibilidade de terapia contra o câncer utilizando nanopartículas de ouro é a hipertermia. Quando uma AuNP funcionalizada com um ligante específico que reconhece, liga-se e acumula-se na célula tumoral e sobre a região do tumor, pode ser incidida uma radiação eletromagnética com comprimento de onda na região da banda plasmon da nanopartícula, fazendo com que a nanopartícula absorva energia proveniente da radiação. Após a absorção, os elétrons relaxam e a energia é transferida para a rede cristalina do cristal, gerando calor, que é dissipado das AuNP para o meio circundante e causa a destruição das células, principalmente das células doentes, que são muito sensíveis a mudanças de temperatura. Mudanças de 5°C podem induzir à alterações bioquímicas que levam à morte celular por apoptose (Li *et al.*, 2003).

Uma limitação da técnica reside na absorção da radiação pelos tecidos, restringindo o uso em regiões próximas à pele. Neste caso, o aumento da temperatura em uma região contendo AuNP pode ser atingido utilizando radiofrequência como demonstrado por Glazer, (2010) em um modelo animal (murino) de adenocarcinoma pancreático (Glazer *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado em modelo de diabetes, os resultados obtidos revelaram a eficácia antioxidante das AuNP reduzidas usando a biomassa de *Bacillus licheniformis*. Ao inibir *in vivo* a formação de espécies reativas do oxigênio EROS e sequestrar radicais livres, além de aumentar as enzimas de defesa antioxidantes e o controle constante da hiperglicemia, sugerindo a utilização dessas AuNP como possível alternativa terapêutica no tratamento da diabetes e suas complicações (Barathmanikanth *et al.*, 2010)

## 2.5 Estabilidade

Uma das principais dificuldades na síntese de nanopartículas metálicas é a obtenção de suspensões coloidais estáveis, já que possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a imediata agregação para a formação de ligações metal-metal.

Por definição, uma fase coloidal é termodinamicamente instável quando comparada com uma fase contínua. Termodinamicamente, têm sido explicado pela relação entre a variação da energia livre de Gibbs ( $dG$ ) e a variação na área superficial da amostra ( $d\sigma$ ), a temperatura e pressão constantes, que é dada pela equação  $dG = \gamma d\sigma$ , onde  $\gamma$  é a tensão superficial interfacial.  $G$  diminui quando há uma diminuição da área superficial do sistema, o que indica uma tendência natural à agregação (Leite e Ribeiro, 2012).

Os estabilizadores, também chamados de agentes passivadores ou surfactantes, são moléculas utilizadas para estabilizar termodinamicamente o sistema coloidal, formando uma camada auto-organizada sobre a superfície do cristal em desenvolvimento, inibindo seu crescimento e/ou sua agregação. Os efeitos estabilizadores podem ser do tipo eletrostático (forças de atração coulômbicas) ou estérico (polímeros e outros agentes como cerâmicas, alcanotióis, enzimas, proteínas, que revestem a superfície de nanopartículas), como mostrado na Figura 1. Além de controlar o tamanho e a forma das nanopartículas, tais estabilizadores podem “funcionalizá-las” (por adsorção física ou ligações covalentes) modificando a reatividade, coeficientes de extinção ópticos, índice de refração e solubilidade. No entanto, as ligações covalentes modificam fortemente o comportamento das AuNP, alterando a densidade eletrônica e a constante dielétrica do meio, pela variação de natureza da camada estabilizante.

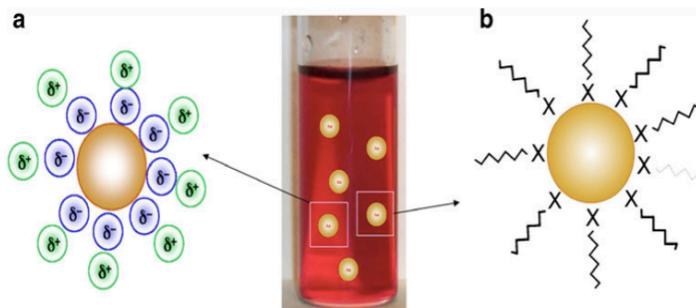
Esses grupamentos funcionais como ácido carboxílico, íons de amônio, ácido sulfônico, entre outros, na forma de monocamadas quimioadsorvidas na superfície, poderiam ser usados para aumentar a solubilidade em água, permitindo por exemplo, a síntese de nanopartículas redispersáveis em água, fazendo com que as nanopartículas hidrofóbicas possam ser ressuspensas em água e outros solventes polares sem mudanças significativas de tamanho e dispersidade.

Além da obtenção direta das nanopartículas funcionalizadas, como mencionado acima, outro método para funcionalizá-las consiste em uma reação de troca parcial ou total das moléculas adsorvidas, pela molécula de interesse, após a preparação (Sardar *et al.*, 2009).

A estabilidade das nanopartículas em solução depende principalmente das propriedades da superfície das partículas, tais como a carga superficial e estrutura do ligando. Em geral, o aumento da repulsão eletrostática e o impedimento estérico na superfície das nanopartículas melhoram significativamente a estabilidade em solução. A estabilização eletrostática de uma dispersão de nanopartículas é determinada pelo balanço entre as forças atrativas de van der Waals e repulsivas eletrostáticas. Como consequência, as nanopartículas se mantêm estáveis sem agregação se a intensidade da força eletrostática repulsiva for maior que a intensidade da força atrativa de van der Waals (Figura 3a). Em outras palavras, as nanopartículas não agregadas apresentam uma densidade de carga suficiente na superfície.

No mecanismo de estabilização estérica (Figura 3b), camadas de moléculas longas, adsorvidas ou ligadas covalentemente na superfície da partícula, impedem a agregação das partículas por impedimento estérico.

**Figura 3. Mecanismos possíveis de estabilização das nanopartículas de ouro**  
a) estabilização por repulsões eletrostáticas e b) por impedimento estérico.



**Fonte: Reproduzido de (Dumur *et al.*, 2011).**

Até agora, inúmeros compostos tais como surfactantes, polímeros, ciclodextrinas e tióis têm sido utilizados para modificar as AuNP visando melhorar a estabilidade, dispersibilidade e biocompatibilidade. Em comparação com outros compostos como o citrato que se adsorve na superfície das AuNP, os tióis (PEG-SH, glutationa, cisteína, cistamina, ditiotretol, entre outros.) melhoram a estabilidade e dispersibilidade das AuNP em solução aquosa, pois os grupos tiol destes compostos podem ligar-se covalentemente à superfície através da ligação Au-S (Bertilsson e Liedberg, 1993; Creczynski-Pasa *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012)

A estabilidade das AuNP têm sido avaliada em diferentes valores de pH, temperatura, concentrações de sais e com diferentes tipos de ligantes na superfície, durante a purificação, em particular, após a remoção de quantidades substanciais do agente estabilizante. Já foi relatado que a agregação de AuNP acarreta um deslocamento dramático para o vermelho no máximo de absorção no UV-Vis. Este fenômeno ocorre devido ao encurtamento significativo da distância entre as nanopartículas, podendo-se rastrear por espectrofotometria UV-Vis, além de avaliar a aglomeração da formulação por DLS (Balasubramanian *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).



### 3 DETALHES EXPERIMENTAIS

#### 3.1 Materiais

Hidrogênio tetracloroaurato triidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 99,9%), Hidróxido de Sódio, Cloreto de ferro (II), Cloreto de ferro (III), Hidróxido de Amônia, Hesperetina, Diosmina, Rutina, Naringenina, Quercetina e Hesperidina foram adquiridas da Sigma Aldrich; a água ultrapura Tipo I utilizada para a preparação das soluções foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (resistividade 18,2 M $\Omega$ .cm). Para a remoção de potenciais sítios de nucleação artificial, toda a vidraria foi tratada com água régia (3:1 em volume de HCl e  $\text{HNO}_3$ ) e lavada três vezes com água deionizada (Tai *et al.*, 2011).

#### 3.2 Síntese das nanopartículas de ouro

O  $\text{HAuCl}_4$  foi dissolvido em água tipo I (38 0,1 molL<sup>-1</sup>) e a hesperetina foi dissolvida em hidróxido de sódio 0,1 molL<sup>-1</sup>, borbulhada previamente com  $\text{N}_2$ , durante 20 minutos, para obter uma solução de 38 mmolL<sup>-1</sup>. Um volume exato da solução de  $\text{HAuCl}_4$  foi adicionado à solução do agente redutor a temperatura ambiente (25°C) e sob agitação (200 rpm) ajustando a um volume final de 1000  $\mu\text{L}$ , mantendo as misturas da reação em agitador orbital durante pelo menos 30 minutos. As suspensões obtidas foram purificadas por centrifugação a 6000  $\times$  g por 7 min e posteriormente ressuspensas em água ultrapura. O teor de ouro foi medido por Espectroscopia de absorção atômica de chama FAAS.

Com o objetivo de ajustar as condições experimentais para a síntese, aplicou-se um delineamento experimental fatorial completo 3  $\times$  3 (dois fatores em três níveis) ver apêndice A. No desenho, dois fatores foram variados em três níveis, sendo esses: concentração de precursor (1, 4 e 7 mmolL<sup>-1</sup>) e concentração de hesperetina (1, 4, 7 e mmolL<sup>-1</sup>). Os tratamentos estatísticos, bem como a análise de variância dos resultados, foram obtidos usando o pacote de software Minitab (StatSoft, Oklahoma, EUA). Após a análise do delineamento experimental, as condições ideais para a síntese de nanopartículas de ouro auto-estabilizadas com hesperetina HtAuNP podem ser resumidas da seguinte forma:  $\text{HAuCl}_4$  e hesperetina 4 mmolL<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente por 25 min e agitação moderada a 200 rpm.

### 3.3 Síntese das nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_m\text{O}_n$ ) foram sintetizadas utilizando o método de hidrólise e co-precipitação, a partir de sais de Fe (II) e Fe (III) reportado por Chen (Chen *et al.*, 2011) em solução aquosa, com algumas modificações. Para isso, 5 ml de uma solução contendo  $0,64 \text{ molL}^{-1}$  de  $\text{FeCl}_3$  e  $0,32 \text{ molL}^{-1}$  de  $\text{FeCl}_2$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em  $\text{HCl } 0,1 \text{ molL}^{-1}$  foi adicionado lentamente ( $0,5 \text{ ml/min}$ ) a um volume de 50 ml de uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH } 1,5 \text{ molL}^{-1}$  pH 9,0 em água ultrapura, na qual foi borbulhado nitrogênio por 15 min. A temperatura no reator foi controlada entre  $30\text{-}33 \text{ }^\circ\text{C}$  e a mistura foi deixada sob agitação por 30 min, sob vácuo. Após a sedimentação das nanopartículas, utilizou-se um ímã permanente de neodímio 35 MGOe para separação magnética, com posterior lavagem até pH 7,0 e, em seguida, foram armazenadas em água até a sua utilização para procedimentos de deposição de ouro.

A relação molar  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  fixada em 0,5 favorece a formação de nanopartículas de óxido  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) sobre o  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maguemita). Porém, nenhum controle na atmosfera foi feito durante a armazenagem das suspensões de nanopartículas produzidas, já que, através do trabalho de Lyon (Lyon *et al.*, 2004), sabe-se que o ouro dificilmente nucleia na superfície de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). A nucleação só acontece quando a magnetita é oxidada parcial ou totalmente para  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , através da exposição ao ar das nanopartículas de magnetita, levando a formação de maguemita pela via de difusão de cátions (Laurent *et al.*, 2008).

Depois de preparadas e lavadas, as nanopartículas sofrem agregação, sendo o diâmetro hidrodinâmico ponderado em número de  $\text{Fe}_m\text{O}_n$  de 800 nm. Indicando uma pobre estabilização da superfície pelo contra íon  $\text{NH}_4$ , já foi demonstrado que somente os íons tetrametilamônio (em condições altamente alcalinas, pH 10,0-13,0), perclorato ou nitrato (pH 1,0-3,5) são bons contra íons para estabilizar as nanopartículas, em contraste com o  $\text{Cl}^-$  e o  $\text{Na}^+$  que dissolvem ou floculam o sistema (Cabuil, 2006; Lucas *et al.*, 2007)

### 3.4 Síntese do compósito de óxido de ferro/ouro

O compósito de nanopartículas de óxido de ferro e ouro foi sintetizado pela deposição de Au reduzido pelo flavonoide hesperetina sobre a superfície de nanopartículas de óxido de ferro. Um volume exatamente medido e equivalente a 2 mg de sólidos diluído até 8,2 ml foi adicionado em um becker com 1,1 ml de uma solução de  $\text{HAuCl}_4$  ( $38 \text{ mmolL}^{-1}$ ). A mistura foi sonicada a uma potência de 3 watts, durante 10

minutos, em banho de gelo. Posteriormente foram adicionados 2 mg de hesperetina e o pH foi ajustado para 9,0 com NaOH 0,1 molL<sup>-1</sup> e deixadas sob agitação (200 rpm) por 20 minutos. As nanopartículas foram deixadas assentar sendo separadas magneticamente usando um ímã permanente de neodímio 35 MGO. Posteriormente foram lavadas até pH 7,0 e armazenadas até a caracterização. Visando aplicações na área biomédica, tamanhos na faixa 20-100 nm foram considerados aceitáveis.

### 3.5 Métodos de caracterização

#### 3.5.1 Espectrofotometria UV-Visível

A caracterização por espectrofotometria UV-Visível das suspensões de nanopartículas foi realizada num espectrofotômetro Picodrop100. As medidas foram feitas na faixa de comprimentos de onda entre 400-800 nm usando ponteiras de polímero com uma trajetória de 1 mm. A limpeza das ponteiras foi realizada antes da utilização, por sonicação, durante 5 minutos em água deionizada. Em algumas ocasiões, os espectros foram normalizados para permitir comparações entre as amostras. (Adotando o valor máximo de cada espectro como 100% e o menor como 0%).

No caso dos compósitos de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Au o curso da reação foi avaliado visualmente pela cor resultante do coloide, as suspensões azuis foram descartadas. O espectro foi registrado tanto imediatamente ao final da reação, como depois de três lavagens com água tipo I, com o objetivo de confirmar a redução H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> para ouro metálico e eliminar os coloides nos que houve segregação das fases ouro e o óxido de ferro.

#### 3.5.2 Análises de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho das nanopartículas foi obtida *in situ* por medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizadas a 25°C em triplicata utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) com uma fonte laser He-Ne a 633,3 nm e arranjo óptico a 173°. Todas as amostras foram medidas em cubeta de quartzo, lavada previamente com água régia e enxaguada com água tipo I. Em todas as condições experimentais, a viscosidade da suspensão foi assumida como igual à da água e para os cálculos da distribuição do tamanho ponderados em volume e número, para o comprimento de onda 633 nm, o componente real do índice de refração do ouro a adotado foi 0,18295, enquanto valor médio de absorção foi 3,4362 (Johnson e

Christy, 1972). No caso da maguemita, o componente real do índice de refração foi 2,63 e a absorção 0,2 (Kunz *et al.*, 2013).

### 3.5.3 Medidas de potencial zeta

A carga superficial (potencial zeta) das nanopartículas sintetizadas foi determinada usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido), medindo a sua mobilidade eletroforética a 25 °C. Para os cálculos, foram usadas aquisições monomodais ajustadas de acordo com a equação de Smoluchowski (Pfeiffer *et al.*, 2014). As medidas representam a média  $\pm$  SD de triplicatas.

Os óxidos de ferro são sólidos anfotéricos que podem apresentar cargas na superfície, devido a reações de protonação ( $\text{Fe-OH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Fe-OH}_2^+$ ) e desprotonação ( $\text{Fe-OH} \leftrightarrow \text{Fe-O}^- + \text{H}^+$ ) nos grupamentos Fe-OH. Estas reações de superfície podem ser interpretadas como a adsorção específica de prótons  $\text{H}^+$  ou de íons hidroxila  $\text{OH}^-$  na interface água/sólido hidratado que induz a formação de uma dupla camada elétrica estabilizadora da superfície, sendo que a carga aumenta com o aumento da força iônica em condições ácidas e alcalinas (Tombácz *et al.*, 2006). Assim, a mobilidade eletroforética das nanopartículas de óxido de ferro preparadas foi determinada usando Zeta Sizer Nano ZS e transformada automaticamente pelo software em valores de potencial zeta usando a equação de Smoluchowski.

### 3.5.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A forma e o tamanho do núcleo das partículas foram determinados através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usando os microscópios JEOL JEM-2100 (200 KV) e JEM-1011 (100 KV). A estrutura cristalina foi determinada com a técnica de difração de elétrons de área selecionada (SAED). As amostras foram preparadas por imersão das grades de cobre revestidas com Formvar-carbono amorfo (200 mesh) em uma suspensão diluída nanopartículas (1:1000), por vários segundos. As grades TEM foram retiradas da suspensão e deixadas para se secar ao ar. As distribuições de tamanho das HtAuNP foram determinadas a partir dos diâmetros de, pelo menos, 100 partículas a partir de uma região representativa das micrografias ampliadas, utilizando o software *ImageJ*. (Schneider, Rasband e Eliceiri, 2012).

### 3.5.5 Difração de raios X

As amostras foram caracterizadas por difração de raios X com ângulo de incidência rasante, a fim de analisar as fases presentes em um

filme fino preparado pela deposição das nanopartículas em suportes de silício. As medidas foram feitas no Laboratório de Difração de Raios-X da Universidade Federal de Santa Catarina (LDRX-UFSC), utilizando o difratômetro modelo X'Pert Pro, com acessório para filmes finos e radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,54187$ ). A configuração utilizada foi  $\theta$ -2 $\theta$ , variando entre  $20^\circ$  e  $100^\circ$  e precisão de  $0,05^\circ$ .

### 3.5.6 *Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS)*

As análises de química de superfície foram realizadas em um espectrômetro Thermo Scientific ESCALAB 250xi. Foi utilizado o ânodo de Al (radiação monocromática  $\text{K}\alpha$  - energia de 1486.6 eV e uma largura de linha típica de 0,83 eV). Para as medições de XPS, foram preparados filmes por deposição de uma gota dos coloides purificados por centrifugação em *wafers* de silício limpos e, em seguida, secas ao ar. A pressão típica na câmara do espectrômetro foi de  $7 \times 10^{-9}$  mbar. As energias de passagem (*pass energy*) do analisador foram 100 e 25 eV no modo *survey* e no modo *scan* de alta resolução, respectivamente. O possível carregamento da amostra foi corrigido assumindo uma energia de ligação constante de 285 eV para o pico relativo ao orbital C 1s do carbono adventício. Todos os picos foram ajustados usando curvas de Gauss-Lorentz (GL30) após a remoção de elétrons de fundo, utilizando o método Shirley.

### 3.5.7 *Espectroscopia de absorção atômica de chama FAAS*

As concentrações de ouro nas suspensões de HtAuNP foram determinadas usando espectrômetro de absorção atômica com atomização em chama com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS FAAS), ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha), usando um comprimento de onda de absorção de 242,795 nm. Para geração da chama, foram utilizadas misturas de ar-acetileno. Os parâmetros instrumentais da atomização da chama no HR-CS FAAS foram otimizados automaticamente e o fluxo de acetileno e a altura dos queimadores foram  $40 \text{ Lh}^{-1}$  e 7 mm, respectivamente. O fluxo de ar foi de  $250 \text{ Lh}^{-1}$ . Para preparar as amostras, 200  $\mu\text{L}$  de HtAuNP foram centrifugadas 3 vezes a  $6000 \times g$  por 7 minutos e os *pellets* contendo as nanopartículas de ouro foram dissolvidos em água régia e diluídos até 12,0 ml. O intervalo da concentração de trabalho foi de 0,1-5,0  $\text{mgL}^{-1}$  (r 0,99956). O limite de detecção foi calculado como três vezes o desvio padrão da concentração do analito no branco ( $n = 10$ ), dividido pelo

coeficiente angular da curva de calibração e os valores LOD e LOQ do método foram 0,03 e 0,08 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 3.5.8 Estudos computacionais

Os estudos teóricos de interação entre os átomos de ouro e o flavonoide hesperetina foram executados no software Gaussian 09 (Frisch *et al.*, 2009) usando a Teoria Funcional de Densidade (DFT) (Hohenberg e Kohn, 1964; Kohn e Sham, 1965) com o funcional híbrido B3LYP (Becke, 1993; Parr e Yang, 1989; Perdew *et al.*, 1992) empregando os conjuntos de funções de base LAN2DZ para o átomo de Au e o 6-31+g (d,p) para os outros átomos. Não foram aplicadas restrições nos grupos pontuais de simetria das moléculas, permitindo uma total liberdade durante a otimização geométrica. A força e a tolerância total de energia selecionada foi de  $3 \times 10^{-4}$  a.u. e  $1 \times 10^{-6}$  a.u., respectivamente. Além disso, foram realizadas análises vibracionais a fim de confirmar que os estados estáveis dos sistemas moleculares correspondiam a mínimos globais e locais nas superfícies de energia potencial.

As estabilidades relativas de todos os grupos foram determinadas pelas energias de formação correspondentes ( $E_{\text{Form}}$ ) conforme a equação:

$$E_{\text{form}}(eV) = E_{\text{total}} - (E_{\text{Ht/Hc}} + E_{\text{Au}^{+3}}) \quad \text{Equação 3.}$$

Em que:  $E_{\text{Total}}$ ,  $E_{\text{Ht}}$ ,  $E_{\text{Hc}}$  and  $E_{\text{Au}^{+3}}$  correspondem a energia total no estado basal do complexo Au-Hesperetina, Hesperetina livre, Hesperetina chalcona livre, e o átomo de Ouro Au<sup>+3</sup>, respectivamente.

Com o objetivo de simular as condições experimentais da forma mais próxima possível e levar em consideração os efeitos do solvente, foi usado o Modelo Contínuo Polarizável (PCM) (Mennucci e Tomasi, 1997).

As energias de excitação e as forças do oscilador para as geometrias mais estáveis foram obtidas usando cálculos de DFT dependente do tempo (TD-DFT) (Bauernschmitt e Ahlrichs, 1996; Runge e Gross, 1984). Vinte transições, singleto-singleto e tripleto-tripletto, foram realizadas utilizando funcional híbrido e conjunto de base.

### 3.6 Estudos de estabilidade

A estabilidade das HtAuNP purificadas ao longo do tempo (0, 12, 24, meses) foi avaliada por espectrofotometria de absorção. Mudanças

na banda LSPR característica ao redor de 522 nm, além do surgimento de uma banda em 650 nm (sinal de aglomeração das nanopartículas de ouro.) foram examinados durante este período. O efeito da diluição foi também avaliado por adição seriada de 0,1 ml de água deionizada em 0,1 ml de solução de nanopartículas de ouro e subseqüentes medições de absorção. O efeito de centrifugar as HtAuNP 3 vezes a  $6000 \times g$  por 7 minutos foi estudado por DLS.



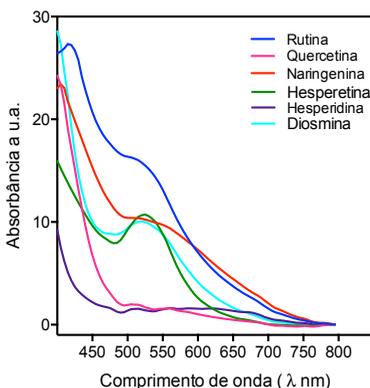
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Nanopartículas de ouro

Em uma primeira tentativa de reduzir íons de cloroaurato, usando os flavonoides e sabendo que as propriedades ópticas das AuNP dependem fortemente do tamanho, da forma e das interações entre as nanopartículas e as espécies adsorvidas na superfície, o curso da reação foi seguido no espectrofotômetro acompanhando a aparição da banda de *plasmons* de superfície (LSPR) na faixa 500-800 nm, devido à formação de nanoestruturas de Au<sup>0</sup>.

A Figura 4 mostra os espectros de UV-Vis típicos de nanopartículas de ouro produzidas por redução com H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> usando diferentes flavonoides como agentes redutores e estabilizadores a uma concentração fixa de 2 mmolL<sup>-1</sup> e uma proporção agente redutor/precursor 1:1. Embora um grande número de substâncias sejam capazes de reduzir o ouro, nem todas conseguem simultaneamente estabilizá-lo, como pode ser visto na Figura 1. Apenas diosmina e hesperetina mostraram bandas de LSPR claramente definidas, sugerindo AuNP mais homogêneas. A Hesperetina (Figura 2) é um flavonoide de amplo consumo na dieta e restrito ao gênero citrus (Gattuso *et al.*, 2007). É a aglicona flavonoide mais abundante na laranja e tangerina e, portanto, foi selecionada para dar continuidade a este trabalho.

**Figura 4. Espectros de absorção UV-Vis típicos de nanopartículas de ouro produzidas por redução de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> com flavonoides de cítricos.**

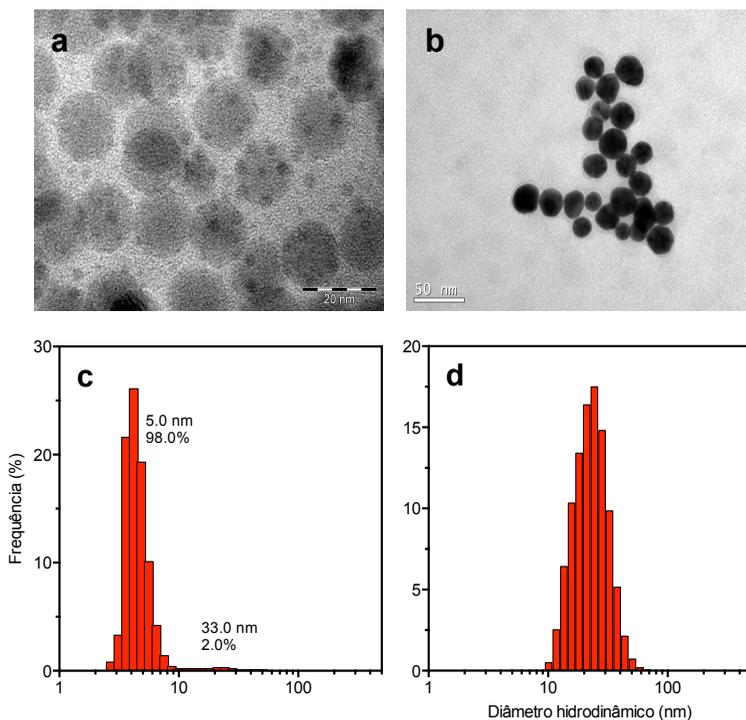


Aos flavonoides diosmina, hesperetina, hesperidina, naringenina, quercetina e rutina dissolvidos em NaOH 0,1 mmolL<sup>-1</sup> foi adicionado H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> até a concentração fixa de 2 mmolL<sup>-1</sup> e uma proporção agente redutor/precursor 1:1, em 30 minutos de reação.

Sabe-se que, durante a síntese, o tamanho das AuNP é determinado pelo ajuste de um número de fatores, entre eles o pH, a temperatura, a proporção precursor/agente redutor e as concentrações dos reagentes. No entanto, circunscrevendo-se as premissas de uma síntese verde, a variável temperatura foi limitada a condição ambiente (25 °C), considerando que os flavonoides em questão precipitam em meios ácidos, dissolvendo-os apenas em NaOH, o pH foi mantido em 11,0.

A ordem de adição dos reagentes teve um impacto significativo na síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas por hesperetina (HtAuNP). Quando o ácido cloroáurico foi adicionado, à temperatura ambiente, sobre uma solução alcalina de hesperetina (Reação 1), observou-se uma rápida formação de nanopartículas, visualizadas a olho nu como soluções coloridas transitórias que mudam inicialmente de uma cor preta para o cinzento, em seguida, para violeta e finalmente vermelho rubi. Em menos de 5 min, o resultado final foi uma suspensão polidispersa com duas populações de 3,5 nm e 15 nm medidas por TEM ou 5,0 e 33,1 nm por DLS (Figuras 5a e 5c). Em contraste, no processo inverso de adicionar a solução de hesperetina sobre a de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> a reação (Reação 2) avançou mais lentamente, chegando ao fim em cerca de 30 minutos, obtendo-se uma suspensão de nanopartículas de 15 nm medidas por TEM ou 32 nm por DLS (Figuras 5b e 5d). Entretanto, o padrão de mudança de cor das suspensões foi preservado. As HtAuNP apresentaram bandas de plasmon de superfície localizadas dentro da faixa de comprimento de onda 520-550 nm, característica de coloides de ouro contendo partículas inferiores a 100 nm (Milczarek e Ciszewski, 2012). Estes resultados são comparáveis com os resultados de Mikhlin *et al.* que observaram uma série de suspensões coloridas transitórias na síntese de nanopartículas de ouro, usando citrato como agente redutor. Neste estudo, os autores explicaram as cores transitórias pelas distâncias inter-partícula crescentes, nos intermediários na mesoescala, ou seja, entre 1-1000 nm e foram descritos como grandes agregados de nanopartículas que diminuem progressivamente de tamanho (Mikhlin *et al.*, 2011).

**Figura 5. Impacto da ordem de adição dos reagentes na síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas por hesperetina (HtAuNP).**



A solução de hesperetina foi adicionada sobre o ácido cloroáurico (I), ou o ácido cloroáurico sobre a solução de hesperetina (II) em  $\text{NaOH } 0,1 \text{ molL}^{-1}$ , na proporção molar de 4:4  $\text{mmolL}^{-1}$ . a e c) micrografias TEM das HtAuNP (reação 1) e a distribuição de tamanho, medida por DLS, ponderada em intensidade. e b e d) micrografias TEM das HtAuNP (reação 2) e a distribuição de tamanho, medida por DLS.

Com o objetivo de aprimorar a síntese de AuNP usando hesperetina como agente redutor, foi gerado um delineamento fatorial completo  $3 \times 3$  (dois fatores em três níveis) variando apenas a concentração de reagentes (1, 4, 7 e  $\text{mmolL}^{-1}$ ) e a proporção ouro hesperetina (1:1, 1:4, 1:7) mantendo a ordem de adição dos reagentes: hesperetina sobre o ouro. Como pode ser observado na Figura 4, a maioria das amostras apresentaram bandas de plasmon ou comprimentos de onda máximos ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) na faixa 520-530 sem qualquer pico adicional na região do infravermelho próximo, indicando a formação de

nanopartículas esféricas (Mody *et al.*, 2010); com exceção das amostras preparadas com ouro em excesso (4:1 e 7:1), que apresentaram picos de  $\lambda_{\text{máx}}$  fracos, em torno de 640 nm. Entretanto, após a síntese, estas suspensões tornaram-se instáveis precipitando após alguns minutos, assim, os espectros de UV-Vis e o tamanho não foram registrados.

O teor de ouro nas amostras foi medido por espectroscopia de absorção atômica de chama FAAS, após oxidação do ouro elementar das HtAuNP em água régia. O ouro foi completamente reduzido e a concentração de ouro recuperado das nanopartículas esteve na faixa 95,2-100,7% da concentração originalmente utilizada nas misturas de reação, o que corrobora a redução eficiente de HtAuCl<sub>4</sub> a ouro elementar pela hesperetina (Tabela 3).

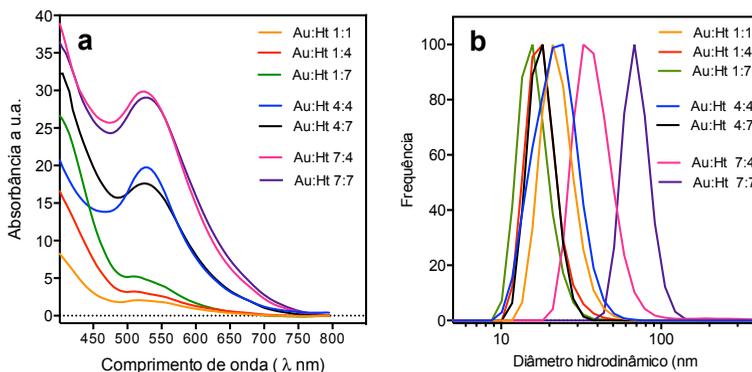
**Tabela 3. Rendimento da reação de redução do HtAuCl<sub>4</sub> pelo flavonoide hesperetina medido por FAAS**

Proporção Au:Ht mmolL <sup>-1</sup>	Teor esperado	Teor de ouro (µg/ml)	Rendimento da reação %
1:1	3,300	3,193 ± 0,169	97,2
1:4	3,300	3,324 ± 0,067	100,7
1:7	3,300	3,286 ± 0,114	99,6
4:1	13,200	12,392 ± 0,119	93,9
4:4	13,200	12,796 ± 0,487	96,9
4:7	13,200	12,373 ± 0,373	93,7
7:1	22,983	22,062 ± 1,369	96,0
7:4	22,983	22,351 ± 1,021	97,2
7:7	22,983	21,884 ± 0,115	95,2

Na Figura 6a, os espectros de UV-Vis mostram que, quando a concentração do precursor de ouro é fixada a 1 mmolL<sup>-1</sup> deixando as concentrações de hesperetina variarem desde 1 até 7 mmolL<sup>-1</sup>, os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  ficam perto de 520 nm. Em contraste, ao aumentar a concentração de precursor e de hesperetina para 4 e 7 mmolL<sup>-1</sup>, aumentaram-se as velocidades de reação e obtiveram-se suspensões mais concentradas, apenas com relação molar de 4:4 a banda SPR  $\lambda_{\text{máx}}$  522 nm e exibiu a largura de pico a meia altura (FWHM) mais estreita, indicando uma maior homogeneidade dos coloides. As distribuições de tamanho, medidas por DLS (Figura 6b) mostram que o diâmetro hidrodinâmico varia consideravelmente conforme o aumento da concentração dos reagentes e o tamanhos médios de partícula ficaram na faixa de 14-68 nm. Também foi observada uma diminuição no tamanho quando a uma concentração fixa de precursor (1 e 4 mmolL<sup>-1</sup>) foi

adicionado excesso de redutor. Vale a pena notar que, na mistura de reação ouro:hesperetina na proporção 7: 4, o ouro foi completamente reduzido (97,2%) para produzir HtAuNP estabilizadas, ou seja, mais do que os três grupos hidroxila da hesperetina seriam necessários na redução, indicando a natureza autocatalítica da reação.

**Figura 6. Espectros no UV-Vis das HtAuNP produzidas em diferentes condições e análise de distribuição de tamanho.**



**a) pela adição de diferentes concentrações de ácido cloroáurico (1, 4, 7 e  $\text{mmolL}^{-1}$ ) sobre soluções alcalinas de hesperetina (1, 4, 7 e  $\text{mmolL}^{-1}$ ) registados até o minuto 60 de reação. b) Distribuições de tamanho medidas por DLS**

A mistura de reação a uma proporção molar de 1 e concentração de  $4 \text{ mmolL}^{-1}$  gerou suspensões de nanopartículas com tamanho razoável na escala nanométrica e uma boa distribuição de tamanho. O crescimento das partículas foi monitorado ao longo de 60 minutos tomando espectros a cada 5 minutos na faixa comprimento de onda de 400-800 nm. Os espectros apresentados na Figura 7a mostram um máximo de absorção devido a banda de plasmon de superfície  $\lambda_{\text{máx}}$  aparecendo após 30 s a 630 nm, o qual foi deslocando-se gradualmente para o azul, observando-se um aumento na intensidade de absorção que atingiu um valor máximo em 522 nm. Embora a reação tenha continuado por 22 minutos adicionais, para um total de 82 minutos, não foram observadas alterações significativas na posição da banda  $\lambda_{\text{máx}}$ . Após 30 minutos, da mesma forma, o valor de absorbância medido em 522 nm ( $A_{522}$ ) atingiu o seu máximo nesse mesmo período de tempo. Além disso, a absorção no comprimento de onda de 650 nm ( $A_{650}$ ), que é considerada como um indicio de agregados, teve um ligeiro aumento

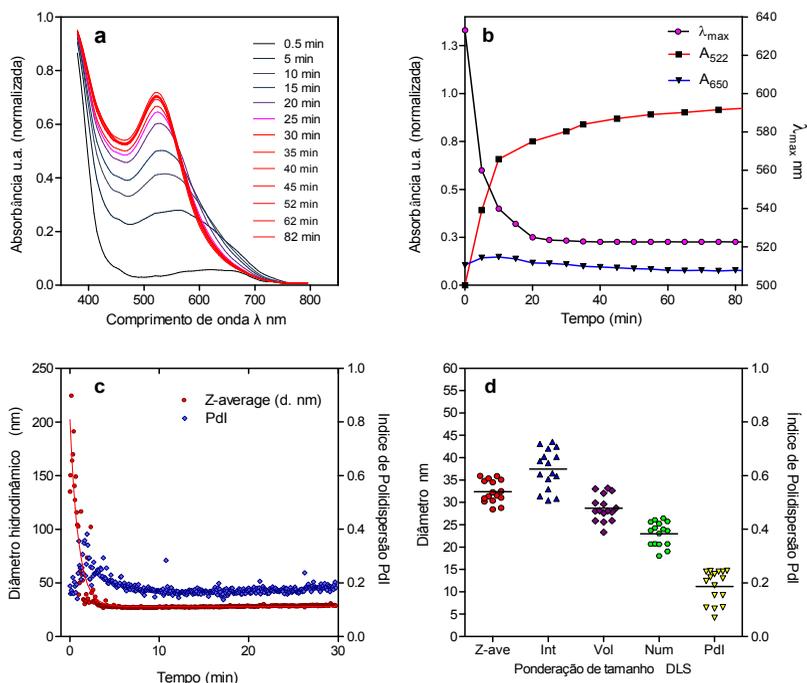
no começo, diminuindo para um valor  $< 0,2$  antes dos 5 min, como mostra a Figura 7b.

Individualmente a técnica de UV-Vis, não é suficiente para determinar todos os parâmetros necessários na descrição da cinética de formação das AuNP desde a fase inicial. (Koerner *et al.*, 2012) Por isso, a avaliação da cinética de formação das HtAuNP foi também realizada a partir das medidas de DLS, baseada nos dados de diâmetro hidrodinâmico (*Z-average*). Na Figura 7c mostra-se a mudança no tempo do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão (Pdl). Devido ao início rápido da redução, a análise das curvas obtidas permitiu somente a diferenciação de duas etapas na formação HtAuNP, isto é, a nucleação e o crescimento autocatalítico sem o período de incubação, o que pode ser explicado pela alta concentração dos reagentes, como anteriormente descrito e discutido por Streszewski na redução de HtAuCl<sub>4</sub> usando glicose (Streszewski *et al.*, 2012). No início da reação, as medidas de DLS evidenciaram a aparição de partículas de até 250 nm nas suspensões de cor preta, que evoluíram aproximando-se ao tamanho final das HtAuNP medidas individualmente usando TEM, em aproximadamente 10 min, como será confirmado a seguir. Este comportamento está de acordo com as observações feitas no UV-Vis, na que, as suspensões coloridas poderiam ser explicadas pela presença de agregados como relatado por Mikhlin, (Mikhlin *et al.*, 2011) que no estudo dos mecanismos de nucleação e crescimento de cristal em nanopartículas de ouro sintetizadas usando citrato descreve a aparição de estruturas intermediárias com um diâmetro hidrodinâmico médio de até 125 nm, responsáveis pela cor preta das soluções coloridas iniciais. Entretanto, no DLS as partículas pareceram crescer até o tamanho final imediatamente depois do início da reação, enquanto a concentração das partículas deste tamanho aumentaram com o tempo de reação, um desvio da teoria clássica de formação de nanopartículas, que acredita-se acontece em múltiplos passos que incluem a incubação, crescimento da partícula e amadurecimento de Ostwald. (Koerner *et al.*, 2012)

O desenvolvimento de processos de automontagem de estruturas na nano, meso- e microescala em solução representa um tema de pesquisa importante na área da ciência dos materiais. Idealmente, qualquer método desenvolvido que vise atender à demanda crescente de NP para qualquer uso pretendido, deve ser altamente reprodutível em controlar a arquitetura, o tamanho, a morfologia e a homogeneidade de estruturas obtidas. Na Figura 7d é apresentado um gráfico resumo dos dados obtidos para sínteses independentes ( $n = 16$ ). Os resultados apresentados nesta figura incluem o *Z-average* (*Z-ave*), o diâmetro

médio obtido a partir da distribuição de tamanho ponderados pela intensidade da radiação espalhada (Int) assim como em volume (vol) e número (Nm) de nanopartículas, juntamente com o índice de polidispersão. Os resultados mostram que o método é altamente reprodutível, exibindo coeficientes de variação inferiores a 15% para a medida de diâmetro médio.

**Figura 7. Cinética de formação das HtAuNP e reprodutibilidade do método de síntese**



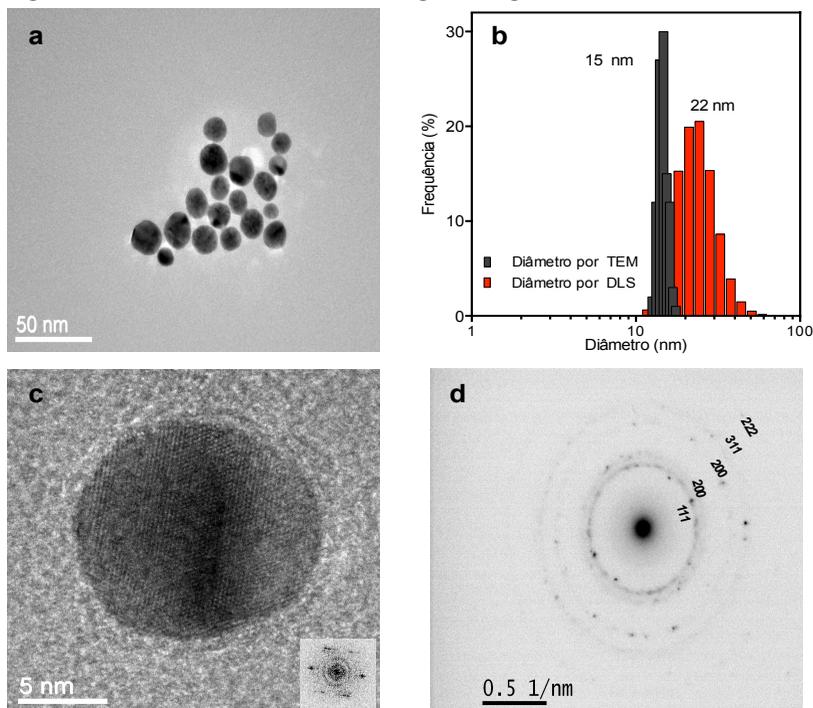
a) Espectros UV-Vis de HtAuNP foram tomados após 0,5 min (suspensão preta), 5 min (cinza escura), 10 min (violeta escura), 15 min (violeta), 20 min (magenta), 25 min e 30 min (vermelho rubi). b) Posição ( $\lambda_{max}$ ) da banda de plasmon e absorção em 522 e 650 nm c) Mudanças ao longo do tempo no diâmetro hidrodinâmico (*Zeta-average*) e índice de polidispersão por DLS Os resultados representam a média de no mínimo 3 experimentos independentes. e d) Reprodutibilidade no tamanho de diferentes lotes (n=16) de HtAuNP preparadas pela reação à temperatura ambiente de uma mistura de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> e hesperetina na razão molar de 4:4 mmolL<sup>-1</sup>, pH 11.

A forma e a distribuição de tamanho ponderado pelo número HtAuNP foram determinados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A Figura 8a mostra uma imagem típica das nanopartículas sintetizadas e a distribuição de tamanho de histograma correspondente a análise de 200 partículas, em diferentes campos está representado na Figura 8b. É evidente a partir desta figura e a imagem de alta resolução na Figura 8c que as HtAuNP apresentam forma esférica, estão bem separadas umas das outras e com uma distribuição de tamanho estreita centrada em  $15 \pm 1$  nm.

Pode ser observada a natureza cristalina das HtAuNP na Figura 8c e no padrão de difração de elétrons de área selecionada (SAED) na Figura 8d. Infere-se a partir do padrão SAED a presença de várias HtAuNP na área selecionada. Essas nanopartículas são cristalinas e os anéis de difração de elétrons podem ser atribuídos aos planos *hkl* (111), (200), (220), (311) e (222) da rede cristalina cúbica de face centrada do ouro metálico. Além disso, a distância interplanar medida na imagem de alta resolução mostra uma orientação preferencial (inserto figura 8c), no plano (111) com distância interplanar medida experimentalmente de 2,35 nm.

Vários autores tem apontado que ao secar e armazenar as NP em superfícies, como as grades de TEM, podem ocorrer alterações que não representam com precisão a natureza da amostra na dispersão líquida. (Wallace *et al.*, 2012). Os histogramas de distribuição de tamanho ponderadas em número das medidas de DLS e TEM para o mesmo conjunto de HtAuNP foram comparados e apresentados na Figura 8b. Ambos as distribuições apresentam um bom ajuste à distribuição normal, contudo observou-se um deslocamento do diâmetro médio de 15 nm medido usando TEM para 22 nm e um PDI de 0,187 no DLS, que é explicado pelas características inerentes a cada técnica. Através da técnica de DLS mediu-se o núcleo de ouro somado à hesperetina e/ou seus produtos de oxidação quimiossorvidos na superfície, enquanto o TEM mostra apenas o núcleo de Au. Alternativamente, pode se tratar de um problema de resolução na técnica que DLS que não discrimina duas partículas em contato próximo, o que é ainda mais evidente se compararmos com o valor *Z-average* de 32,5 nm na Figura 7d. Contudo, os resultados apresentados são idênticos aos relatados por Mahl *et al* para AuNP de 15 nm (TEM) (Mahl *et al.*, 2011).

**Figura 8 Análise do tamanho, morfologia e carga das HtAuNP.**

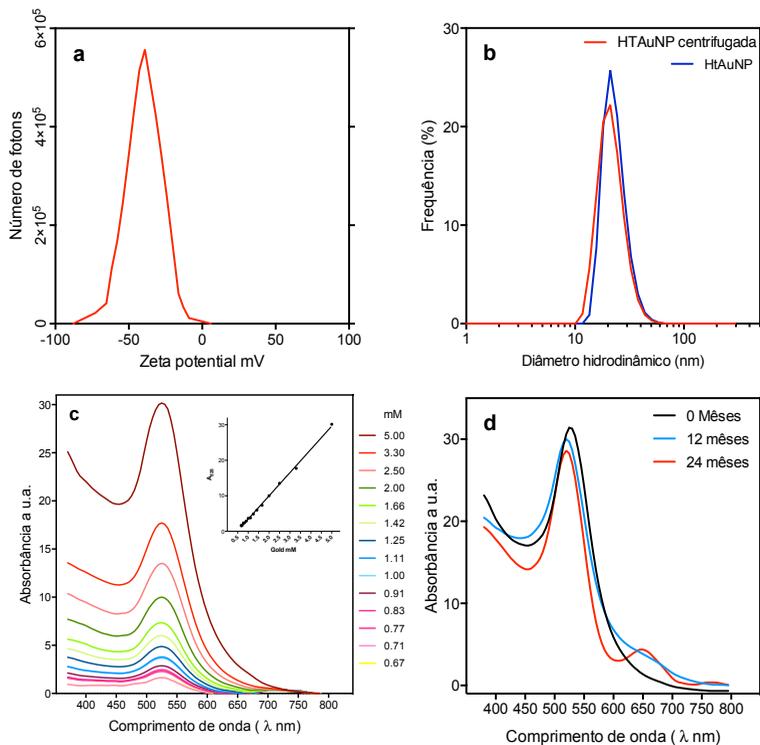


**a) Imagem TEM das HtAuNP diluídas (1:1000), b) distribuição de tamanho das HtAuNP ponderada em número, por TEM (barras cinza) e DLS (barras vermelhas) c) imagem de alta resolução, e d) padrão SAED.**

Geralmente, aceita-se que os colóides que mostram um valor de potencial zeta fora do intervalo de  $-25$  a  $+25$  mV são estáveis e que a aglomeração só ocorre quando a atração entre nanopartículas excede as forças de repulsão quando o potencial zeta aproxima-se ao ponto de carga zero (Ivanov, 2011). Como consequência, a medida da carga de superfície é uma propriedade útil para prever a estabilidade das nanopartículas sob várias condições. As HtAuNP aqui apresentadas mostraram uma camada carregada negativamente de  $-44$  mV (Figura 9a) que as mantém separadas umas das outras. As HtAuNP mostram boa estabilidade frente a centrifugação (Figura 9b) e a diluição (Figura 8c) e a estabilidade é mantida por até pelo menos um ano, mostrando um mínimo de aglomeração, evidenciado pela aparição de uma banda em  $650$  nm (Figura 9c, linha vermelha). Estes fatos explicam a estabilidade

em longo prazo das HtAuNP, que é superior a um ano, como evidenciado na Figura 9

**Figura 9. Efeito da diluição e centrifugação na estabilidade e armazenamento das HtAuNP.**

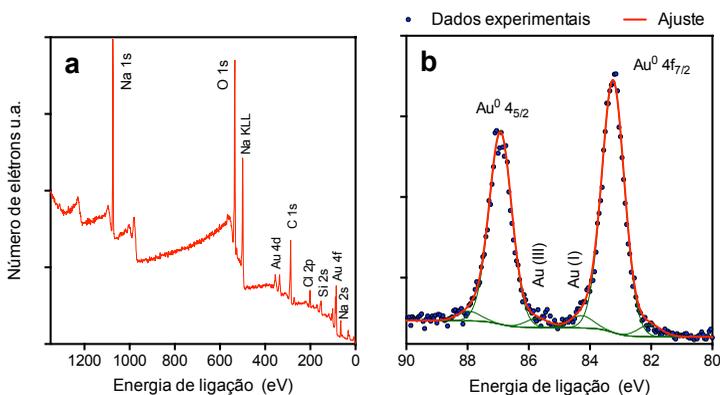


**a) diluição, b) centrifugação ( $6000 \times g$   $3 \times 7$  min), e c) condições de armazenamento de laboratório ( $2-8^\circ C$  durante 2 anos). As nanopartículas HtAuNP foram preparadas pela reação à temperatura ambiente de uma mistura de  $H AuCl_4$  e hesperetina na razão molar de 4:4  $mmolL^{-1}$ , pH 11.**

Em um trabalho prévio, Ivanov *et al*, (Ivanov, Bednar e Haes, 2009; Ivanov, 2011) sugeriram que, enquanto os valores de SPR e dados de potencial zeta fornecem informações importantes sobre a composição, concentração e carga efetiva em nanomateriais, informações mais precisas relacionadas a uma caracterização fina da interface inorgânica-orgânica deveriam ser obtidas através de outras técnicas, como a Espectroscopia de emissão de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).

Os resultados das análises de XPS das HtAuNP são apresentados na Figura 10. O espectro de fotoemissão, na faixa de energia de ligação de 0-1400 eV da Figura 10a, mostra claramente que o filme depositado sobre uma superfície de Si é composto de ouro, carbono, oxigênio, sódio, cloro e silício. Embora purificadas cuidadosamente, observou-se também sódio e cloro nas HtAuNP, presença que pode ser atribuída à interação eletrostática entre as cargas negativas na superfície das HtAuNP e os contra-íons de  $\text{Na}^+$ , enquanto o resíduo de  $\text{Cl}^-$  poderia ser ligado a moléculas de  $\text{AuCl}_4$  da reação. Para avaliar o estado de valência de ouro no filme fino, a banda do orbital 4f do Au foi estudada numa faixa estreita de energia de ligação (80-90 eV). Os picos acoplados  $4f_{7/2,5/2}$  apareceram em energias de ligação de 84,38 e 88,07 eV, apresentando um desdobramento spin-órbita de 3,68 eV e uma razão de área de 0,75 em boa concordância com os valores encontrados na literatura para o ouro metálico, (Herranz *et al.*, 2009) juntamente com algumas contribuições menores de  $\text{Au}^{1+}$  (85.61 89.34) e  $\text{Au}^{3+}$  (83.13 86.78), evidenciando a interação Au-O de forma similar ao encontrado por (Mikhlin *et al.*, 2011) ver Figura 10b.

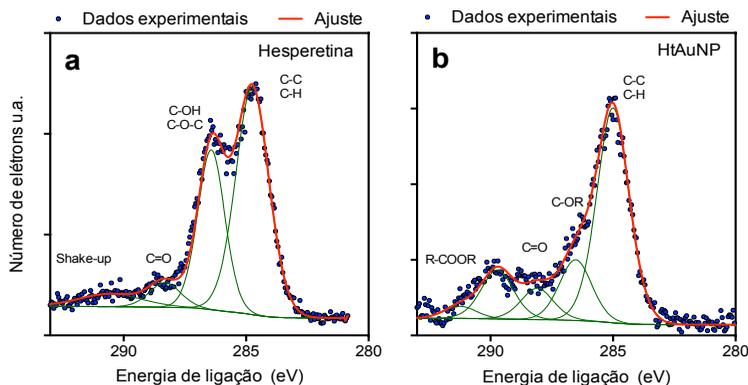
**Figura 10. Espectros de fotoemissão total e relativo ao orbital Au 4f de filmes de HtAuNP depositados em substrato de silício.**



As HtAuNP foram purificadas por centrifugação 3 vezes  $6000 \times g$  por 7 min e depositadas em substrato de silício a) na faixa de energia de ligação de 0-1400 eV e b) Envelope do orbital 4f do Au e o respectivo ajuste de forma de linha do espectro de fotoemissão usando curvas Gauss-Lorentz (GL30).

Da mesma forma, foram usadas as energias de ligação do orbital atômico C1s mostradas na Figura 11, para determinar a presença e o estado molecular da hesperetina e de um filme de HtAuNP. No caso da hesperetina depositada em silício Figura 11a, o ajuste dos picos dentro do envelope C1s permitiu diferenciar claramente três tipos de carbono, CH=Ar (285,2 eV 53%), C-O-R (286,6 eV 40,1%), C=O (288,4 eV 6,3%) da hesperetina e uma banda larga em 291,1 eV relativo ao *shake-up* devido a transições  $\pi$ - $\pi$ , já descrito na molécula de flavona (Dinya e Lbvaib, 1992). Nos filmes de HtAuNP, além dos picos já referidos da hesperetina, advertiu-se a presença de um pico em 290,2 eV característico de carboxilato (-COOR), ver Figura 11b. Embora não haja grupos carboxilato na molécula de hesperetina, a reação redox entre o  $Au^{3+}$  e a hesperetina, além da interação orgânico-inorgânico sobre a superfície metálica, poderia ter induzido o rearranjo da estrutura molecular da hesperetina conduzindo à deformação estrutural até a quebra de algumas moléculas adsorvidas. Essa hipótese é suportada nas simulações computacionais. No entanto, quando foi realizada a reação redox Folin Ciocalteu com o sobrenadante das HtAuNP desestabilizadas com NaCl concentrado, foi encontrado um conteúdo total de polifenóis de 1,6 mmol L<sup>-1</sup> (equivalente a 40% do teor inicial da Ht adicionada).

**Figura 11. Espectro de fotoemissão relativo ao orbital C 1s de filmes hesperetina e HtAuNP depositados em substrato de silício.**

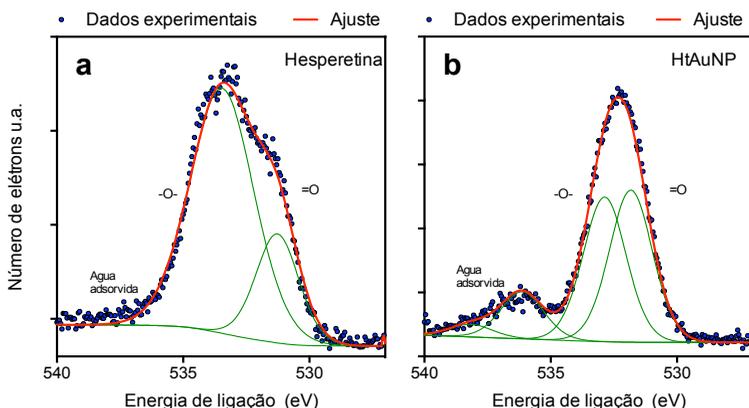


As HtAuNP foram purificadas por centrifugação 3 vezes 6000 × g × 7 min mostra-se o envelope do orbital C1s e o ajuste de forma de linha do espectro de fotoemissão usando curvas Gauss-Lorentz (GL30) de a) de um filme de hesperetina e b) um filme de HtAuNP.

Na Figura 12 mostra-se a comparação entre os espectros obtidos na região das transições O 1s de filmes de hesperetina (12a) e HtAuNP (12b). O ajuste de linha permitiu diferenciar as bandas relativas aos átomo de oxigênio formando ligação simples (533.4 eV) e ligação dupla (531.0) com os átomos de carbono da hesperetina. Os resultados estão de acordo com os reportados para o núcleo de flavona e com o observado na análise do envelope C 1s.

Juntos, os resultados de XPS e de DLS confirmam a presença da hesperetina e de produtos de oxidação na superfície das HtAuNP.

**Figura 12. Espectro de fotoemissão relativo ao orbital O 1s de filmes hesperetina e HtAuNP depositados em substrato de silício.**



As HtAuNP foram purificadas por centrifugação 3 vezes  $6000 \times g$  7 min mostra-se o envelope do orbital O 1s e o ajuste de forma de linha do espectro de fotoemissão usando curvas Gauss-Lorentz (GL30) de a) de um filme de hesperetina e b) um filme de HtAuNP.

## 4.2 Simulações computacionais

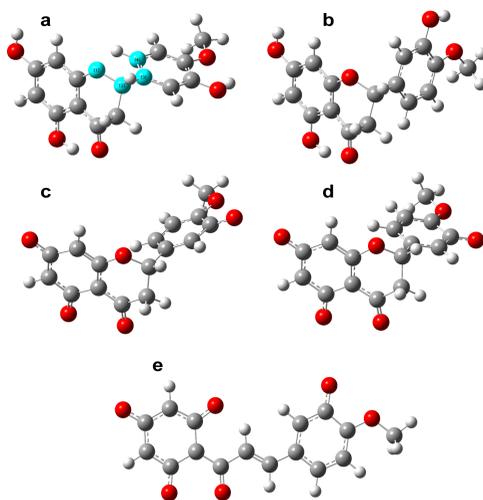
O objetivo de realizar as simulações foi fornecer uma evidência teórica de como ocorre a interação entre o íon  $Au^{+3}$  e a hesperetina (Ht) que leva à redução e estabilização das nanopartículas de ouro, simulando as condições experimentais o mais próximo possível. Por isso, a hesperetina chalcona (Hc) também foi considerada nos cálculos. Em uma segunda instância, foi estudada a interação mudando as proporções Au:Ht/Hc e finalmente as geometrias estruturais estáveis. Em todos os casos, foi avaliada a transferência de carga total entre os átomos de ouro e as moléculas do flavonoide Ht e da chalcona Hc. Finalmente, são

apresentadas as propriedades ópticas das estruturas mais relevantes obtidas a partir de cálculos de Teoria de Funcional de Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT).

#### 4.2.1 Molécula hesperetina isolada

Nesta seção, comparam-se as diferenças entre a molécula de hesperetina em fase gasosa e os efeitos do solvente calculados usando o modelo polarizável contínuo (PCM). Em termos gerais, a molécula hesperetina é bastante rígida, uma vez que não existem muitas ligações rotáveis na estrutura. A principal diferença, encontrada entre as duas fases, localiza-se no grupo fenil em torno do carbono alfa do pirano (anel B) que apresenta livre rotação. Este último gera duas conformações a) e (b) para a fase gasosa e PCM, respectivamente, como mostrado na Figura 13.

Figura 13. Estruturas geométricas finais otimizadas da hesperetina.



Em a), fase gasosa e (b) Solvente, da hesperetina fenolato  $Ht^{-3}$  em c) fase gasosa e (d) água e da hesperetina chalcona na forma aniônica  $Hc^{-4}$  e Em e) em solvente. Destacam-se em cor azul ciano na estrutura a), os átomos OCCC que determinam o ângulo diedro apresentado na Tabela 4.

O ângulo diedro  $\varphi$  é definido pelos átomos OCCC, em destaque na Figura 5a e foi de  $-7,76^\circ$  na fase gasosa e de  $55,64^\circ$  em solvente (PCM). Em relação à estrutura eletrônica, não foram localizadas

mudanças importantes, uma vez que a diferença de energia entre o HOMO-LUMO é de 4,33 eV na fase gasosa e de 4,20 eV em solvente (PCM), respectivamente.

**Tabela 4. Energias HOMO-LUMO, diferença de energia (Gap), ângulo diedro, energias de formação e as cargas Mülliken para o átomo de ouro.**

Sistema	HOMO (a.u.)	LUMO (a.u.)	GAP (eV)	$\Phi$ (°)	Energia total (a.u.)	
Ht (gás)	-0.2244	-0.0653	4.33	-7.76	-1069.5397	
Ht (PCM)	-0.2268	-0.0723	4.20	55.64	-1069.5587	
Ht <sup>3</sup> (gás)	0.1779	0.2138	0.98	-56.80	-1067.5831	
Ht <sup>3</sup> (PCM)	-0.1606	-0.0103	4.09	13.17	-1068.1053	
Htc <sup>4</sup> (PCM)	-0.1336	-0.0323	2.76	-	-1028.2897	
Sistema	HOMO (a.u.)	LUMO (a.u.)	GAP (eV)	$\Phi$ (°)	Energia de Formação (eV)	Carga Au
Au <sup>+3</sup> + Ht <sup>3</sup> (Gás) (1)	-0.2461	-0.1620	2.29	-	-9.90	0.392
Au <sup>+3</sup> + Ht <sup>3</sup> (PCM) (1)	-0.2330	-0.1195	3.09	-	-7.91	0.606
Au <sup>+3</sup> + Ht <sup>3</sup> (Gás) (2)	-0.2312	-0.1505	2.20	83.54	-9.89	0.289
Au <sup>+3</sup> + Ht <sup>3</sup> (PCM) (2)	-0.2146	-0.1855	0.79	56.49	-7.86	0.623
2Au <sup>+3</sup> + Ht <sup>3</sup> (Gás)	-0.5616	-0.5426	0.52	-39.76	-18.64	0.786/0.618
2Au <sup>+3</sup> + Ht <sup>3</sup> (PCM)	-0.2666	-0.2267	1.09	36.99	-15.62	0.817/0.872
Au <sup>+3</sup> + 2Ht <sup>3</sup> (PCM)	-0.1661	-0.1199	1.26	97.33	-7.96	0.947
Au <sup>+3</sup> + Hc <sup>4</sup> (PCM)	Fragmentação da molécula					
Au <sup>+3</sup> + 2Hc <sup>4</sup> (PCM) (3)	-0.1653	-0.0940	1.94	-17.87	-218.0	0.834
Au <sup>+3</sup> + 2Hc <sup>4</sup> (PCM) (4)	-0.1553	-0.1452	0.28	34.56	-217.4	0.277
2Au <sup>+3</sup> + Hc <sup>4</sup> (PCM)	Fragmentação da molécula					

#### 4.2.2 Moléculas de Hesperetina carregadas

Como mencionado no começo da seção, dependendo das condições experimentais, o pH irá influenciar o grau de desprotonação da molécula de hesperetina. No que diz respeito a soluções alcalinas, a hesperetina encontraria-se totalmente desprotonada na forma Ht<sup>3</sup> ou sofrendo rearranjo até a forma aniônica aberta da hesperetina chalcona Hc (Hc<sup>4</sup>) a pH 11 utilizado na síntese. Por esse motivo, decidiu-se realizar os cálculos para a espécie Ht<sup>3</sup> em fase gasosa e em solvente, em

quanto que os cálculos para a espécie  $Hc^{-4}$  foram realizados unicamente em solvente. As conformações são mostradas na Figura 13c-e.

Pode ser observado na Tabela 4, que a energia total e a diferença de energia HOMO-LUMO, mostram a relativa instabilidade da  $Ht^{-3}$  em fase gasosa (diferença de energia muito baixa). A espécie  $Ht^{-3}$  apresenta uma energia total consideravelmente maior quando comparada com o resto das estruturas, inclusive no caso de se levar em consideração as diferenças decorrentes da utilização do PCM. Por esta razão, decidiu-se incluir o PCM nos cálculos ulteriores.

#### 4.2.3 Interações no sistema $Au^{+3}:Ht^{-3}$

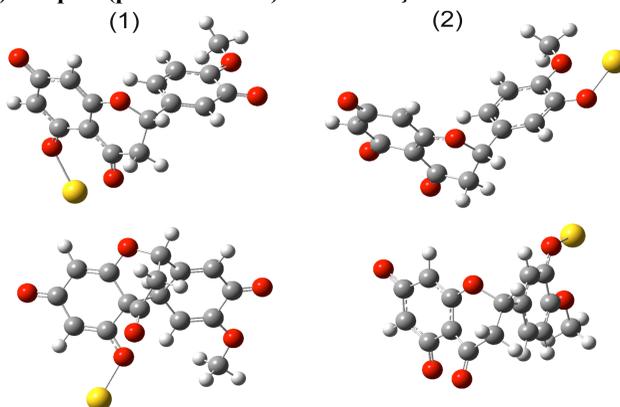
##### 4.2.3.1 Proporção $Au^{+3}:Ht^{-3}$ 1:1

Como foi mencionado anteriormente, após as otimizações geométricas das moléculas individuais, procedeu-se a avaliação da interação entre  $Au^{+3}$  e  $Ht^{-3}$  para diferentes proporções  $Au^{+3}:Ht^{-3}$ . No primeiro caso, quando a proporção é 1:1, o  $Au^{+3}$  interage com um único átomo de oxigênio em duas regiões diferentes da molécula, o primeiro caso ocorre no anel A e é relativo ao átomo de oxigênio da hidroxila desprotonada em  $C_5$  (1) e o segundo no anel B, onde o átomo de  $Au^{+3}$  interage com a hidroxila desprotonada localizada em  $C_3$  (2). Depois da otimização, foram observadas mudanças importantes em ambos os casos, como pode ser visto na Figura 14.

Devido à forte interação entre  $Au^{+3}$  e  $Ht^{-3}$ , a molécula de hesperetina sofre uma reação intramolecular, dando lugar a uma configuração bicíclica, a qual se mostrou estável na fase gasosa e em solvente para ambas as estruturas (1) e (2) e apenas em solvente para a estrutura (1). Em solvente, a estrutura (2) mostrou mudanças conformacionais importantes, sem a reação intramolecular na de hesperetina, e revelando frequências irreais no espectro vibracional, confirmando a natureza instável da molécula. No entanto, em todos os casos, foi observada a transferência de carga da molécula de  $Ht^{-3}$  para o cátion  $Au^{+3}$ . A carga inicial de ouro foi +3 e, depois da otimização, as cargas totais obtidas aplicando a análise populacional de Mulliken foram 0,392/0,606 e 0,289/0,623 para estruturas (1) e (2), em fase gasosa/solvente respectivamente, como se mostra na Tabela 4. Esses valores são muito próximos aos obtidos por Singh et al. (Singh *et al.*, 2013) no estudo de interações ouro-curcumina. É importante salientar que o efeito de solvatação estabiliza a carga negativa na molécula de hesperetina, limitando a quantidade de carga que é transferida na

redução do ouro, como observado na carga líquida dos átomos de ouro, quando se compara fase gasosa e cálculos de solventes.

**Figura 14. Estruturas dos complexos  $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$  1:1 (1) e (2), antes (painel superior) e depois (painel inferior) da otimização.**



A despeito das energias de formação dos complexos mostrados na Tabela 1 ocorreu a reação espontânea entre o Au e a Ht, uma comparação direta entre as estruturas é bastante complexa e deve ser feita com cautela, uma vez que tanto a energia relativa à reação intramolecular como a distorção estrutural da molécula de hesperetina incluem-se nos valores de energia de formação calculados.

**Tabela 5. Propriedades ópticas do complexo estável Au:Ht (2) em proporção 1:1**

$\lambda$ (nm)	Força do oscilador	Principais contribuições para a transição
1029	0.1640	HOMO-3→LUMO (37%), HOMO-1→LUMO (62%), HOMO→LUMO (12%)
1088	0.0807	HOMO-3→LUMO (53%), HOMO-1→LUMO (39%)
539	0.0491	HOMO-6→LUMO (95%)
441	0.0383	HOMO-11→LUMO (14%), HOMO-5→L+1 (79%)
801	0.0202	HOMO-4→LUMO (90%)

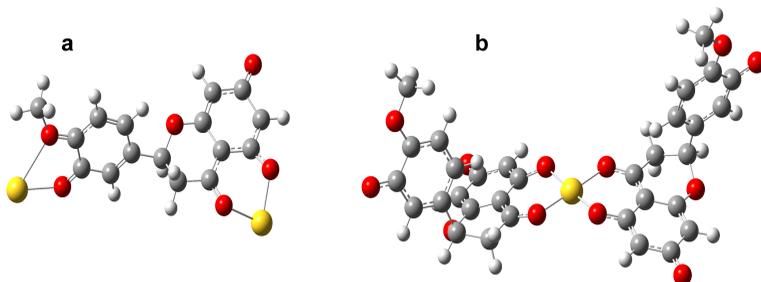
Por outro lado, os cálculos TD-DFT forneceram informação relevante relacionada com a eventual caracterização experimental dos

complexos  $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$  obtidas na mistura de reação em proporção 1:1. Destacam-se as bandas de absorção mais proeminentes encontradas nos cálculos para a estrutura estável do complexo (2), localizadas em 1088 nm, 1029 nm, 801 nm, 539 nm e 441 nm, como mostrado na Tabela 2, o que confirma a absorção óptica no espectro experimental no UV-Vis.

#### 4.2.3.2 Proporções $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$ 2:1 e 1:2

A seguinte configuração a ser estudada foi a interação entre dois cátions de ouro com uma molécula de hesperetina na forma aniônica ( $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$  2:1). Nesta condição, observou-se apenas uma situação, na qual cada átomo de ouro interage com dois átomos de oxigênio correspondentes aos átomos de oxigênio do anel B ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$ ) e os dois átomos de oxigênio adjacentes da carbonila e da hidroxila em posições  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_5$ . A Figura 15a mostra o modelo estrutural final. Esta é uma configuração interessante, devido as posições do átomo de ouro e a distorção da molécula  $\text{Ht}^{-3}$ . A situação poderia representar a interação de uma molécula de hesperetina com a superfície de uma nanopartícula de ouro (dois contatos da molécula à superfície do ouro). A interação é muito forte, tal como infere-se da energia de formação de -15,62 eV (ver Tabela 4). A configuração geométrica final em solvente mostra ligações Au-O do 2,92 Å/2,17 Å e 2,16 Å/2,11 Å para cada sítio de coordenação. Em relação à transferência de carga, observou-se a possível redução dos cátions de ouro para a formação de nanopartículas, da mesma forma ao que foi observado nas condições da interação  $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$  1:1, em que as cargas Mulliken do ouro foram a 0,817 e 0,872, respectivamente. (ver Tabela 1)

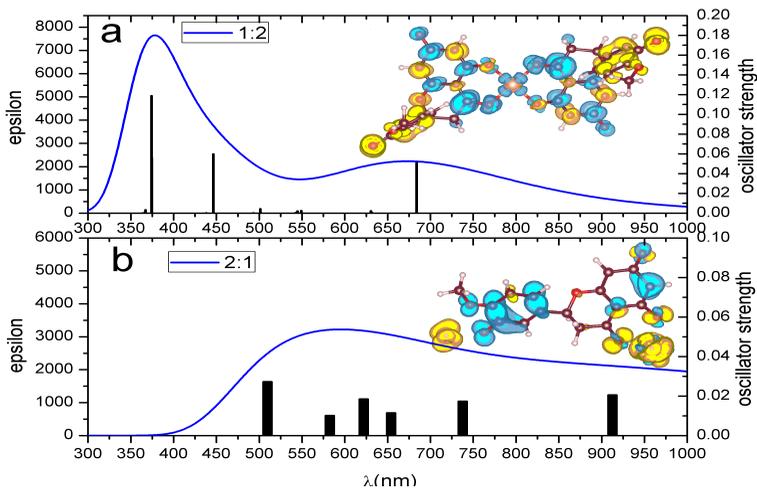
**Figura 15. Estruturas geométricas finais dos complexos  $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$  nas proporções a) 2:1 e b) 1:2.**



Finalmente, a configuração calculada para a interação  $Au^{+3}:Ht^{-3}$  1:2 é mostrada na Figura 15b. As distâncias atômicas finais calculadas para a ligação Au-O foram 2.014 Å, 2.008Å, 2.014Å e 2.008Å; pertinente com a geometria molecular quadrada plana esperada para íons  $Au^{+3}$ . (Mason e Gray, 1968). Mais uma vez, nesta condição a carga Mulliken do ouro 0,947 foi muito próxima a observada por Singh et al. (Singh *et al.*, 2013) no estudo de interações ouro-curcumina.

Os resultados dos cálculos TD-DFT das propriedades ópticas para os complexos  $Au^{+3}:Ht^{-3}$  1:2 e 2:1 encontram-se tabulados no apêndice B e mostrados na Figura 16. A Figura 16a apresenta a informação relativa ao complexo  $Au^{+3}:Ht^{-3}$  na proporção 1:2. Nota-se que todas as transições estão localizadas no intervalo entre 374-684 nm. Nessa condição, as transições são do tipo transferência de carga ligante-metal simples e mista (LMCT) e transferência de carga intra-ligando (ILCT), como mostrado na Tabela 3. As transições mais relevantes mostram valores de força do oscilador ( $f$ ) de até 0,119 u.a.

**Figura 16. Espectros ópticos e mapas de diferença de densidade eletrônica (EDDM) entre o estado fundamental e os estados excitados mais intensos "f" para os complexo  $Au^{+3}:Ht^{-3}$  nas proporções a) 1:2 e b) 2:1.**



O estado excitado de densidade de carga está representado na cor azul ciano e a densidade de carga do estado fundamental em amarelo. A superfície de iso-densidade foi obtida a 0,0002 au. Épsilon representa o coeficiente de absorção molar.

A Figura 16b apresenta a informação relativa aos complexos  $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$  2:1, todas as transições localizaram-se no intervalo entre 509 e 1071 nm. representando transferências de carga metal-ligante (MLCT) e transferências de carga intra-ligando (ILCT). Contudo, todas as transições apresentam forças de oscilador abaixo de 0,027. O valores da força de oscilador junto com o tipo de transição e as principais contribuições foram tabulados no apêndice C

#### 4.2.4 Interações no sistema $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$

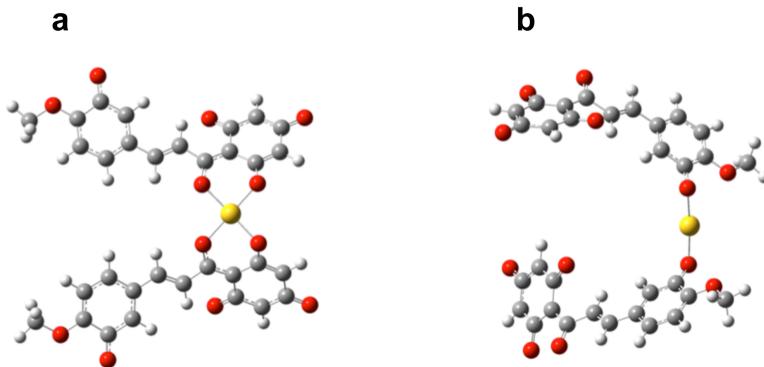
Com a experiência adquirida no estudo dos sistemas  $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$ , procedeu-se com o estudo das interações dos complexos  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1. Devido à carga líquida de hesperetina chalcona (-4) que é maior que a carga da hesperetina fenolato (-3), os complexos  $\text{Au}:\text{Hc}^{-4}$  são mais estáveis no solvente do que na fase gasosa, por isso só foram realizados os cálculos PCM.

No caso da interação  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  nas proporções 1:1 e 2:1, a otimização geométrica gerou distorções significativas na molécula de Hc que sugerem fragmentação molecular. Só na proporção 1:2 a geometria da molécula Hc no complexo  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  foi preservada. Para esta proporção, avaliaram-se seis configurações diferentes obtendo-se inicialmente um complexo de coordenação quádrupla entre os átomos de ouro e oxigênio. A configuração  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  mais estável (3), apresentou uma coordenação entre as carbonilas em  $\text{C}_\beta$  e as hidroxilas desprotonadas em  $\text{C}_2$  das moléculas de Hc com um único átomo de ouro, como apresentado na Figura 17a. O outro complexo  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  (4) apresentou uma configuração também estável, porém com uma energia maior, neste caso, o que originalmente foi uma coordenação dupla bidentada com os átomos de oxigênio da hidroxila desprotonada ( $>\text{C}-\text{O}^-$ ) em  $\text{C}_3$  e da metoxila ( $>\text{CO}-\text{CH}_3$ ) em  $\text{C}_4$  converteu-se em uma coordenação dupla, já que o oxigênio da metoxila é repelido e afastado do sítio de coordenação, como mostrado na Figura 17b. A energia do complexo (4) foi mais alta que a do complexo (3) em cerca de 0,72 eV. Porém, ambas as configurações foram estáveis e favoráveis, toda vez que as energias de formação apresentaram valores altamente negativos (-217 eV). Este resultado é uma consequência da carga negativa da  $\text{Hc}^{-4}$  no pH 11.

No que diz respeito à distribuição de carga, foram obtidos resultados semelhantes aos conseguidos com a molécula de hesperetina aniônica. As cargas atômicas nos átomos de Au, obtidas a partir das análises de populações de Mulliken, foram +0,834 e +0,277 para o complexo (3) e (4), respectivamente, sendo bastante próximos aos já

descritos para sistemas similares (hesperetina e curcumina) (Singh *et al.*, 2013).

**Figura 17. Estruturas geométricas finais dos complexos  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  na proporção 1:2. Em coordenação quádrupla (3) e dupla (4).**



Finalmente, a Figura 18 apresenta os resultados dos cálculos de TD-DFT para o complexo formado pela interação de duas moléculas de hesperetina chalcona na forma aniônica e um átomo de ouro  $\text{Au}^{+3}$ . Como pode ser observado, as propriedades ópticas são altamente dependentes da coordenação Hc-Au. No caso (3) a banda de absorção principal situa-se a 500 nm, enquanto que, no caso (4), a 750 nm. Os valores da força do oscilador junto com o tipo de transição e as principais contribuições foram tabulados no apêndice 2.

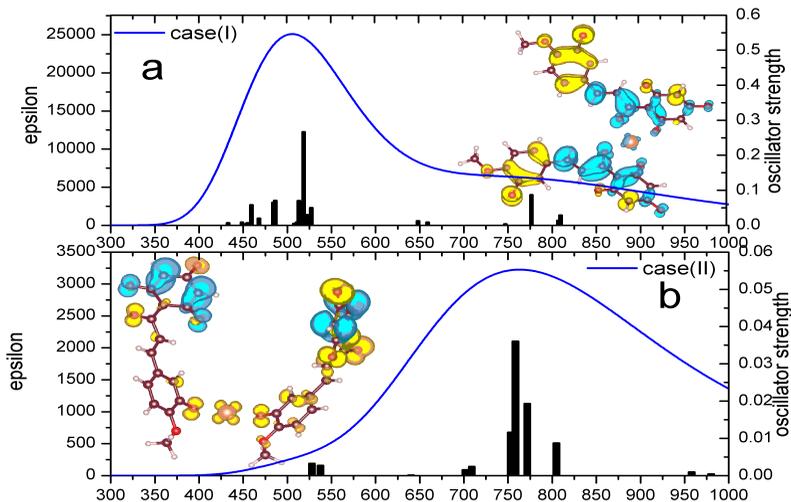
#### 4.2.5 Correlação entre os cálculos de DFT e resultados experimentais

Experimentalmente, foram sintetizadas nanopartículas de ouro usando hesperetina como agente redutor. A hesperetina e alguns dos seus produtos de oxidação atuam ao mesmo tempo como agentes estabilizadores e realizando cálculos de química quântica usando a teoria do funcional da densidade (DFT) foram obtidas evidências que mostram a ocorrência da transferência de elétrons de moléculas de hesperetina / hesperetina chalcona para os íons  $\text{Au}^{3+}$  que são reduzidos a ouro zero valente, como consequência da reação de complexação.

Para a interação Au:Hesperetina chalcona, foi prevista a fragmentação (com um possível rearranjo) da molécula, uma explicação razoável que confirma o aparecimento do carboxilato na superfície de nanopartículas, tal como determinado pela técnica de XPS. Além disso,

as propriedades ópticas a partir de cálculos TD-DFT do complexo  $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$  na proporção 1:2 concordam com o espectro experimental medido aos 30 s de reação, que apresenta um  $\lambda_{\text{max}}$  em torno de 650 nm. Isso significa que a formação do complexo ouro-hesperetina explica a cor preta inicial das suspensões.

**Figura 18.** Espectros ópticos e mapas de diferença de densidade eletrônica (EDDM) entre o estado fundamental e os estados excitados mais intensos "f" para os complexo  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  na proporção 1:2 a) caso (3) e b) caso (4).



O estado excitado de densidade de carga está representado na cor ciano e a densidade de carga do estado fundamental em amarelo. A superfície de isodensidade foi obtida a 0,0002 au. Épsilon representa o coeficiente de absorção molar.

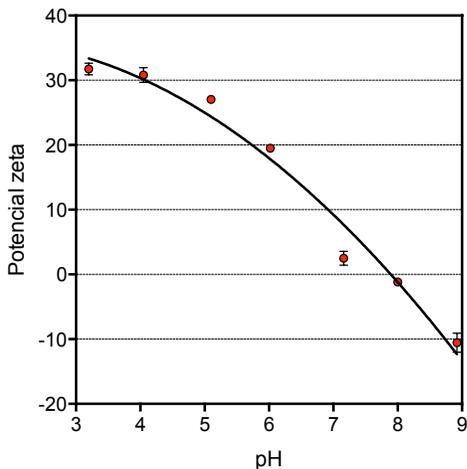
### 4.3 *Compósito de nanopartículas magnético-plasmônicas mediada pelo flavonoide hesperetina*

#### 4.3.1 *Caraterização das nanopartículas de óxido de ferro $\text{Fe}_m\text{O}_n$ .*

Inicialmente na caraterização, o ponto de carga zero (PZC) foi determinado como a intersecção da curva Potencial zeta vs. pH, ponto no qual a densidade de carga superficial deveria ser zero. Os resultados são apresentados na Figura 19. O PZC do óxido de ferro achado experimentalmente foi a pH 7,8 (IC 95% 7,7-8,1). Com tudo, este valor encontra-se na faixa descrita na literatura para a maguemita e magnetita

(Lucas *et al.*, 2007), não podendo ser utilizado para distinguir os óxidos de ferro.

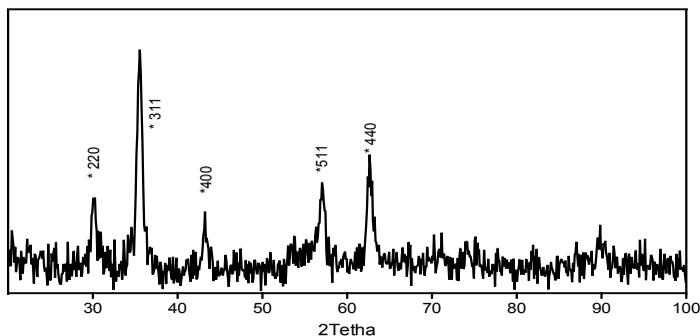
**Figura 19. Potencial zeta de nanopartículas de óxido de ferro.**



**As nanopartículas foram sintetizadas pela hidrólise e co-precipitação de sais de Fe(II) e Fe(III) em função do pH (3,0-9,0) dos respectivos meios de reação. Força iônica  $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ .**

A técnica de Difração de raios X foi usada para caracterizar a identidade química e cristalinidade do óxido de ferro produzido. Os picos de difração em valores de  $2\theta$  de  $30,12^\circ$ ,  $35,52^\circ$ ,  $43,24^\circ$ ,  $57,01^\circ$ ,  $62,67^\circ$ , e  $89,96^\circ$  podem ser atribuídos aos planos cristalinos (220), (311), (400), (511), (440) e (731) da magnetita cúbica (Figura 20). No entanto, a análise de difração, por si só, não consegue distinguir entre a magnetita e maguemita, devido a semelhança em suas estruturas e parâmetros de rede. Nota-se que, na região de baixo ângulo, o padrão de difração, da maguemita supostamente deveria apresentar dois picos extras em  $23,77^\circ$  (210) e  $26,10^\circ$  (211), que poderiam ajudar a discriminar os óxidos. No entanto, a intensidade na região mostra que picos são inexistentes para dar uma identificação positiva; e, mesmo se tivessem sido observados, esses picos extras não garantem que se trata de uma única fase.

**Figura 20. Difração de raios X em ângulo rasante das nanopartículas de óxido de ferro  $Fe_mO_n$**

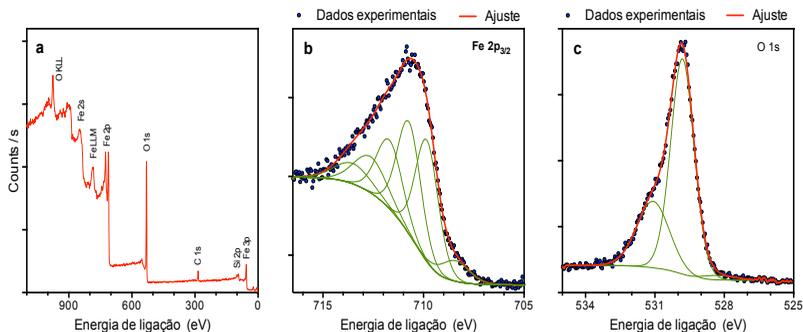


Portanto, a espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) foi usada como uma técnica adicional e a análise foi realizada para distinguir  $Fe_3O_4$  e  $\gamma$ - $Fe_2O_3$ , pois os óxidos de ferro apresentam envelopes  $Fe2p_{3/2}$  e  $Fe2p_{1/2}$  e  $O 1s$  característicos no espectro de XPS e podem ser individualizados pela deconvolução e ajuste de linha correspondente a cada estado excitado, sempre que a amostra não seja muito complexa (até três componentes) (Biesinger *et al.*, 2011). A Figura 21 mostra o espectro na faixa de energia de ligação de 0 até 1350 eV de um filme de nanopartículas de óxido de ferro depositadas em um suporte de silício. Como esperado, só foram encontrados os picos relativos ao ferro e ao oxigênio, além de um pico relativo ao carbono adventício.

Já na Figura 21b mostra-se o espectro de alta resolução para o envelope  $Fe2p_{3/2}$  e  $Fe2p_{1/2}$  dos óxidos de ferro sintetizados. Para os ajustes de linha foi analisada somente a região  $2p_{3/2}$  do espectro subtraindo o ruído de fundo pelo método Shirley. Posteriormente, o envelope  $Fe2p_{3/2}$  foi ajustado utilizando os multipletes, estruturas de superfície em energias de ligação altas, “pré-picos” em energias de ligação baixas e picos satélite propostos por McIntyre e Zetaruk e revisados por Biesinger et al (Biesinger *et al.*, 2011; McIntyre e Zetaruk, 1977). A forma do espectro assemelha-se a descrita pelos autores para  $\gamma$ - $Fe_2O_3$ . Além disso, os centros de gravidade dos picos  $Fe2p_{3/2}$ ,  $Fe2p_{1/2}$ , e  $Fe 3p$  exibiram energias de ligação em 710,8, 724,4 (separação de energia  $\Delta E$  13,6 eV) e 56,0 eV, respectivamente, mais dois satélites em 719,1 e 732,7 eV separados dos picos  $Fe2p_{3/2}$ ,  $Fe2p_{1/2}$  em 8,3 eV,

ajustando-se a descrição do  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (Chan, Gallard e Majewski, 2012; Grosvenor *et al.*, 2004).

**Figura 21.** Espectros de fotoemissão de filmes de nanopartículas de óxido ferro ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) usado na síntese do composto óxido de ferro@ouro.

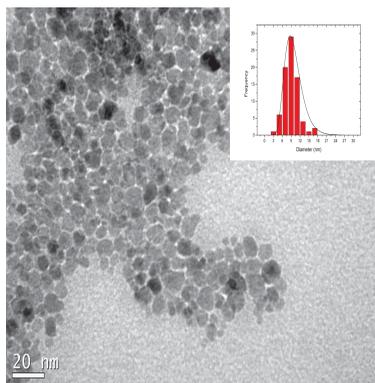


**a) Na faixa de energia de ligação de 0-1400 eV. b) Envelope do orbital Fe  $2p_{1/2}$  e c) Envelope do orbital O1s, e os respectivos ajustes de forma de linha do espectro de fotoemissão usando curvas Gauss-Lorentz (GL30).**

O envelope O1s, mostrado no espectro de alta-resolução da amostra (Figura 21c), apresenta dois picos em 529,8 e 531,1 eV. O pico mais forte em energia de ligação de 529,8 claramente pertence a maguemita enquanto o segundo em 530,4 eV só poderia ser explicado em termos de hidroxilas adsorvidas na superfície (Mcintyre e Zetaruk, 1977).

Posteriormente, o tamanho e a forma das nanopartículas foram determinados a partir da análise das imagens por TEM na Figura 22. Em relação à forma, as imagens revelaram nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  relativamente arredondadas. Entretanto, a distribuição do diâmetro ( $d$ ) do núcleo dos nanocristais obtida através do software ImageJ apresentou um valor médio de 8,8 nm em desvio padrão  $\sigma = 2,0$  nm quando ajustada a uma função log-normal, este valor de dispersão ( $\sigma/d * 100 = 23\%$ ) é razoável para o método de co-precipitação (que pode chegar até 45%, semelhante aos estudos anteriores) (Chin, Iyer e Raston, 2009).

**Figura 22. Micrografia TEM e análise de distribuição de tamanho de nanopartículas de óxido ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ).**



**As nanopartículas foram preparadas pelo método de co-precipitação de sais de Fe (II) e Fe(III) em meio alcalino.**

#### 4.3.2 Caraterização dos compósitos magneto-plasmônicos

##### $\text{Fe}_2\text{O}_3@Au/Ht$

Para a síntese dos compósitos  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@Au/Ht$ , estabeleceram-se as condições de reação descritas nos Detalhes Experimentais. O desenvolvimento da reação foi acompanhado visualmente pela mudança de cor da mistura de marrom para o vermelho ou roxo, indicando a redução do íon cloroaurato para ouro metálico. Também pelos os espectros de absorção na região UV-Visível que foram examinados antes da redução ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), depois da adição de  $\text{HAuCl}_4$  ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/AuCl_4^-$ ), no final da reação e depois da separação do compósito  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@Au/Ht$  (Inserção na Figura 22).

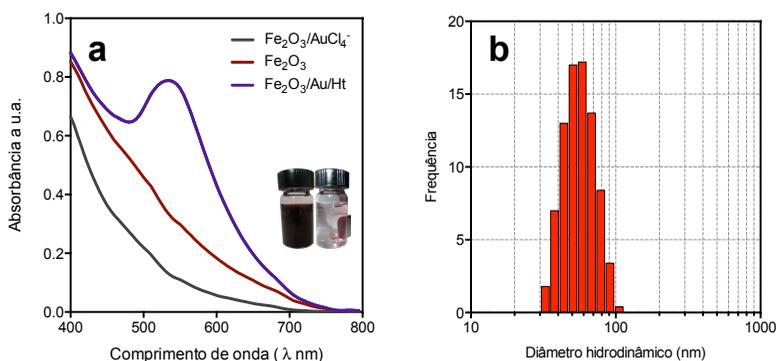
Após a separação das nanopartículas magnéticas da mistura de reação, a aparição de um máximo de absorção na faixa 500-600 nm, devido à banda de plasmons de superfície, evidenciou a formação do nanocompósito maguemita@ouro. Não foram observadas bandas devidas a ressonância de plasmons de superfície nas suspensões de óxido de ferro puro nem na mistura de  $\text{Fe}_2\text{O}_3/AuCl_4^-$ , Figura 23a. Esta última condição foi avaliada levando em consideração a possibilidade do  $\text{HAuCl}_4$  ser instantaneamente reduzido pela ação catalítica dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  na superfície das nanopartículas de óxido de ferro (Chen et al., 2011). De acordo com a Figura 23a, foi observado um máximo de absorbância em 580 nm para o sistema  $\text{Fe}_2\text{O}_3@Au$ , comparando-se com nanopartículas só de ouro de mesmo tamanho (530 nm). Resultados que

estão de acordo com os de outros autores que mostram uma mudança na banda de ressonância de plasmons da superfície do ouro. Este *shift* ou desvio para o vermelho é decorrente da interação óxido de ferro e ouro, tanto no aumento de espessura da casca de ouro depositada, no caso estruturas do tipo *core-shell*, quanto na comunicação da interface  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ , no caso de outras heteroestruturas, que, em ambas as situações, geram domínios deficientes em elétrons no ouro (Yu et al., 2005).

A distribuição de tamanho medida como o diâmetro hidrodinâmico por DLS mostrou um valor médio de  $55,7 \pm 7,2$  nm, evidenciando a presença de agregados (Figura 23b). Contudo, o sistema apresentou uma melhor estabilidade, quando comparado com as nanopartículas sintetizadas e mantidas só em  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Mais uma vez, as técnicas XRD e XPS foram usadas para determinar a cristalinidade e identidade química do nanocompósito. Na Figura 24b Os picos relativos a  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  e ao Au foram observados colocalizados nas nanopartículas. No difratograma, os picos  $2\theta$  em  $38,5^\circ$ ,  $44,43^\circ$ ,  $64,6^\circ$ ,  $77,7^\circ$ , e  $81,9^\circ$  são atribuídos a difração nos planos (111), (220), (200), (311) e (222) do Au (fcc SG: Fm3m, ICSD no. 52249) e os picos em  $30,12^\circ$ ,  $35,52^\circ$ ,  $43,24^\circ$ ,  $57,01^\circ$ , e  $62,67^\circ$  ao planos (220), (311), (400), (511), (440) à estrutura de maguemita ou da magnetita. ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ; SG: P43 212, ICSD no. 87121).

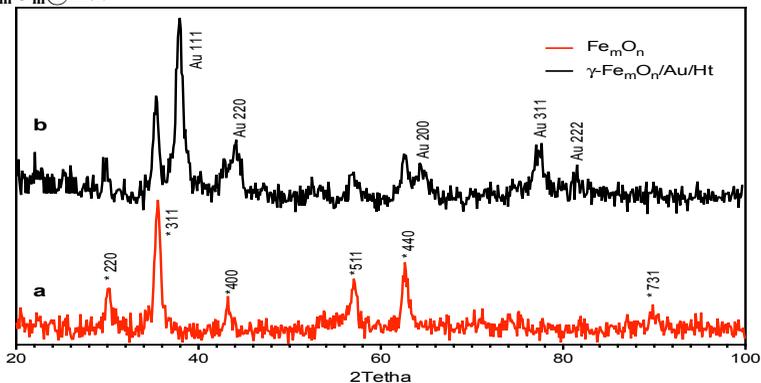
**Figura 23. Espectros UV-Vis de nanopartículas de óxido de ferro, de óxido de ferro/Au e de óxido de ferro/Au/Ht e distribuição de tamanho por DLS.**



**a) Nanopartículas de óxido de Ferro - Linha vermelha; nanopartículas de óxido de ferro misturadas com  $\text{HAuCl}_4$  - Linha cinza; nanopartículas de óxido de ferro/ouro - Linha azul. Insete, imagens de uma suspensão**

coloidal antes e após a separação com um ímã permanente; b) Distribuição de tamanho das nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  medida por DLS.

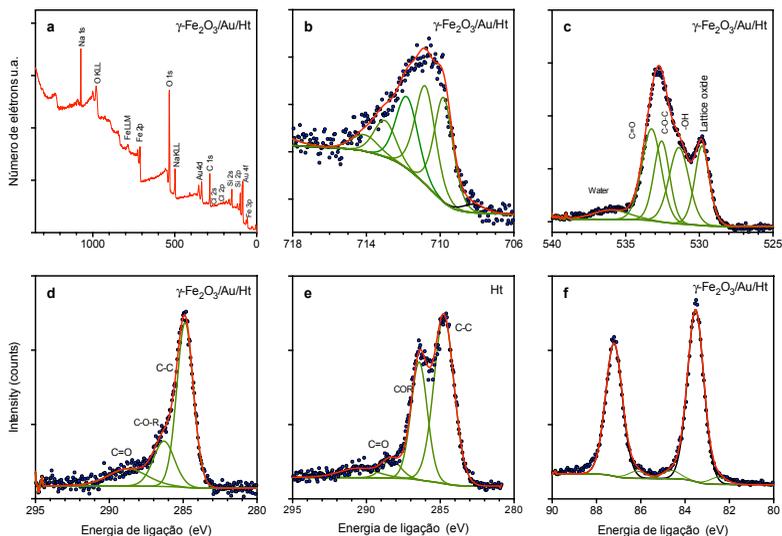
**Figura 24.** Difração de raios X em ângulo rasante do compósito  $\text{Fe}_m\text{O}_m@Au$ .



a) Difratoograma das nanopartículas de  $\text{Fe}_m\text{O}_m$  e b) Difratoograma do compósito.

A Figura 25a mostra o espectro de foto-emissão na faixa de 0-1350 eV do compósito  $\text{Fe}_2\text{O}_3/Au$ . Claramente observados, encontraram-se os picos relativos aos átomos de oxigênio, ouro, carbono e ferro. O envelope ajustado para o orbital  $\text{Fe}2p_{3/2}$  do espectro XPS de alta resolução do óxido de ferro mostrou os mesmos multipletes, estruturas de superfície em altas energias de ligação, "pré-picos" e picos satélite observados no  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . A forma do espectro, centros de gravidade dos picos  $\text{Fe}2p_{3/2}$  e  $\text{Fe}2p_{1/2}$  assemelham-se aos anteriormente descritos. O envelope O 1s do espectro de alta-resolução da amostra encontra-se na Figura 25b. Observou-se, após o ajuste de linhas, cinco picos em 530,1, 531,2, 532,05, 533,3 e 536,3 eV. O pico mais intenso, a uma energia de ligação de 530,1 eV, pertence à rede cristalina do  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , entretanto, os quatro restantes podem ser explicados em termos de átomos de oxigênio ligados a carbono das moléculas orgânicas, produto de oxidação da hesperetina e água adsorvida. Além disso, como pode ser visto nos envelopes relativos ao orbital C 1s da hesperetina e do compósito, as moléculas de hesperetina sofreram degradação (Figura 25d-e). Finalmente, no caso do envelope  $\text{Au}4f$  (Figura 25f) observaram-se picos em valores de energia de ligação de 83,7 e 87,4 eV para os estados excitados  $4f_{7/2}$  e  $4f_{5/2}$ , respectivamente, confirmando a redução do  $\text{HAuCl}_4$  até ouro elementar pela hesperetina.

**Figura 25. Espectros de fotoemissão de filmes do composto  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@Au/Ht$  purificado e depositado em substrato de silício.**



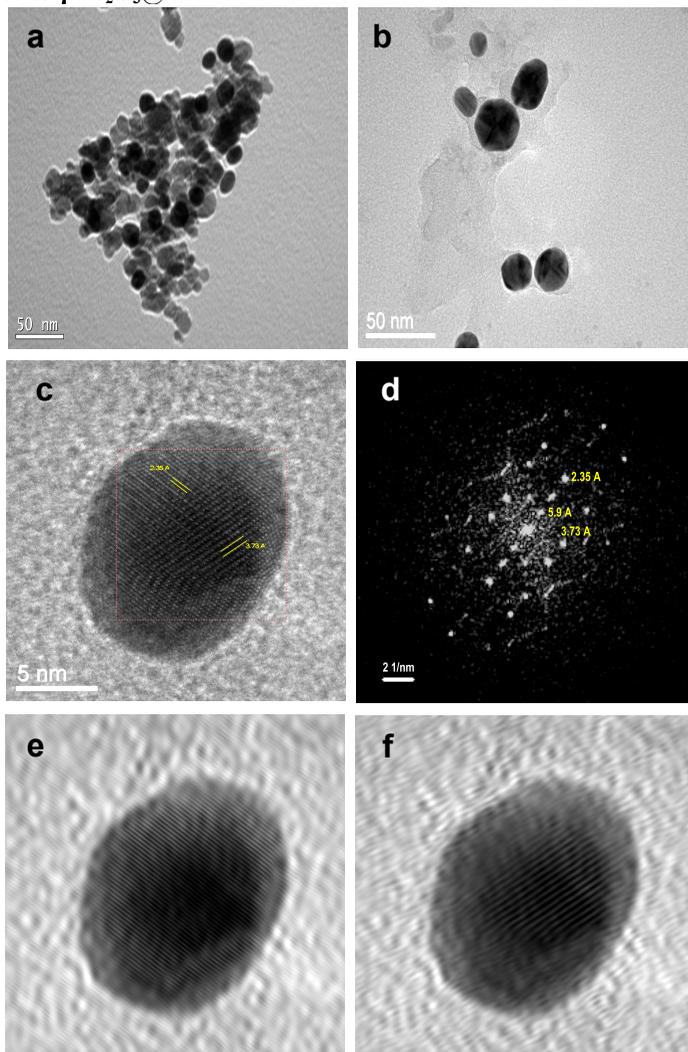
**a) Espectro de foto-emissão no modo *survey* (0-1350 eV). b) Envelope do orbital  $Fe2p_{3/2}$ . c) Envelope do orbital O 1s. d) Envelopes relativos ao orbital C 1s com o respectivo ajuste de forma de linha do espectro. e) Envelope relativo ao orbital C 1s, e) Envelope relativo ao orbital C 1s de um filme de hesperetina e f) Envelope relativo ao orbital Au 4f. Todos os espectros fotoemissão são apresentados com o respectivo ajuste de forma de linha usando curvas Gauss-Lorentz (GL30).**

Ao observar as primeiras imagens após secagem dos espécimes de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@Au$  em grades de TEM, obtidas em energia de 80 kV, evidenciou-se unicamente a presença de uma heteroestrutura, visualizada como aglomerados de nanopartículas arredondadas e constituída por material de alto (ouro) e baixo (óxido de ferro) contraste, (Figura 26a). Porém, estas nanopartículas observadas nas micrografias por TEM poderiam estar constituídas tanto pelas partículas de  $Fe_2O_3$  interagindo parcialmente com a superfície de ouro, como partículas de óxido totalmente recobertas. Para confirmar esta última hipótese, as amostras foram expostas a uma solução de ácido clorídrico ( $2\text{ molL}^{-1}$ ) na qual, diferentemente dos óxidos de ferro, o ouro não é solúvel, a fim de excluir a presença de nanopartículas não recobertas. O sobrenadante foi separado utilizando um ímã permanente e as nanopartículas resultantes foram analisadas novamente, mostrando que as nanopartículas de  $\gamma$ -

$\text{Fe}_2\text{O}_3$  não recobertas foram rapidamente dissolvidas (Figura 26b), deixando unicamente as nanopartículas de alto contraste. A mesma amostra foi analisada em um microscópio a 200 KV a fim de comprovar a presença do *core-shell*. Neste tipo de nanopartículas distinguir a o núcleo da casca com técnicas microscópicas ainda é motivo de discussão e difícil de alcançar. Apesar disso foi feita uma inspeção rigorosa de imagens de alta resolução. Na Figura 26 mostra-se uma única nanopartícula (Figura 26c) e o padrão de transformada rápida de Fourier (FFT) de uma região da nanopartícula (quadrado vermelho delineado) (Figura 26d) evidenciou distâncias interplanares de 2,35Å relativa ao plano (111) do ouro e 3,73 e 5,90 Å relativas aos planos (110) e (211) do  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Após a aplicação de filtros de Fourier nos planos relativos ao ouro (111) (Figura 26e) e ao óxido de ferro (110) (Figura 26f) concluiu-se que as partículas apresentariam uma casca de aproximadamente 1,8 nm

Na amostra também foram observadas algumas nanopartículas contendo apenas ouro, sugerindo uma configuração mista no compósito, tendo ambos *core-shell* e a heteroestrutura na que há uma interação parcial entre o ouro e o óxido de ferro que se dissolve no HCl deixando unicamente as nanopartículas do ouro. De fato, Jones et al, havia sugerido que, mesmo tendo sido desenvolvidos métodos para nucleação direta de cascas de metal finas e contínuas em volta de *templates* dielétricos, a maioria das combinações resultam inevitavelmente em morfologias com segregação de fases, em vez de cascas uniformes (Jones *et al.*, 2011), ou ainda, obtendo-se cascas espessas, e não um revestimento fino de ouro (Salado *et al.*, 2012). Apesar disto, este tipo de compósito tem sido usado com sucesso em aplicações como marcação e separação magnética de células (Krystofiak *et al.*, 2013).

**Figura 26. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do compósito  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au/Ht}$**



a) Um campo representativo das nanopartículas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  como preparadas e b)  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  após digestão por 10 min com HCl 2N. c) micrografia eletrônica de transmissão de alta resolução HRTEM de b obtida em 200 KeV e d) a imagem obtida aplicando o método de transformada rápida de Fourier (FFT) na região delimitada na imagem de alta resolução em c. e f) Imagens obtidas aplicando filtros de Fourier inversos aos planos relativos ao ouro (111) e ao óxido de ferro (110) .



## 5 Considerações Finais

Finalmente, pode-se afirmar que nanotecnologia verde como campo emergente, enfrenta desafios consideráveis na pesquisa, para conseguir o desempenho e benefício máximo de materiais de origem nanotecnológica, minimizando o impacto sobre a saúde humana e o ambiente. Uma das principais necessidades é a de desenvolver precisamente métodos, que possam ser adaptados para a produção de grandes quantidades de materiais funcionalizados, purificados e estruturalmente bem definidos, exigindo claramente melhorias significativas na síntese de nanopartículas.

Neste trabalho foram adaptados e aplicados os princípios da química verde, no desenvolvimento de rotas sintéticas rápidas e eficazes para sintetizar dois tipos de nanoestruturas de ouro (nanopartículas de ouro estabilizadas com hesperetina HtAuNP e um composto de nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$ ). Em ambos os métodos, os materiais foram facilmente preparados em condições brandas, usando água como solvente e na temperatura ambiente.

Inicialmente, devido à atividade antioxidante comprovada dos flavonoides presentes em frutas cítricas, alguns foram pesquisados pela capacidade para reduzir o íon  $\text{AuCl}_4^-$  no desenvolvimento de um método de um único passo, no que a redução e a estabilização fossem conseguidos usando o mesmo reagente. A redução do  $\text{AuCl}_4^-$  ( $4\text{-}7\text{ mmolL}^{-1}$ ) em meio alcalino (pH 11), à temperatura ambiente, usando hesperetina resultou em suspensões de nanopartículas de ouro detectada como uma mudança de cor do sistema de reação. A espectrofotometria UV-Vis foi usada como técnica de caracterização preliminar dando uma ideia inicial i) do tamanho médio e forma, dependendo da posição e número de bandas SPR no espectro; ii) a cinética de formação e crescimento e; iii) estabilidade das HtAuNP. A presença de uma única banda absorção de plasmons de superfície em um  $\lambda_{\text{máx}}$  em 522 nm sugeriu a formação de nanopartículas esféricas menores que 30 nm sem agregados, como foi demonstrado nas análises das imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM). Isto foi observado nas nanopartículas que os núcleos metálicos apresentaram tamanhos de 3,5 e 15 nm ou de só 15 nm dependendo da ordem de adição dos reagentes. As HtAuNP apresentaram forma esférica e cristalinas com orientação preferencial no plano (111). No entanto, os diâmetros hidrodinâmicos das HtAuNP, determinados *in situ*, usando a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), foram

ligeiramente maiores (5,0 e 32 nm) devido ao revestimento de material orgânico (hesperetina e produtos de oxidação) estabilizando a superfície das nanopartículas. Este recobrimento foi confirmado posteriormente com a técnica de Espectrometria de Emissão de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS). Com esta técnica evidenciou-se a presença de carbono orgânico na superfície de filmes preparados com as HtAuNP e a redução do ouro a  $Au^0$ , com uma pequena participação de Au oxidado, provavelmente da interação com o material orgânico na superfície das AuNP.

A espectrofotometria UV-Vis foi usada para detectar e acompanhar a formação de nanocristais de ouro através do aparecimento de bandas de absorção em  $\sim 522$  nm. A reação foi completada em 30 minutos, mostrando um deslocamento para o azul no  $\lambda_{\text{máx.}}$ , começando desde  $\sim 680$  nm até o valor final de 522 nm característico de nanopartículas esféricas. A mesma reação foi acompanhada por DLS, porém usando esta técnica, as nanopartículas pareceram crescer até o tamanho final imediatamente depois do início da reação ( $< 2$  min), enquanto a concentração das partículas deste tamanho aumentaram com o tempo de reação, um desvio da teoria clássica de formação de nanopartículas.

As HtAuNP mostram boa estabilidade frente a diluição e a centrifugação a três ciclos de  $6000 \times g$  por 7 minutos (deve-se considerar que os fenômenos de adsorção-dessorção dos modificadores de superfície, são dinâmicos, e o processo de lavagem pode eliminá-los perdendo-se a estabilização). Contudo, as HtAuNP estabilizadas e purificadas mantem a estabilidade por até pelo menos um ano, armazenadas entre  $2-8^\circ C$ , mostrando um mínimo de aglomeração.

Os cálculos teóricos confirmaram a transferência de elétrons de hesperetina ao ouro, como consequência da reação de complexação, reduzindo íons  $Au^{3+}$  para  $Au^0$ . Os átomos de ouro interagiram com a molécula de hesperetina e a hesperetina chalcona nas formas aniônicas. No caso da Ht, foi confirmada nos cálculos de TD-DFT a formação de dois complexos  $Au^{+3}:Ht^{-3}$ , o 1:2 e o 2:1, com a participação das hidroxilas em  $C_3$  e  $C_5$  e da carbonila em  $C_4$ . Além disso, os espectros de UV-Vis calculados concordaram com os resultados experimentais. A forma aniônica da hesperetina chalcona, gerada pelas condições de pH impostas na reação, a molécula reagiu de forma diferente com o ouro. Em relação às interações  $Au^{+3}:Hc^{-4}$ , observou-se que, os complexos 2:1 e 1:1 foram altamente instáveis, o que resultou na fragmentação da molécula de Hc, o que explica o fato de os produtos de oxidação terem

sido observados pela técnica de XPS. Finalmente, no caso da proporção  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  1: 2, há a formação de duas espécies estáveis que agem como redutores do ouro, com a participação das hidroxilas em  $\text{C}_2$  e  $\text{C}_3$  e da carbonila em  $\text{C}_b$ , como no caso da hesperetina. Todas as espécies descritas podem agir como estabilizadoras da superfície do Au.

O segundo método analisado, descreve a formação em condições brandas, de um compósito de nanopartículas de óxido de ferro e ouro exibindo comportamentos magnéticos e plasmônicos. Foram sintetizadas nanopartículas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_m\text{O}_n$ ) de  $\sim 9$  nm pelo método de coprecipitação de cloretos de Fe(II) e Fe(III), em hidróxido de amônia pH 9-10. Estas nanopartículas foram, em seguida, dispersas na presença de  $\text{HAuCl}_4$  utilizando irradiação ultrassônica para favorecer a separação das nanopartículas (devido a pouca capacidade estabilizante dos contra-íons  $\text{NH}_4$ ) e a posterior adsorção dos íons de  $\text{AuCl}_4^-$  na superfície do óxido. O ouro foi, depois, reduzido em um ambiente alcalino, acrescido de hesperetina e adição lenta do modificador de pH, levando em consideração o poder redutor avaliado no primeiro método. O compósito foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Espectrometria de Emissão de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS), Difração de Raios-X e Espectrofotometria UV-Vis. Nas condições acima mencionadas, o óxido de ferro identificado foi principalmente  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e o compósito  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{Au}$  mostrou uma banda SPR forte em torno de 580 nm e morfologia consistente em uma mistura de nanopartículas de óxido de ferro decoradas com nanopartículas de ouro junto com estruturas do tipo core-shell, formando agregados discretos.

Enfim, os principais resultados têm sido o desenvolvimento de métodos para produzir nanopartículas desejadas, a) eliminando o uso de reagentes tóxicos e solventes, b) com rendimentos mais elevados, c) com e um bom controle da distribuição de tamanho de partícula.



## 6 CONCLUSÕES

Na primeira parte deste trabalho, demonstrou-se a viabilidade de gerar uma suspensão estável de nanopartículas de ouro esféricas, de  $15 \pm 1$  nm de diâmetro, em condições alcalinas e de concentrações superiores as alcançadas com outros métodos em meio aquoso ( $4-7 \text{ mmolL}^{-1}$ ), utilizando o flavonoide hesperetina como agente redutor e estabilizador. Em condições otimizadas, a hesperetina e alguns dos seus produtos de oxidação atuam como estabilizantes que impedem, eficazmente, a agregação de nanopartículas sem a necessidade de estabilizantes adicionais e por períodos superiores a um ano. Este método de síntese utiliza um agente redutor não-tóxico em solução aquosa e produz nanopartículas à temperatura ambiente, com tamanhos altamente reprodutíveis.

Mostrou-se também, por meio de simulações computacionais, que a complexação do ouro com a hesperetina na forma aniônica chalcona é possível, no entanto, na modelagem, deve-se levar em consideração os efeitos do solvente. As espécies aniônicas da hesperetina produzidas no meio alcalino interagem fortemente com o ouro gerando uma transferência de carga líquida que induz a redução eletroquímica do ouro.

Foram encontradas configurações estáveis para as interações do átomo de ouro e a molécula de hesperetina nas proporções Au:Ht 1:2 e 2:1, confirmando o poder de coordenação e redutor da hesperetina. Os cálculos TD-DFT confirmaram a formação de dois complexos  $\text{Au}^{+3}:\text{Ht}^{-3}$ , o 1:2 e o 2:1. No caso da forma aniônica hesperetina chalcona, gerada pelas condições de pH impostas na reação, a molécula reage de forma diferente com o ouro. Em relação às interações  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$ , observou-se que, os complexos 2:1 e 1:1 são altamente instáveis e induzem a fragmentação da molécula de Hc, o que explica o fato dos produtos de oxidação terem sido observados pela técnica de XPS. Finalmente, no caso da proporção  $\text{Au}^{+3}:\text{Hc}^{-4}$  1: 2, há a formação de duas espécies estáveis que agem como redutores do ouro, como no caso da hesperetina.

Também, desenvolveu-se um procedimento de síntese de um composto  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{Au}$  relativamente monodisperso em meio aquoso ( $\text{PdI} = 0,19$  por DLS). A hesperetina provou ser um bom agente redutor e estabilizante de nanopartículas de ouro e tentou-se a redução sobre a superfície de um óxido de ferro. Os resultados descritos confirmam que a formação da interface óxido de ferro@metal é um processo desfavorável, devido às diferenças em energia superficial entre estes

materiais. Esta diferença entre os materiais impede a formação de uma verdadeira estrutura de core-shell, em que a casca de ouro seria fina, apesar dos vários métodos que têm sido relatados para a síntese de tais compostos, visto que a segregação de fases é o processo mais favorável.

## 7 PERSPECTIVAS

No que diz respeito à continuidade deste trabalho, é possível utilizar métodos de separação para purificar a suspensão de nanopartículas estáveis de tamanhos 3-4 nm obtidas no protocolo de adição da hesperetina sobre o ouro.

Pode-se estudar detalhadamente a composição química da superfície das nanopartículas de ouro e avaliar o efeito farmacológico das HtAuNP em modelos biológicos relevantes as atividades reportadas para o composto Hesperetina.

Ainda, o estudo teórico da estabilização das nanopartículas de ouro pela Hesperetina pode ser aprofundado, complementando o trabalho já desenvolvido com estudos de dinâmica molecular, mostrando a interação da molécula de hesperetina e os diferentes planos cristalinos do ouro. É importante também o estudo da interação das HtAuNP em meios fisiológicos o que reflete na estabilidade do sistema.

No que diz respeito ao compósito, é necessário conseguir uma caracterização unívoca do óxido de ferro que foi atribuído principalmente ao  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , utilizando uma técnica mais apropriada como espectroscopia Mossbauer.

Também é necessário otimizar as condições de reação para obter um compósito unicamente core-shell evitando a segregação de fase.

Enfim, precisa-se, ainda, do estudo das propriedades magnéticas do nanocompósito obtido.



## REFERÊNCIAS

ABOU SAMRA, M. *et al.* Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 622–629, mar. 2011.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry: theory and practice**. Oxford: Oxford University Press, 1998.

APELIAN, D. Materials science and engineering's pivotal role in sustainable development for the 21st century. **MRS Bulletin**, v. 37, n. 4, 2012.

BALASUBRAMANIAN, S. K. *et al.* Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 9023–30, dez. 2010.

BARATHMANIKANTH, S. *et al.* Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. **Journal of nanobiotechnology**, v. 8, p. 16, 2010.

BAUERNSCHMITT, R.; AHLRICHS, R. Treatment of electronic excitations within the adiabatic approximation of time dependent density functional theory. **Chemical Physics Letters**, v. 256, n. 5, p. 454–464, 1996.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648–5652, 1993.

BERTILSSON, L.; LIEDBERG, B. Infrared Study of Thiol Monolayer Assemblies on Gold Preparation, Characterization, and Functionalization of Mixed Monolayers. **Langmuir**, v. 9, p. 141–149, 1993.

BIESINGER, M. C. *et al.* Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 7, p. 2717–2730, 2011.

BRUST, M. *et al.* Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, n. 7, p. 801–802, 1994.

CABUIL, V. Magnetic nanoparticles: Preparation and properties. *In*: SOMASUNDARAN, P. (Ed.). **Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Volume 5**. Second Edition. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 3470–3484.

CAI, W. *et al.* Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 1, p. 17–32, 2008.

CHAN, C. C. P.; GALLARD, H.; MAJEWSKI, P. Fabrication of amine-functionalized magnetite nanoparticles for water treatment processes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, 2012.

CHEN, H. W. *et al.* Magnetically recoverable magnetite/gold catalyst stabilized by poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) for aerobic oxidation of alcohols. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 1, p. 149–61, jan. 2011.

CHEN, P. C.; MWAKWARI, S. C.; OYELERE, A. K. Gold nanoparticles : From nanomedicine to nanosensing. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 1, p. 45–66, 2008.

CHIN, S. F.; IYER, K. S.; RASTON, C. L. Facile and Green Approach To Fabricate Gold and Silver Coated Superparamagnetic Nanoparticles. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 6, p. 2685–2689, 3 jun. 2009.

CRECZYNSKI-PASA, T. B. *et al.* Self-assembled dithiothreitol on Au surfaces for biological applications: phospholipid bilayer formation. **Physical chemistry chemical physics PCCP**, v. 11, p. 1077–1084, 2009.

DAHL, J. A.; MADDUX, B. L. S.; HUTCHISON, J. E. Toward greener nanosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2228–2269, 2007.

DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical reviews**, v. 104, n. 1, p. 293–346, jan. 2004.

DAS, S. *et al.* One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 107, p. 27–34, 1 jul. 2013.

DING, H. L. *et al.* Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles: The silica coating regulations with a single core for different core sizes and shell thicknesses. **Chemistry of Materials**, v. 24, p. 4572–4580, 2012.

DINYA, Z.; LBVAIB, A. X-ray photoelectron compounds spectra (XPS) of flavonoid parent compounds. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 59, p. 315–325, 1992.

DUMUR, F. *et al.* Controlled spontaneous generation of gold nanoparticles assisted by dual reducing and capping agents. **Gold Bulletin**, v. 44, n. 2, p. 119–137, 2011.

ELSAYED, K. A. *et al.* Effect of focusing conditions and laser parameters on the fabrication of gold nanoparticles via laser ablation in liquid. **Optics & Laser Technology**, v. 45, p. 495–502, fev. 2013.

FISCHER, J. A. *et al.* Sulfidization of Au(111) from thioacetic acid: An experimental and theoretical study. **Langmuir**, v. 28, n. 111, p. 15278–15285, 2012.

FRISCH, M. J. *et al.* **Gaussian 09, Revision D.01**. Wallingford CTGaussian Inc., 2009.

GAO, J. *et al.* Colloidal stability of gold nanoparticles modified with thiol compounds: bioconjugation and application in cancer cell imaging. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 28, n. 9, p. 4464–71, 6 mar. 2012.

GARDEA-TORRESDEY, J. L. *et al.* Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. **Nano Letters**, v. 2, n. 4, p. 397–401, 2002.

GATTUSO, G. *et al.* Flavonoid composition of Citrus juices. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 12, n. 8, p. 1641–73, jan. 2007.

GLAZER, E. S. *et al.* Noninvasive Radiofrequency Field Destruction of Pancreatic Adenocarcinoma Xenografts Treated with Targeted Gold

Nanoparticles. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 23, p. 5712–5721, 2010.

GROSVENOR, A. P. *et al.* Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds. **Surface and Interface Analysis**, v. 36, n. 12, p. 1564–1574, dez. 2004.

HARATIFAR, E. A. D. *et al.* Semi-Biosynthesis of Magnetite-Gold Composite Nanoparticles Using an Ethanol Extract of *Eucalyptus camaldulensis* and Study of the Surface Chemistry. **Journal of Nanomaterials**, v. 2009, p. 1–5, 2009.

HATAKEYAMA, Y. *et al.* Synthesis of Gold Nanoparticles in Liquid Polyethylene Glycol by Sputter Deposition and Temperature Effects on their Size and Shape. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 8, p. 3279–3285, 2011.

HERRANZ, T. *et al.* Reactivity of Au nanoparticles supported over SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> studied by ambient pressure photoelectron spectroscopy. **Catalysis Today**, v. 143, n. 1-2, p. 158–166, 15 maio 2009.

HIEN PHAM, T. T.; CAO, C.; SIM, S. J. Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, n. 15, p. 2049–2055, ago. 2008.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864–B871, 9 nov. 1964.

HUAIZHI, Z.; YUANTAO, N. Techniques used for the preparation and application of gold powder in ancient China. **Gold Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 103–105, set. 2000.

HUESO, J. L. *et al.* Beyond gold: rediscovering tetrakis-(hydroxymethyl)-phosphonium chloride (THPC) as an effective agent for the synthesis of ultra-small noble metal nanoparticles and Pt-containing nanoalloys. **RSC Advances**, v. 3, n. 26, p. 10427, 2013.

ITINA, T. E. On Nanoparticle Formation by Laser Ablation in Liquids. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 12, p. 5044–5048, 31 mar. 2011.

IVANOV, M. R. **Covalently functionalized gold nanoparticles: synthesis, characterization, and integration into capillary electrophoresis.** [s.l.] University of Iowa, 2011.

IVANOV, M. R.; BEDNAR, H. R.; HAES, A. J. Investigations of the Mechanism of Gold Nanoparticle Stability and Surface Electrophoresis. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 386–394, 2009.

JIA, C.-J.; SCHÜTH, F. Colloidal metal nanoparticles as a component of designed catalyst. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 13, p. 2457–2487, 2011.

JOHNSON, P. B.; CHRISTY, R. Optical Constants of the Noble Metals. **Physical Review B**, v. 6, n. 12, p. 4370–4379, 1972.

JONES, M. R. *et al.* Templated techniques for the synthesis and assembly of plasmonic nanostructures. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 3736–3827, 2011.

KALSKA-SZOSTKO, B. *et al.* Enzymes immobilization on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–gold nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 7, p. 2783–2787, jan. 2012.

KOBAYASHI, H.; WATANABE, R.; CHOYKE, P. L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; What is the appropriate target? **Theranostics**, v. 4, n. 1, p. 81–89, 2014.

KOERNER, H. *et al.* In Situ UV/Vis, SAXS, and TEM Study of Single-Phase Gold Nanoparticle Growth. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 6, p. 981–995, 27 mar. 2012.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133–A1138, 15 nov. 1965.

KOUASSI, G. K.; IRUDAYARAJ, J. Magnetic and Gold-Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Sensor Magnetic and Gold-Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Sensor. **Society**, v. 78, n. 10, p. 3234–3241, 2006.

KRYSTOFIAK, E. S. *et al.* Microscopy Microanalysis Multiple Morphologies of Gold–Magnetite Heterostructure Nanoparticles are

Effectively Functionalized with Protein for Cell Targeting. **Microscopy and microanalysis**, p. 821–834, 2013.

KUMAR, V. *et al.* Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 215, p. 39–121, 2012.

KUNZ, P. C. *et al.* Metal carbonyls supported on iron oxide nanoparticles to trigger the CO-gasotransmitter release by magnetic heating. **Chemical communications**, v. 49, n. 1997, p. 4896–8, 2013.

LATTANZIO, V. *et al.* Plant Phenolics - Secondary Metabolites with Diverse Functions. *In*: DAAYF, F.; LATTANZIO, V. (Eds.). **Recent Advances in Polyphenol Research , Volume 1**. [s.l.] Blackwell Publishing, 2009. v. 1p. 2.

LAURENT, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2064–2110, 2008.

LEITE, E. R.; RIBEIRO, C. Basic Principles: Thermodynamics and Colloidal Chemistry. *In*: **Crystallization and Growth of Colloidal Nanocrystals**. SpringerBriefs in Materials. New York, NY: Springer New York, 2012. .

LI, C. *et al.* Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. **Nanoscale research letters**, v. 6, n. 1, p. 440, jan. 2011.

LI, L. *et al.* Apoptosis of tumour cells by temperature and anti-tumour drug: Microscopic and macroscopic investigations. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, n. 4, p. 321–329, 2003.

LI, Q. Q. *et al.* Synthesis and stability evaluation of size-controlled gold nanoparticles via nonionic fluorosurfactant-assisted hydrogen peroxide reduction. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 27, p. 13564–13570, 2012.

LI, Y. *et al.* Preparation and properties of a nano TiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite superparamagnetic photocatalyst. **Rare Metals**, v. 28, n. 5, p. 423–427, 2009.

- LIU, H. L. *et al.* Synthesis of streptavidin-FITC-conjugated core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au nanocrystals and their application for the purification of CD4<sup>+</sup> lymphocytes. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 4003–11, out. 2008.
- LUCAS, I. T. *et al.* Surface charge density of maghemite nanoparticles: Role of electrostatics in the proton exchange. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 18568–18576, 2007.
- LYON, J. L. *et al.* Synthesis of Fe Oxide Core Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding.pdf. **Nano Letters**, v. 4, n. 4, p. 710–733, 2004.
- MAGNUSSON, M. H. *et al.* Size-selected gold nanoparticles by aerosol technology. **Nanostructured Materials**, v. 12, n. 1-4, p. 45–48, 1999.
- MAHL, D. *et al.* Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 377, n. 1-3, p. 386–392, mar. 2011.
- MASON, W. R.; GRAY, H. B. Electronic Structures and Spectra of Square-Planar Gold (III) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 1963–1966, 1968.
- MAURO, A. DI *et al.* Recovery of hesperidin from orange peel by concentration of extracts on styrene-divinylbenzene resin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4391–7, out. 1999.
- MCINTYRE, N. S.; ZETARUK, D. G. X-ray Photoelectron Spectroscopic Studies of Iron Oxides. **Analytical chemistry**, v. 49, n. 11, p. 1521–1529, 1977.
- MENNUCCI, B.; TOMASI, J. Continuum solvation models: A new approach to the problem of solute's charge distribution and cavity boundaries. **The Journal of Chemical Physics**, v. 106, n. 12, p. 5151, 1997.
- MIKHLIN, Y. *et al.* Submicrometer intermediates in the citrate synthesis of gold nanoparticles: new insights into the nucleation and crystal growth mechanisms. **Journal of colloid and interface science**, v. 362, n. 2, p. 330–6, 15 out. 2011.

MILCZAREK, G.; CISZEWSKI, A. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Functionalized gold nanoparticles and films stabilized by in situ formed poly Eugenol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 53–57, 2012.

MODY, V. V *et al.* Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 2, n. 4, p. 282–9, 1 out. 2010.

MONTERO, M. A.; CHIALVO, M. R. G. DE; CHIALVO, A. C. Preparation of gold nanoparticles supported on glassy carbon by direct spray pyrolysis. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 20, p. 3276–3280, 2009.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 59–79, 2011.

NOROUZ DIZAJI, A.; YILMAZ, M.; PISKIN, E. Silver or gold deposition onto magnetite nanoparticles by using plant extracts as reducing and stabilizing agents. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, n. February, p. 1–7, 2015.

PARR, R. G.; YANG, W. **Density-functional theory of atoms and molecules**. Oxford: Oxford University Press, 1989.

PATRA, C. R. *et al.* Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 3, p. 346–361, 2010.

PAVARINI, D. P. *et al.* Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, p. 5–16, 2012.

PENG, H.-P.; LIANG, R.-P.; QIU, J.-D. Facile synthesis of Fe(3)O(4)@Al(2)O(3) core-shell nanoparticles and their application to the highly specific capture of heme proteins for direct electrochemistry. **Biosensors & bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 3005–3011, 2011.

PERDEW, J. P. *et al.* Atoms, molecules, solids, ad surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. **Physical Review B**, v. 46, n. 11, p. 6671–6687, 1992.

PETERSEN, S.; BARCIKOWSKI, S. Conjugation Efficiency of Laser-Based Bioconjugation of Gold Nanoparticles with Nucleic Acids. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 46, p. 19830–19835, 2009.

PFEIFFER, C. *et al.* Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 11, n. 96, p. 20130931, 2014.

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035–1042, 2000.

PIMPANG, P. *et al.* Effect of stabilizer on preparation of silver and gold nanoparticle using grinding method. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 35, n. 2, p. 250–257, 2008.

PRATHNA, T. C. *et al.* Biomimetic Synthesis of Nanoparticles: Science, Technology & Applicability. *In*: MUKHERJEE, A. (Ed.). . **Biomimetics Learning from Nature**. [s.l.] InTech, 2010. .

RANJAN, C. *et al.* Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 3, p. 346–361, 2010.

RUNGE, E.; GROSS, E. K. . Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems. **Physical Review Letters**, v. 52, n. 12, p. 997–1000, 1984.

SALADO, J. *et al.* Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au superparamagnetic nanoparticles: in vitro bioactivity. **Nanotechnology**, v. 23, n. 31, p. 315102, 10 ago. 2012.

SALGUEIRIÑO-MACEIRA, V.; CORREA-DUARTE, M. A. Increasing the complexity of magnetic core/shell structured nanocomposites for biological applications. **Advanced Materials**, v. 19, p. 4131–4144, 2007.

SARDAR, R. *et al.* Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. **Langmuir**, v. 25, n. 24, p. 13840–13851, 2009.

SCAMPICCHIO, M. *et al.* Nanoparticle-based assays of antioxidant activity. **Analytical chemistry**, v. 78, n. 6, p. 2060–2063, 15 mar. 2006.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jun. 2012.

SHARMA, R. *et al.* NMR characterization of ligand binding and exchange dynamics in triphenylphosphine-capped gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 16387–16393, 2009.

SIGMUND, P. Mechanisms and Theory of Physical Sputtering by Particle Impact. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 27, n. 1, p. 1–20, 1987.

SINGH, D. K. *et al.* In situ synthesis and surface functionalization of gold nanoparticles with curcumin and their antioxidant properties: an experimental and density functional theory investigation. **Nanoscale**, v. 5, n. 5, p. 1882–93, 7 mar. 2013.

STOLARSKI, R. *et al.* Mechanism of hydroxylamine mutagenesis: tautomeric shifts and proton exchange between the promutagen N6-methoxyadenosine and cytidine. **Biochemistry**, v. 26, p. 4332–4337, 1987.

STRESZEWSKI, B. *et al.* Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Gold nanoparticles formation in the aqueous system of gold ( III ) chloride complex ions and hydrazine sulfate — Kinetic studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 397, p. 63–72, 2012.

SUJITHA, M. V; KANNAN, S. Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (Citrus limon, Citrus reticulata and Citrus sinensis) aqueous extract and its characterization. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 102, p. 15–23, fev. 2013.

TAI, Y. *et al.* One-step synthesis of highly biocompatible multi-shaped gold nanostructures with fruit extract. **IET nanobiotechnology / IET**, v. 5, n. 2, p. 52, jun. 2011.

TÓDOR, I. S. *et al.* Gold nanoparticle assemblies of controllable size obtained by hydroxylamine reduction at room temperature. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, p. 1–8, 2014.

TOMBÁ CZ, E. *et al.* Magnetite in aqueous medium: coating its surface and surface coated with it. **Romanian Reports in Physics**, v. 58, n. 3, p. 281–286, 2006.

TSAI, S. C. *et al.* Air-assisted ultrasonic spray pyrolysis for nanoparticles synthesis. **Physical Chemistry of Interfaces and Nanomaterials**, v. 4807, p. 261–265, 2002.

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

WALLACE, R. *et al.* Characterisation of ZnO nanoparticle suspensions for toxicological applications. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 371, p. 012080, 2 jul. 2012.

WANG, L. *et al.* Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 36, p. 3780–2, 28 set. 2006.

WANG, X. *et al.* A general strategy for nanocrystal synthesis. **Nature**, v. 437, n. September, p. 121–124, 2005.

YU, H. *et al.* Dumbbell-like Bifunctional Au – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **Nano Letters**, v. 5, n. 2, p. 379–382, 2005.

ZHANG, Q. *et al.* Colloidal synthesis of plasmonic metallic nanoparticles. **Plasmonics**, v. 4, n. 1, p. 9–22, 2009.

ZHOU, H. *et al.* Ultrasensitive DNA monitoring by Au–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomplex. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 163, p. 224–232, 2012.

**APÊNDICE A. Desenho experimental para a síntese de HtAuNP**

<b>Corrida</b>	<b>Ouro mmol L<sup>-1</sup></b>	<b>Hesperetina mmol L<sup>-1</sup></b>
1	7	7
2	1	4
3	7	1
4	1	1
5	4	7
6	4	1
7	7	4
8	4	4
9	1	7

**APÊNDICE B. Propriedades ópticas tabuladas dos complexos estáveis Au:Ht nas proporções 1:2 e 2:1 .**

$\lambda$ (nm)	Força de oscilador	Principal contribuição na transição complexo 1:2	Transições
374.0	0.119	H-12→L (10%), H-7→L+2 (15%), H-6→L+1 (24%), H-2→L+1 (33%)	LMCT/ILCT
446.0	0.060	H-10→L (96%)	LMCT
375.0	0.056	H-12→L (82%)	ILCT
684.0	0.051	H-4→L (44%), H-2→L (45%)	LMCT
$\lambda$ (nm)	Força de oscilador	Principal contribuição na transição complexo 2:1	Transições
509.6	0.027	H-9→L (49%), H-9→L+1 (32%)	MLCT/ILCT
912.5	0.021	H-2→L (26%), H-2→L+1 (32%), H-1→L+1 (24%)	MLCT/ILCT
1070.9	0.019	H-1→L (58%), H-1→L+1 (37%)	MLCT/ILCT
622.1	0.018	H-7→L (24%), H-7→L+1 (10%), H-4→L (34%), H-4→L+1 (21%)	MLCT/ILCT
737.8	0.017	H-9→L+1 (13%), H-4→L (26%), H-4→L+1 (36%)	MLCT/ILCT

**Nota:** As transições foram ordenadas em ordem decrescente da força de oscilador. H e L significam HOMO e LUMO, respectivamente.

**APÊNDICE C. Propriedades ópticas tabuladas dos complexos estáveis Au:Hc nas proporção 1:1 casos (I) e (II).**

$\lambda$ (nm)	f	Principal contribuição na transição caso I	Transições
519.3	0.2667	H-2→L+1 (13%), H-1→L+1 (73%)	LMCT/ILCT
778.3	0.0872	H-2→L (94%)	LMCT/ILCT
487.1	0.0708	H-1→L+2 (61%), H→L+2 (31%)	LMCT/ILCT
513.9	0.0702	H-3→L+1 (10%), H-3→L+2 (12%), H-2→L+1 (49%), H-1→L+1 (17%)	LMCT/ILCT
484.8	0.0651	H-1→L+2 (31%), H→L+2 (62%)	LMCT/ILCT
460.0	0.0580	H-11→L (78%)	LMCT/ILCT
$\lambda$ (nm)	f	Principal contribuição na transição caso II	Transições
758.4	0.0360	H-11→L (43%), H-8→L (38%)	MLCT/ILCT
771.7	0.0192	H-12→L (14%), H-10→L (42%), H-7→L (28%)	MLCT/ILCT
753.0	0.0116	H-14→L (20%), H-12→L (61%), H-7→L (11%)	MLCT/ILCT
804.7	0.0087	H-11→L (33%), H-9→L (30%), H-8→L (31%)	MLCT/ILCT
525.4	0.0033	H→L+2 (99%)	MLCT/ILCT
538.5	0.0027	H→L+1 (99%)	MLCT/ILCT

**Nota: As transições foram ordenadas em ordem decrescente da força de oscilador. H e L significam HOMO e LUMO, respectivamente.**