

**Síntese e Caracterização de Nanopartículas
FeO_x/Au/Ag em Multicamada Núcleo-concha**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Sofia Caseiro Miguel

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

setembro | 2012

**Síntese e Caracterização de Nanopartículas
FeO_x/Au/Ag em Multicamada Núcleo-concha**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Sofia Caseiro Miguel

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTAÇÃO

João Manuel Cunha Rodrigues

CO-ORIENTAÇÃO

Helena Maria Pires Gaspar Tomás



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE $\text{FeO}_x/\text{Au}/\text{Ag}$ EM MULTICAMADA NÚCLEO-CONCHA

**Tese apresentada à UNIVERSIDADE DA MADEIRA para obtenção do grau de mestre
em Bioquímica Aplicada**

Por Carla Sofia Caseiro Miguel

Sob a orientação do Professor Doutor João Manuel Cunha Rodrigues
e co-orientação da Professora Doutora Helena Maria Pires Gaspar Tomás

Centro de Competência de Ciências Exatas e da Engenharia,
Centro de Química da Madeira
Campus Universitário da Penteada 9000-390, Funchal - Portugal

Setembro 2012

A maior parte do que existe não se vê...

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de siglas, acrónimos e abreviaturas	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xv
Objetivos	xvii
Capítulo 1 - Enquadramento teórico	1
1.1 – As nanopartículas em contexto	1
1.2 - Nanopartículas metálicas de ouro e prata	7
1.3 - Nanopartículas magnéticas	11
1.4 - Nanopartículas núcleo-concha	15
1.5 - Síntese e estabilização de nanopartículas	19
1.6 - Caracterização das nanopartículas	23
1.7 - Farmacocinética e biodistribuição vs citotoxicidade	25
Capítulo 2 - Parte experimental	29
2.1 - Reagentes	29
2.2 - Equipamento	29
2.3 - Preparação de nanopartículas	30
2.3.1 - Nanopartículas de Au	30
2.3.2 - Nanopartículas de Ag	31
2.3.3 - Co-redução de uma mistura de iões de ouro e prata	32
2.3.4 - Redução sucessiva dos dois sais metálicos	33
2.3.5 - Nanopartículas de óxido de ferro	33
2.3.6 - Revestimento de nanopartículas de óxido de ferro com ouro	34
2.3.7 - Revestimento de nanopartículas de óxido de ferro com prata	34
2.4 - Caracterização de nanopartículas	35
2.5 - Ensaio de citotoxicidade	35
2.5.1 - Cultura de células	35
2.5.2 - Teste de citotoxicidade	36
Capítulo 3 - Resultados e discussão	39

3.1 - Nanopartículas de Au	39
3.1.1 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com β -D- glucose	39
3.1.2 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com β -D- glucose na presença de amido.....	41
3.1.3 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com β -ciclodextrina	41
3.2 - Nanopartículas de Ag	42
3.2.1 - Redução de AgNO_3 com β -D-glucose através do uso de microondas.....	42
3.2.2 - Redução de AgNO_3 com β -D-glucose num banho termostatzado	42
3.2.3 - Redução de AgNO_3 com NaBH_4	42
3.2.4 - Redução de AgNO_3 com β -ciclodextrina	42
3.3 - Nanopartículas de Fe_3O_4	43
3.4 – Ligas de nanopartículas de Ag e Au	44
3.5 - Nanopartículas em multicamada núcleo-concha.....	48
3.5.1 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sobre NP de Ag.....	48
3.5.2 - Redução de AgNO_3 sobre NP de Au e $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sobre NP de Ag com β -ciclodextrina	51
3.5.3 - Nanopartículas de Fe_3O_4 -Au.....	53
3.5.4 - Nanopartículas de Fe_3O_4 -Ag.....	58
3.6 - Ensaio de citotoxicidade	59
Conclusão	65
Referências	69
Anexo I - Técnicas experimentais	81
I.1 - Difração de raios-X	81
I.2 - Dispersão dinâmica da luz.....	83
I.3 - Espectroscopia de dispersão de energia.....	87
I.4 - Espectroscopia do ultravioleta-visível	89
I.5 - Microscopia eletrónica de transmissão	91
I.6 - Potencial zeta	93
Anexo II - Procedimentos experimentais	95
Anexo III - Resumo das características das NP preparadas.....	135

Agradecimentos

Estou grata pelas circunstâncias,

Pela educação, que agora sinto como um privilégio,

Pela oportunidade de regressar à Universidade.

Agradeço ao Professor Doutor João Rodrigues por acreditar em mim e ter a paciência necessária para entender as incompreensões de uma não química no laboratório. Agradeço igualmente todas as conversas e as palavras que alavancaram muitas ideias.

Agradeço à Professora Doutora Helena Tomás a confiança, a disponibilidade, a ajuda e também as palavras tranquilizadoras quando as dúvidas mais básicas surgiram.

Estou grata ao meu patrocinador número um, o Manel Balbino, que com o seu salário único foi conseguindo manter o barco apesar das tempestades. Cozinhou e tratou da roupa, brincou com os meninos, para eu poder ficar sentada a queimar pestanas e a engordar as nádegas e a barriga. Além disso, ainda lhe sobrou tempo para variadíssimas revisões, opiniões e sugestões.

Estou grata aos meus queridos filhos que são o meu tesouro precioso.

Estou grata à minha Mãe porque sonho em grande. Porque entre feijões, trigo e mosquitos me deu o gozo pela vida e o seu mistério. Por todas as dúvidas tiradas à distância de um telefonema e também por todas as correções aos meus escritos.

Estou grata ao meu Pai porque apesar da exigência ensinou-me a sorrir na adversidade.

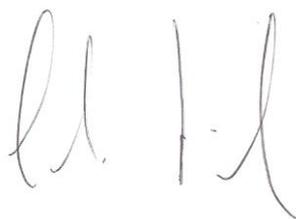
Aos meus irmãos pelo apoio incondicional e por continuarem a acreditar em mim.

Aos amigos que com palavras de admiração e respeito me dão força e energia para continuar a tentar realizar o meu potencial.

E o discurso vai longo. Estou grata porque tenho o privilégio de ter uma família linda, um teto para viver, saúde, alegria de vida, liberdade e porque tenho uma cabeça pensante.

Estou igualmente grata a todos os que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento enquanto estudante universitária. Aos colegas da UMa, aos colegas do CQM e do Grupo de Química de Coordenação e Materiais Moleculares do CQM, ao Centro de Química da Madeira através do projeto estratégico FCT (PEst-OE/QUI/UI0674/2011), ao Professor Xiangyang Shi e aos fundos da Cátedra em Nanotecnologias (UMa/Santander/FCT).

Porque “nunca se desiste”, não sem prejuízo da família, comecei e agora acabo este empreendimento.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carla Miguel', with a stylized, cursive script.

Carla Miguel

Setembro de 2012

Resumo

Nesta dissertação, apresenta-se o trabalho realizado no decorrer do segundo ano do Mestrado em Bioquímica Aplicada. Prepararam-se nanopartículas metálicas através da redução química de sais metálicos em solução. Obtiveram-se soluções coloidais monometálicas de Au, Ag e FeO_x e bimetalicas de Au/Ag, Ag/Au, FeO_x/Au e FeO_x/Ag seguindo ou adaptando métodos publicados na literatura. Numa primeira fase foram sintetizadas nanopartículas monometálicas de prata e ouro utilizando-se β-D-glucose, borohidreto de sódio e β-ciclodextrina como agente redutor dos iões metálicos. Seguidamente, por co-redução de uma mistura de iões prepararam-se ligas de nanopartículas de prata e ouro e por redução sucessiva de Ag e Au sintetizaram-se nanopartículas com uma estrutura núcleo-concha. As nanopartículas de FeO_x foram preparadas por co-precipitação de Fe (III) e Fe (II). O revestimento com ouro foi conseguido através da redução com citrato de sódio e para a deposição de prata utilizou-se o ácido ascórbico. As soluções coloidais preparadas foram caracterizadas através de estudos de espectroscopia do UV-vis, tendo sido registados os máximos de absorvância característicos do ouro e da prata e os desvios esperados para o caso das nanopartículas núcleo-concha. As análises por dispersão dinâmica de luz permitiram auferir o tamanho das nanopartículas, eventual aglomeração e, portanto, permitiram a apreciação da estabilidade dos coloides. Com o intuito de confirmar a formação de estruturas em camada núcleo-concha foi feita a caracterização das amostras por microscopia eletrónica de transmissão e espectroscopia de raios-X de energia dispersiva. Alguns dos espectros obtidos confirmam o sucesso na preparação de uma estrutura em multicamada. Finalmente, demonstrou-se a biocompatibilidade de algumas amostras preparadas através da realização de estudos de citotoxicidade na linha celular fibroblástica NIH 3T3.

Palavras-chave: *Nanopartículas, ouro, prata, óxido de ferro, redução química, citotoxicidade.*

Abstract

This dissertation presents the work performed during the second year of the MSc in Applied Biochemistry. Metallic nanoparticles were prepared by chemical reduction of metal salts in solution. Colloidal solutions with monometallic particles of Au, Ag and FeO_x, as well as bimetallic particles of Au/Ag, Ag/Au, FeO_x/Au and FeO_x/Ag, were obtained following or adapting methods published in the literature. Initially, monometallic nanoparticles of silver and gold were synthesized using either β-D-glucose, sodium borohydride and β-cyclodextrin as reducing agent of the metal ions. Nanoparticles alloys of silver and gold were then prepared by co-reduction of a mixture of ions and by subsequent reduction of Ag and Au, thereby resulting in the synthesis of nanoparticles with a core-shell structure. FeO_x nanoparticles were prepared by co-precipitation of Fe (III) and Fe (II). The gold coating was accomplished by reduction with sodium citrate, while ascorbic acid was used to coat FeO_x with silver. The nanoparticles were characterized by UV-vis spectroscopy, where the maximum absorbance characteristics of gold and silver were recorded. In the case of the core-shell nanoparticles, the expected deviations were recorded. Analysis by dynamic light scattering allowed for the acquisition of data on nanoparticle size and eventual agglomeration, thereby assessing the stability of the colloidal solutions. In order to confirm the formation of particles having a core-shell structure, samples were characterized by transmission electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy. Some of the spectra obtained confirmed the successful preparation of core-shell structures. Finally, cytotoxicity studies using the NIH 3T3 fibroblastic cell line demonstrated the biocompatibility of some of the samples that were prepared.

Keywords: *Nanoparticles, gold, silver, iron oxide, chemical reduction, cytotoxicity.*

Lista de siglas, acrónimos e abreviaturas

AA	Antibiótico e antimicótico
DDS	<i>Drug delivery system</i> / Sistema de entrega de fármacos
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> / Dispersão dinâmica da luz
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> / Meio para células em cultura
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDX	<i>Energy dispersive x-ray spectroscopy</i> / Espetroscopia de raios-x de dispersão de energia
FT-IR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> / Espetroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i> / Imagem da ressonância magnética
MTT	(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NIR	Near infrared / Infravermelho próximo
NP	Nanopartículas
NPM	Nanopartículas Magnéticas
PAA	Ácido poliacrílico
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i> / Solução tampão de fosfato salino
PEG	Poli(et)ilenoglicol
PS	Poliestireno
PVP	Polivinilpirrolidona

Ref.	Referência
SBF	Soro bovino fetal
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> / Microscopia eletrónica de varrimento
SERS	<i>Surface-enhanced Raman scattering</i> / Superfícies melhoradas para dispersão de Raman
SPION	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i> / Nanopartícula superparamagnética de óxido de ferro
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> /Ressonância da superfície plasmónica
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> / Microscopia eletrónica de transmissão
UV-Vis	Espetroscopia do Ultravioleta-Visível
XRD	<i>X-ray diffraction</i> / Difração de raios-X

Índice de figuras

<i>Figura 1 - Copo de Lycurgus [3].</i>	1
<i>Figura 2 - Evolução cronológica dos nanomateriais aceites pela FDA para aplicação médica. Adaptado da Ref. [16].</i>	4
<i>Figura 3 - Aplicação teranóstica de nanopartículas de magnetite. Adaptado da Ref. [29].</i>	5
<i>Figura 4 - Diferentes cores das soluções de ouro coloidal em função do tamanho das NP [35].</i> ..	7
<i>Figura 5 – Alinhamento dos dipolos magnéticos para diferentes tipos de magnetismo: (a) ferromagnetismo (b) antiferromagnetismo e (c) ferrimagnetismo. Adaptado da Ref. [53].</i>	11
<i>Figura 6 - Curva de magnetização versus campo magnético para nanopartículas superparamagnéticas (NP SPM) e ferri- ou ferro-magnéticas (NP FM) onde (H_C) é o campo coercivo, (M_S) a magnetização de saturação e (M_R) a magnetização remanescente. Adaptado da Ref. [30]</i>	12
<i>Figura 7 - Estrutura em espinela inversa da magnetite. (a) Ilustração de um lado da unidade cúbica da célula (b) Ilustração do plano [111] com a organização ferrimagnética na magnetite. Adaptado da Ref. [58].</i>	13
<i>Figura 8- Esquema da estrutura núcleo-concha. Adaptado da Ref. [80].</i>	16
<i>Figura 9 - Mecanismo de síntese de NP na fase líquida. Adaptado da Ref. [1].</i>	20
<i>Figura 10 - Partícula estabilizada (a) eletrostaticamente e (b) por repulsões estéricas. Adaptado da Ref. [89]</i>	21
<i>Figura 11 – NP funcionalizada. Adaptado da Ref. [17].</i>	22
<i>Figura 12 - Espectro eletromagnético e rosa das cores [94].</i>	23
<i>Figura 13 - Barreiras fisiológicas e limitações que condicionam a ação de uma nanopartícula para ação terapêutica. Adaptado da Ref. [17]</i>	26
<i>Figura 14 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Au. Evolução da banda de absorção com o pH.</i>	40
<i>Figura 15 – Distribuição de tamanhos das NP de Au, obtida por DLS.</i>	41
<i>Figura 16 - Nanopartículas de Fe_3O_4 (a) sob a influência de um íman e (b) dispersas em água.</i>	43

<i>Figura 17 – Mecanismo de reação de formação de partículas de magnetite a partir de uma mistura aquosa de cloreto ferroso e férrico por adição de uma base [57].</i>	43
<i>Figura 18 – Fotografia das NP de Au-Ag e respetivo espectro de absorção UV-Vis.</i>	45
<i>Figura 19 – Distribuição de tamanhos das NP preparadas por co-redução dos dois sais metálicos, obtida por DLS.</i>	46
<i>Figura 20 - Espectros de EDX das amostras (a) Au-Ag 1:3 e (b) Au-Ag 1:1.</i>	47
<i>Figura 21 – Fotografias e imagens TEM das amostras de Ag, Au e Au-Ag 1:3.</i>	48
<i>Figura 22 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Ag-Au obtidas pela redução sucessiva de ouro sobre prata coloidal.</i>	49
<i>Figura 23 – Distribuição de tamanhos das NP de Ag-Au, obtida por DLS.</i>	50
<i>Figura 24 – Micrografia TEM e espectro EDX da amostra CM-01-81 Ag/Au.</i>	50
<i>Figura 25 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Ag, Ag-Au, Au e Au-Ag preparadas usando β-ciclodextrina como agente redutor.</i>	51
<i>Figura 26 – Distribuição de tamanhos, obtida por DLS, das NP de Ag, Ag-Au, Au e Au-Ag preparadas usando a β-ciclodextrina como agente redutor.</i>	52
<i>Figura 27 - Micrografia TEM e espectro EDX da amostra Au-Ag.</i>	52
<i>Figura 28 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Fe_3O_4 e Fe_3O_4-Au.</i>	54
<i>Figura 29 – Espectro de EDX das NP de Fe_3O_4-Au.</i>	55
<i>Figura 30 – Imagens TEM das NP de Fe_3O_4-Au.</i>	55
<i>Figura 31 – Imagem das NP de Fe_3O_4-Au preparadas (a) sob condições ácidas e (b) em meio básico.</i>	56
<i>Figura 32 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Fe_3O_4-Au.</i>	56
<i>Figura 33 – Distribuição de tamanhos das NP de Fe_3O_4-Au, obtida por DLS.</i>	57
<i>Figura 34 - Espectro de absorção UV-Vis das NP de Fe_3O_4/Ag.</i>	59
<i>Figura 35 - Espectros de absorção UV-Vis das NP monometálicas usadas nos testes de citotoxicidade.</i>	59
<i>Figura 36 - Espectros de absorção UV-Vis das NP núcleo-concha usadas nos testes de citotoxicidade.</i>	60

<i>Figura 37 – Fotografias das células após 70h de exposição às diferentes concentrações de NP.</i>	61
<i>Figura 38 – Percentagem de viabilidade para as quatro amostras de NP testadas.</i>	62
<i>Figura 39 – Controlo do sobrenadante. Adaptado da Ref. [112].</i>	63

Índice de tabelas

<i>Tabela 1- Diferentes tipos de nanopartículas ferri- ou ferro-magnéticas</i>	<i>13</i>
<i>Tabela 2- Classificação das nanopartículas núcleo-concha. Adaptado da Ref. [13]</i>	<i>17</i>
<i>Tabela 3 - Potencial de redução dos metais em estudo [13]</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 4 - Principais técnicas utilizadas na caracterização de NP</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 5 – Composições monometálicas e núcleo-concha testadas durante o estudo de citotoxicidade</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 6 - Variação do pH em função da quantidade de NaOH adicionado</i>	<i>39</i>

Objetivos

Atualmente, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro são utilizadas com bons resultados no diagnóstico clínico. Contudo, apenas alguns artigos descrevem a sua utilização simultânea para diagnóstico e terapia (aplicação teranóstica). As NP em multicamada núcleo-concha representam uma estratégia alternativa que alia estes dois aspectos. As nanopartículas de FeO_x , utilizadas em imagem na ressonância magnética e na fototerapia do cancro, são adequadas para a estrutura interior (um núcleo) na preparação de NP em multicamada núcleo-concha. O ouro e a prata são metais já bem conhecidos em química médica e, dada a facilidade de ajuste de condições (*tunability*), propriedades óticas e fisiológicas únicas, têm uma série de possíveis aplicações que vão desde a terapêutica *in vitro/vivo*, transporte de fármacos, imagem e diagnóstico, até à monitorização do tratamento podendo funcionar como estrutura exterior (concha).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas monometálicas de Au, Ag e FeO_x , nanopartículas em multicamada núcleo-concha de Au/Ag, Ag/Au, FeO_x/Au e FeO_x/Ag e investigar a sua citotoxicidade em culturas celulares específicas (células animais da linha celular fibroblástica NIH 3T3), com a finalidade de fornecer um contributo para um melhor entendimento das características de biocompatibilidade destes materiais para que no futuro possam ser utilizados com segurança no diagnóstico e na terapia clínica.

Capítulo 1 - Enquadramento teórico

1.1 - As nanopartículas em contexto

Uma nanopartícula caracteriza-se por ter um tamanho entre 1 a 100nm [1]. As nanopartículas (NP), hoje na ordem do dia, são utilizadas desde há muito. De facto, até ao século IX as NP foram utilizadas na Mesopotâmia por artesãos, para criar um efeito brilhante na superfície de vasos. O Copo de *Lycurgus*, artefacto do século IV, (Figura 1) é considerado como um dos mais antigos registos de um objeto que integra nanomateriais. Apesar de forma não deliberada, e de não ser conhecida a composição destes materiais e das suas propriedades, séculos antes de Cristo já eram usados objetos que empregavam nanopartículas [2].



Figura 1 - Copo de Lycurgus [3].

O brilho e a cor de cobre metálico, de peças cerâmicas da Idade Média e do Renascimento, eram alcançados através de um filme metálico, contendo nanopartículas de prata, ouro e cobre dispersos homogeneamente na matriz vítrea do esmalte cerâmico, aplicado à superfície transparente de um vidro. Estas NP foram criadas pelos artesãos, adicionando cobre e sais de prata e ouro e óxidos juntamente com ocre vinagre e argila, à superfície de vidro [4].

Desde a alquimia medieval que o ouro é considerado como o mais perfeito dos metais. O elixir que concederia vida eterna aos seres humanos resultaria da transformação de outros metais em ouro. A sua utilização como agente terapêutico remonta a 2.500 A.C. na China. Na Europa, suspensões de ouro em água são empregues desde a Idade Média, no tratamento da sífilis, alcoolismo, tuberculose e artrite reumatoide [2].

Michael Faraday (1791-1867) foi o primeiro cientista a estudar de forma sistemática e científica as propriedades das NP tendo desenvolvido um método de síntese de coloides de ouro [5]. Podemos dizer que a nanociência começa com ele.

Do ponto de vista da física compreendemos hoje em dia a cor amarela do ouro à escala macro assim como a mudança de cor à escala nano. A teoria da relatividade de Einstein explica a interação entre este ouro macro com a luz visível da qual deriva a cor amarela [6]. Um dos maiores contributos para a compreensão das propriedades óticas das nanopartículas foi proposto em 1908, pelo físico alemão Gustav Mie [7]. A sua teoria, que representa uma solução analítica completa das equações de Maxwell para a dispersão da radiação eletromagnética por partículas esféricas, veio ajudar os cientistas a confirmar que o tamanho das partículas determina a cor com que são vistas e também permitiu o desenvolvimento de uma técnica para o cálculo do seu tamanho. Em 1951, Turkevich *et al.* [8] estudaram o processo de nucleação e crescimento do ouro coloidal. Kleemann, baseando-se na teoria de Mie, explica a absorção da prata coloidal em 1968 [9].

A aplicação biomédica das nanopartículas metálicas foi iniciada em 1971 por Faulk e Taylor com a introdução em microscopia eletrónica da técnica de *immunogold labellin*. [Faulk W. P., Taylor, G.M.. *Immunochemistry* 1971; 8: 1081–1083] citado por Boisselier *et al.* [10].

Segundo Atkins *et al.* [11] a versão original de nanotecnologia terá surgido na natureza quando os organismos desenvolveram a capacidade de utilizarem luz e matéria numa escala atómica, a fim de conseguirem materiais capazes de lhes permitir sobreviver e manter todas as funções necessárias à manutenção da vida, nomeadamente sob o ponto de vista trófico, no armazenamento de informação para a replicação do material genético e para o movimento.

A existência de uma grande diversidade de nanopartículas pode ser entendida se considerarmos a natureza química (metais, óxidos metálicos, semicondutores, polímeros, biomoléculas), o tamanho, a forma (esferas, cubos, varas), o estado de dispersão (individualmente dispersas, irreversivelmente agregados e aglomerados), o meio de dispersão (gasoso, líquido, gel, matriz sólida) e a modificação da superfície (revestimento) [1]. As propriedades das NP são fortemente dependentes destas características [12] sendo o tamanho a mais importante. O reduzido tamanho das nanopartículas conduz a uma maior razão área/volume entrando-se por isso num domínio em que os efeitos quânticos predominam [13]. Por outro lado, a existência de uma grande quantidade de átomos à superfície das NP (dado o pequeno tamanho), conduz a uma maior reatividade, o que modifica as propriedades do material de que são feitas quando comparadas com o congénere à escala macro [14]. As propriedades óticas (emissão e/ou absorção de um

determinado comprimento de onda) podem ser controladas pelo tamanho e funcionalização da superfície. Nos metais, o reduzido tamanho das nanopartículas conduz a um melhoramento no comportamento magnético e a uma mais baixa temperatura de fusão ou sinterização [1].

Neste trabalho, centraremos a nossa atenção sobre dispersões aquosas de nanopartículas esféricas metálicas e óxidos metálicos.

Têm sido comercializados vários produtos provenientes das nanotecnologias. Alguns exemplos de aplicação são em medicina, no diagnóstico, em sistemas de entrega de fármacos e engenharia de tecidos; no âmbito da energia para a redução do consumo energético, aumento da eficiência da produção da energia, na utilização de sistemas de energia mais ecológicos e na reciclagem de baterias; na química e ambiente em catálise e filtragem; no setor da informação e da comunicação no desenvolvimento de novos aparelhos semicondutores e optoelectrónicos e também ao nível dos bens de consumo em alimentos, ótica, cosmética e têxteis. É sobre a aplicação biomédica que o nosso estudo irá incidir. O conhecimento acerca dos mecanismos bioquímicos associados à exposição do organismo a estas partículas é limitado. Para a aplicação *in vivo*, um dos fatores críticos é a sua toxicidade. Assim, o primeiro passo para a compreensão da reação do organismo ao contacto com o agente envolve estudos de culturas de células (estudo *in vitro*) [15].

A aplicação da nanotecnologia na medicina (nanomedicina) tem permitido o diagnóstico e a monitorização do tratamento do cancro. Existem uma série de plataformas de terapia de doenças (lipossomas, NP de albumina, NP poliméricas, dendrímeros) aprovadas pela United States Food and Drug Administration (FDA) (Figura 2) estando outras em fase de desenvolvimento. Para a imagiologia apenas estão aprovadas as NP de óxido de ferro [16].

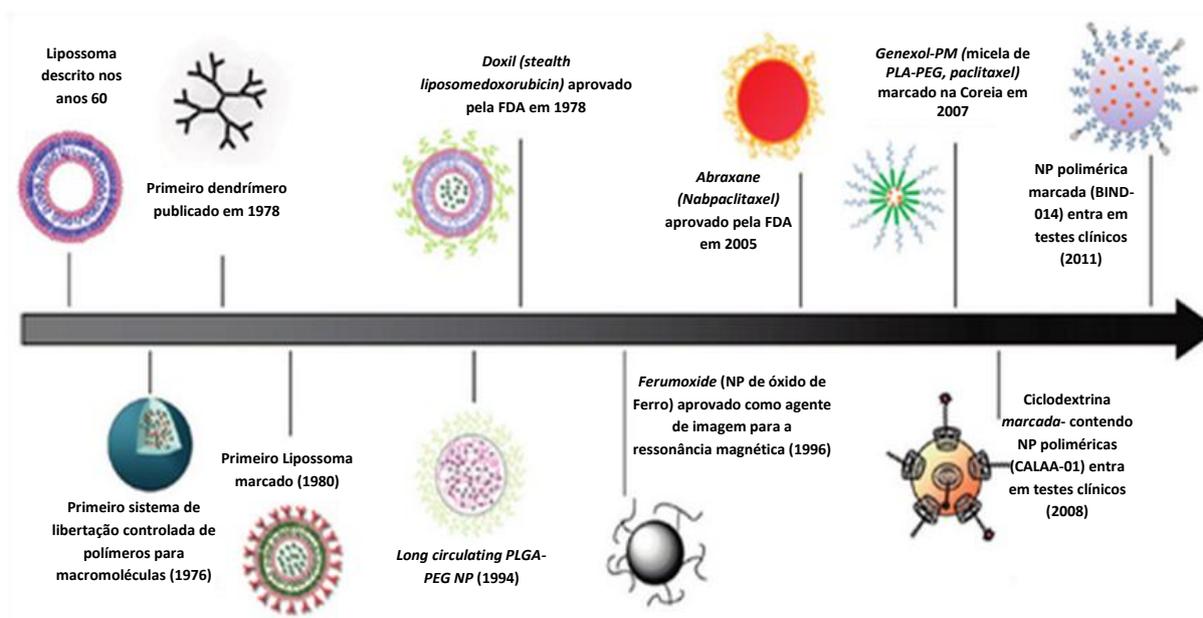


Figura 2 - Evolução cronológica dos nanomateriais aceites pela FDA para aplicação médica. Adaptado da Ref. [16]

Atualmente, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) são utilizadas com bons resultados no diagnóstico clínico [17, 18]. Contudo, apenas alguns artigos descrevem a sua utilização simultânea para diagnóstico e terapia (nanomedicina teranóstica) [19-22]. As NP em multicamada núcleo-concha representam uma estratégia alternativa que alia estes dois aspetos [13, 23-27]. As NP de FeO_x utilizadas em imagem na ressonância magnética (MRI) e na fototerapia do cancro são adequadas para a estrutura interior (um núcleo) na preparação de NP em multicamada núcleo-concha. O ouro e a prata são metais já bem conhecidos em química médica e, dada a facilidade de ajuste de condições (*tunability*), propriedades óticas e fisiológicas únicas, têm uma série de possíveis aplicações que vão desde a terapêutica *in vitro/vivo*, transporte de drogas, imagem e diagnóstico e monitorização do tratamento [28] podendo funcionar como estrutura exterior (concha).

O revestimento do interior (núcleo) das nanopartículas permite, entre outros: a modificação da superfície, a possibilidade de aumentar a funcionalização, a estabilização, a dispersibilidade, e a redução do consumo de materiais preciosos [13].

Melancon *et al.* [27] descrevem os desafios para a aplicação de NP de magnetite com um revestimento de ouro (numa combinação única de propriedades óticas e magnéticas) *in vivo* no diagnóstico e tratamento do cancro. Ito *et al.* sugerem uma estratégia terapêutica, ilustrada na Figura 3, que combina as funções de diagnóstico e terapia [29]. Através de um sistema de

entrega de fármacos (DDS) as nanopartículas de magnetite funcionalizadas acumulam-se nos tecidos tumorais podendo ser utilizadas quer para o diagnóstico, através da ressonância magnética, quer para a terapia por hipertermia magnética, produção de calor sob o efeito de campos magnéticos alternados [30].

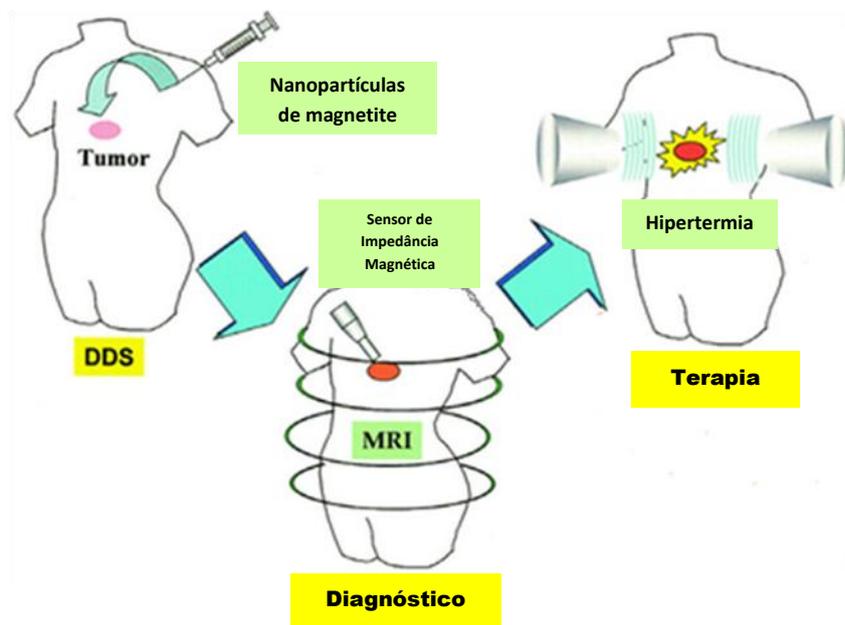


Figura 3 - Aplicação teranóstica de nanopartículas de magnetite. Adaptado da Ref. [29]

A investigação atual aponta para que a medicina teranóstica revolucionará o diagnóstico e a terapia clínica e inclusivamente, potenciará a medicina personalizada, já que permite associar um diagnóstico, que testa possíveis reações a uma nova medicação, a um DDS específico com base nos resultados do teste [31, 32]. Apesar de todo este potencial ainda é necessário muito trabalho de investigação e desenvolvimento para que a aplicação clínica possa ser implementada. A biocompatibilidade, resposta do organismo à presença de um corpo estranho [33], é um parâmetro de grande importância que depende da estrutura das nanopartículas, da sua composição, estabilidade e dispersabilidade sob uma gama de diferentes condições. Uma nanopartícula teranóstica ideal alcançará rápida e seletivamente o tecido alvo, acumular-se-á permitindo a visualização e imagem do tecido e a possível libertação de fármacos. Será segura, preferencialmente biodegradável e não terá subprodutos tóxicos.

É possível sintetizar nanopartículas utilizando uma grande variedade de métodos usando processos na fase sólida, líquida ou gasosa. Neste trabalho, debruçar-nos-emos sobre o método em fase líquida, no qual reações químicas simples darão origem à formação de colóides em

solução. Estes métodos baseiam-se em processos de precipitação em solução em que soluções de diferentes iões podem ser misturadas sob condições controladas (temperatura, pH, pressão...). É assim possível produzir partículas de diferentes tamanhos e morfologia controlando a nucleação e a cinética de crescimento das nanopartículas [1].

1.2 - Nanopartículas metálicas de ouro e prata

Dada a sua estabilidade única enquanto metal puro, o ouro é o elemento mais utilizado em nanociência. Por esta razão as nanopartículas de ouro apresentam um conjunto de bibliografia muito mais alargado do que qualquer outro metal [8, 12, 34]. A coloração avermelhada, característica das nanopartículas de ouro, está relacionada com o seu reduzido tamanho e uma grande quantidade de eletrões à sua superfície. De acordo com a teoria de Mie, a dispersão luminosa produzida pela incidência da luz sobre a superfície de nanopartículas deve-se às oscilações dos eletrões da banda de condução (ressonância plasmónica) que se propagam como ondas, o que conduz ao valor característico de absorção [4, 10]. Tal como as NP de ouro, as NP de prata também apresentam uma ressonância da superfície plasmónica na região do visível que surge a partir da oscilação coerente dos eletrões da banda de condução relativa à rede de iões metálicos.

Para o caso das NP de ouro quando existe aglomeração de partículas ou quando o diâmetro aumenta observa-se uma mudança de cor da solução de vermelho para o azul. Na figura seguinte apresenta-se o aspeto das soluções de ouro coloidal com nanopartículas de diferentes diâmetros.

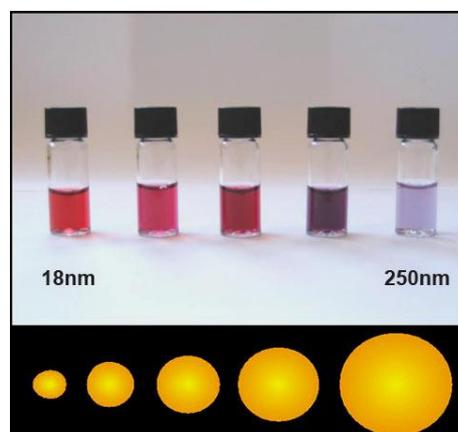


Figura 4 - Diferentes cores das soluções de ouro coloidal em função do tamanho das NP [35].

As diferentes cores podem também surgir reversivelmente em resposta a uma mudança de temperatura. Lv *et al.* [36] desenvolveram NP de ouro cujas propriedades são reversíveis por simples mudanças de temperatura e pH. Liu *et al.*[37] revelam que a carga superficial das nanopartículas coloidais depende precisamente da temperatura. Quando esta aumenta as soluções de ouro coloidal apresentam a cor vermelha e as NP estão dispersas na solução e quando a temperatura diminui a solução coloidal apresenta a cor azul, associada à aglomeração das NP. De

facto, as interações electrostáticas dependem não só das propriedades da superfície das partículas como também do meio de dispersão que as rodeia. Além do pH e da temperatura, as interações electrostáticas dependem da constante dielétrica do solvente e da força iónica (Jurgen 2003) citado por Liu *et al.* [37].

As nanopartículas de Au podem ser utilizadas em diferentes áreas de investigação relacionadas com a biologia em particular em aplicações biomédicas [38, 39] sendo agrupadas em quatro grandes grupos: marcação, entrega de fármacos [40], aquecimento (terapia fototérmica) [41] e deteção [42, 43]. Ao longo das últimas décadas as NP de ouro têm sido amplamente estudadas para utilização na deteção e terapia do cancro [44]. Apesar disso, a sua aprovação farmacêutica depende ainda de estudos mais exaustivos. Craig *et al.* [45] estudaram a sua utilização como veículos de transporte de fármacos de platina anticancerígenos com um melhor alcance e absorção nas células dos órgãos alvo.

A boa condutividade, estabilidade química e a atividade catalítica e antibacteriana da prata coloidal tornam-na particularmente interessante em diversas aplicações (por exemplo na desinfeção de dispositivos médicos, tratamento de águas, embalagens para armazenamento de alimentos, revestimento de têxteis) [46]. Os *quantum dots* de prata são luminescentes e são importantes para aplicações biológicas como sondas, materiais fotoluminescentes e biomarcadores [47]. Apesar da sua ação antimicrobiana e da lenta libertação de iões de prata, pouco se conhece acerca da taxa de dissolução das NP de prata sendo provável que esta dependa não só das espécies químicas destas nanopartículas mas também do tamanho, da funcionalização da superfície e da cristalinidade [48]. Landkveld *et al.* [49] estudaram a influência do tamanho das partículas na distribuição através dos tecidos e verificaram que, independentemente do tamanho, as NP foram rapidamente removidas do sangue e dirigiram-se aos órgãos em estudo. A localização preferencial das NP com diâmetros inferiores a 20nm foi o fígado enquanto as maiores NP se dirigiram preferencialmente para o baço e pulmões. O estudo sugere que o tamanho condicione a toxicidade das nanopartículas. NP esféricas, aniónicas e com diâmetros inferiores a 20nm são supostamente menos tóxicas [50]. Suresh *et al.* [51] sintetizaram nanocristalites de prata com um tamanho e forma uniformes mas com diferentes revestimentos de superfície que conferiam elevadas cargas positivas e negativas. Estes autores demonstram que as propriedades físico-químicas das NP de prata incluindo a sua carga superficial, ligação diferencial e potencial de agregação, são influenciados pelo revestimento da superfície e são o fator determinante que provoca a citotoxicidade e que condiciona as potenciais interações celulares.

Embora não exista uma toxicidade inerente, os estudos toxicológicos são fundamentais para que se garanta que as nanopartículas não tenham um efeito adverso na saúde. Apesar dos vários estudos apresentados até agora, ainda não foram apresentados procedimentos sistemáticos com resultados definitivos [52]. Porém, poder-se-á dizer que uma das formas de aumentar a biocompatibilidade das NP é utilizar o ouro e a prata como revestimento pois este melhora as propriedades físicas e aumenta a estabilidade química das NP protegendo-as da corrosão e oxidação.

1.3 - Nanopartículas magnéticas

O magnetismo nos materiais decorre do momento magnético dos elétrons (spin dos elétrons no seu eixo e ao seu movimento orbital em torno do núcleo) [53]. O magnetismo tem uma natureza dipolar. A classificação das propriedades magnéticas dos materiais baseia-se na sua suscetibilidade magnética (χ_m). Uma vez que a magnetização de um material magnético é proporcional ao campo aplicado, a suscetibilidade magnética é um fator de proporcionalidade, definida como $\chi_m = M/H$ onde M é a magnetização e H o campo magnético [54]. Existem vários tipos de magnetismo: o diamagnetismo, uma fraca reação repulsiva negativa do material a um campo magnético aplicado (Cd, Cu, Ag, Sn e Zn em que $\chi_m < 0$), o paramagnetismo, uma fraca reação atrativa do material a um campo magnético aplicado (Al, Ca, O, Pt, Ti para os quais $\chi_m > 0$), e o ferromagnetismo, a criação de uma magnetização muito grande no material quando sujeito a um campo magnético aplicado (depois da remoção do campo aplicado o material retém bastante magnetização, nos metais Fe, Ni e Co), antiferromagnetismo, um tipo de magnetismo em que na presença de um campo magnético os dipolos magnéticos dos átomos se alinham em direções opostas não havendo magnetização (caso do Mn e do Cr no estado sólido à temperatura ambiente) e o ferrimagnetismo, um tipo de magnetismo no qual mediante a aplicação de um campo magnético os momentos dos dipolos magnéticos dos diferentes íons (sólido com ligações iônicas) se alinham de forma antiparalela criando um momento magnético (alguns materiais cerâmicos denominados “ferrites”) [53] (Figura 5).

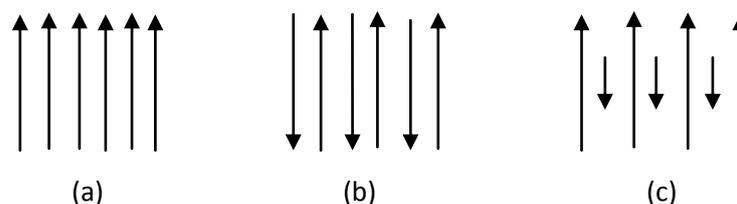


Figura 5 – Alinhamento dos dipolos magnéticos para diferentes tipos de magnetismo: (a) ferromagnetismo (b) antiferromagnetismo e (c) ferrimagnetismo. Adaptado da Ref. [53]

Uma redução de tamanho, abaixo do denominado raio superparamagnético, (da ordem dos 10 nm) induz uma transição magnética nas partículas ferri- ou ferro-magnéticas originando elevados momentos magnéticos sob o efeito de um campo magnético e nenhum momento magnético após a remoção do campo magnético externo. O *superparamagnetismo* é uma forma de magnetismo que ocorre nestas nanopartículas para as quais se verifica uma perda de magnetização na

ausência de um campo magnético [55] (Figura 6). O campo coercivo (H_C) determina a energia necessária para inverter a direção dos dipolos no material e reduzir a magnetização a zero. O ciclo limite (saturação) ocorre para um valor de H suficientemente elevado. A magnetização de saturação (M_S) representa a máxima magnetização possível resultante do alinhamento de todos os dipolos magnéticos no material com o campo exterior. Quando se reduz o campo aplicado até zero verifica-se um magnetismo residual (M_R).

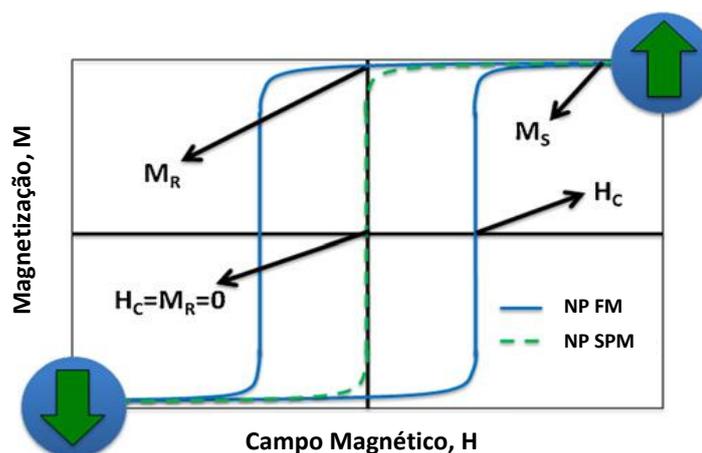


Figura 6 - Curva de magnetização versus campo magnético para nanopartículas superparamagnéticas (NP SPM) e ferri- ou ferro-magnéticas (NP FM) onde (H_C) é o campo coercivo, (M_S) a magnetização de saturação e (M_R) a magnetização remanescente. Adaptado da Ref. [30]

Na Tabela 1 encontram-se os diferentes tipos de nanopartículas magnéticas.

A família dos óxidos de ferro é formada por dezasseis compostos entre os quais se distinguem óxidos, óxidos mistos, oxihidróxidos e hidróxidos de ferro [56]. As NP de magnetite Fe_3O_4 ou magemite $\gamma-Fe_2O_3$ são compostos cerâmicos que possuem uma estrutura cúbica em espinela inversa $B(AB)O_4$ (Figura 7) que corresponde a muitos compostos ditos “ferrites”, como $FeMgFeO_4$, $FeTiFeO_4$, $ZnSnZnO_4$, $FeNiFeO_4$, entre outros, de grande interesse como materiais magnéticos. Nesta estrutura metade dos iões trivalentes, B, está nos interstícios tetraédricos, e os catiões bivalentes, A, bem como a outra metade dos trivalentes estão nos interstícios octaédricos [19, 57].

Tabela 1- Diferentes tipos de nanopartículas ferri- ou ferro-magnéticas		
NPM	Exemplos	Características
Óxido metálicos	SPION (Fe_3O_4 ou $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) MFe_2O_4 onde M é um cátion $^{2+}$ de Mn, Fe, Co ou Ni	Fáceis de sintetizar, biocompatíveis. Compostas por magnetite nanocristalina (Fe_3O_4) ou magemite (Fe_2O_3) e protegidas por um revestimento polimérico são aplicados na MRI e em DDS. A necessidade de melhorar as propriedades magnéticas para aplicação em imagem molecular tem promovido o desenvolvimento de óxidos de ferro dopados com outros metais e ligas revestidas por magnetite ($\text{FePt}/\text{Fe}_3\text{O}_4$).
Metálica	Fe Co Ni	Quimicamente instáveis, formando óxidos na presença de água ou oxigênio, tendência para agregar e portanto protegidos numa estrutura núcleo-concha de Au, SiO_2 ou Fe_3O_4 . Ainda em estudo para a aplicação biológica.
Liga metálica	FePt FeCo FePt/ Fe_3Pt	Exibem propriedades superparamagnéticas, contudo a sua biocompatibilidade está ainda a ser investigada através do encapsulamento em conchas de Au. Esta classe de partículas é principalmente utilizada para fabricar dispositivos para novas aplicações nanomagnéticas porque permite uma engenharia precisa das propriedades magnéticas por ajuste da magnetização, e das dimensões do núcleo e concha.

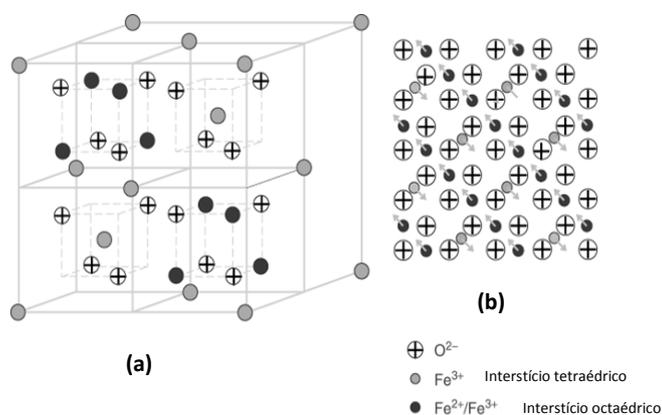


Figura 7 - Estrutura em espínela inversa da magnetite. (a) Ilustração de um lado da unidade cúbica da célula (b) Ilustração do plano [111] com a organização ferrimagnética na magnetite. Adaptado da Ref. [58]

No caso da magnetite, o momento magnético dos cátions Fe^{3+} nos interstícios octaédricos cancela o momento magnético dos íons Fe^{3+} dos interstícios tetraédricos e assim o momento magnético desta ferrite deve-se aos íons Fe^{2+} nos interstícios octaédricos.

A penetração de campos magnéticos através de tecidos humanos e a capacidade para detetar e manipular remotamente materiais magnéticos tem sido usada e investigada para aplicação na medicina há séculos [29].

A redução de tamanho dos materiais magnéticos apresenta vantagens que os tornam adequados para técnicas terapêuticas e de diagnóstico. Parâmetros magnéticos tais como a coercividade das nanopartículas podem ser ajustados através da redução do seu tamanho. Consequentemente, o desempenho biomédico da amostra pode ser otimizado. O superparamagnetismo é especialmente vantajoso para experiências *in vivo*: a ausência de coercividade ou o facto das nanopartículas não apresentarem magnetização depois das medições de diagnóstico ou da terapia vão prevenir a potencial agregação das partículas que poderia causar a formação de embolias nos vasos sanguíneos [30].

Dada à sua biocompatibilidade quando comparada com outros materiais magnéticos, estabilidade química no meio fisiológico e também pela sua fácil síntese, as SPION são importantes nas ciências médicas e biológicas [59, 60]. Tipicamente são constituídas por um núcleo de um metal, ou de um óxido metálico, encapsulado por um revestimento metálico, polimérico ou cerâmico, de modo a melhorar a estabilidade e aumentar o tempo de meia vida no organismo e minimizar a sua toxicidade a qual, normalmente depende da dose [61].

As SPION têm sido utilizadas experimentalmente num número significativo de aplicações tais como agentes de contraste para a MRI [62, 63] e no tratamento por hipertermia e em DDS [64], em particular a entrega de fármacos controlada magneticamente.

Carregando cisplatina em NP Au- Fe_3O_4 Xu *et al.* [65] sugerem uma nova estratégia de tratamento fototérmico para o glioma maligno. A utilização de conchas de metais nobres, que promovem o revestimento do núcleo metálico, evita a sua corrosão e oxidação. Além disso, a interação entre os dois metais pode aumentar a estabilidade química [66]. O revestimento de nanopartículas magnéticas com ouro confere à magnetite propriedades plasmónicas o que as torna muito interessantes para aplicações óticas, biológicas e magnéticas [67].

1.4 - Nanopartículas núcleo-concha

As nanopartículas núcleo-concha são nanoestruturas compostas por um material interior (núcleo) revestido por outro (concha) [13, 68]. Uma nanoconcha metálica consiste numa nanopartícula esférica dielétrica rodeada por uma camada metálica ultrafina (concha). Variando a composição e a espessura da concha das nanopartículas, as nanoconchas podem ser projetadas e preparadas com ressonâncias plasmônicas desde o visível até às regiões infravermelhas do espectro eletromagnético (Oldenburg, 1999) citado por Hirsch *et al.* [25]. Além disso, as nanoconchas metálicas mostram superfícies melhoradas para dispersão de Raman (SERS), permitindo conceber substratos que correspondam ao comprimento de onda desejado em função da aplicação, por exemplo, um nanosensor a operar no infravermelho próximo (NIR), onde a penetração da radiação através dos tecidos é máxima pode ser utilizado em ensaios no sangue, em espectroscopia intracelular ou no diagnóstico *in vivo* [25]. As NP bimetálicas de ouro e prata com diferentes razões e estruturas são os sistemas mais encontrados na literatura. É fundamental ter um controle simultâneo e preciso do tamanho e composição química do núcleo e da concha. As propriedades podem ser modificadas mudando os materiais constituintes ou a razão núcleo-concha [13]. Os desafios experimentais são vários: o controlo preciso da continuidade do revestimento (evitar o crescimento descontínuo sobre o núcleo), uma nucleação independente do material da concha [69, 70], a espessura do revestimento e a monodispersividade [71]. Em princípio existe uma forte correlação entre a forma do núcleo e da concha sendo possível a preparação de NP núcleo-concha com a morfologia desejada [72].

Quando comparadas com as NP monometálicas, este tipo de estrutura bimetálica exhibe características melhoradas, já que existe partilha de eletrões entre os dois metais e também efeitos geométricos causados pelos diferentes parâmetros da rede [73]. As propriedades físicas e a reatividade química das NP núcleo-concha podem ser formatadas através do ajuste da composição, espessura e estrutura da superfície da concha [74]. Por exemplo, devido à mudança dielétrica na interface entre o ouro e a prata a banda da superfície plasmónica do ouro pode ser melhorada através do revestimento com prata [75].

Conforme anteriormente referido, as propriedades óticas do ouro, na concha, combinadas com as propriedades magnéticas do óxido de ferro, no núcleo, (Figura 8) conduzem a uma estrutura com propriedades únicas que poderão ser utilizadas simultaneamente numa estratégia combinada

teranóstica (de detecção e terapia) [27, 76-78]. Lim *et al.* [79] demonstraram a capacidade destes sistemas para a funcionalização biológica.

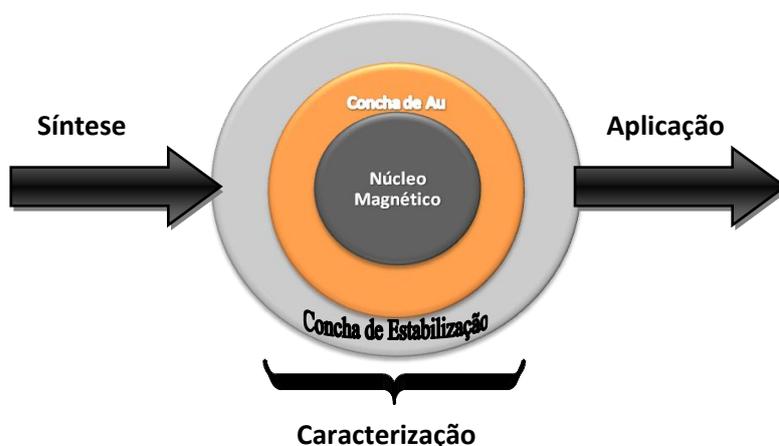


Figura 8- Esquema da estrutura núcleo-concha. Adaptado da Ref. [80]

As NP multifuncionais que combinam agentes terapêuticos e de imagem e que respondem a um estímulo externo representam uma ferramenta poderosa na monitorização da entrega e da libertação de fármacos e no estudo da sua eficácia [81].

Além das NP $\text{FeO}_x\text{-Au}$ existem outros sistemas que podem ser utilizados na hipertermia, por exemplo as nanoconchas de sílica-ouro. A utilização de nanoconchas na terapia fototérmica representa uma estratégia promissora de tratamento do glioma maligno [82].

O artigo de revisão de Chaudhuri *et al.* [13] descreve detalhadamente a grande variedade de NP núcleo-concha agrupadas de acordo com o material que lhes deu origem. Assim têm-se quatro grandes grupos: inorgânico/inorgânico, inorgânico/orgânico, orgânico/inorgânico e orgânico/orgânico (Tabela 2). O nosso sistema enquadra-se no primeiro grupo com concha de outro material inorgânico que não sílica. Além das possibilidades incluídas na tabela este primeiro grupo engloba também os semicondutores/não-semicondutores como o sistema CdS/SiO_2 , os semicondutores/semicondutores por exemplo CdSe/ZnS e os lantanídeos inorgânico/inorgânico (LaF_3/Eu).

Tabela 2- Classificação das nanopartículas núcleo-concha. Adaptado da Ref. [13]				
Grupo	Concha	Núcleo		Exemplo
Inorgânico-Inorgânico	SiO ₂	Metálico	Au, Ag, Ni, Fe	Au/SiO ₂
		Óxido metálico	Fe ₃ O ₄ , ZnO	ZnO/SiO ₂
		Calcogeneto	CdS, AgI	CdS/SiO ₂
		Sal metálico	CaCO ₃	CaCO ₃ /SiO ₂
	Outro material (Ag, Co, Pt, Fe, Cu)	Metálico	Au, Ni, Fe, Ag	Au/Ag
		Não metálico	C	C/Au
		Óxido metálico	Fe ₃ O ₄	Fe ₃ O ₄ /Au
		Calcogeneto	CdS	CdS/Ag
Inorgânico-Orgânico	Orgânica (Polimérica)	Magnético	Metálico	Fe/PS
			Óxido metálico	Fe ₃ O ₄ /PEG
		Não magnético	Metálico	Ag/PS
			Óxido metálico	SiO ₂ /PS
			Calcogeneto	CaCO ₃ /PS
			Sal metálico	ZnSe/Ácido ascórbico
Orgânico-Inorgânico	Inorgânica	Orgânico		Poliuretano/Au
Orgânico-Orgânico	Orgânica	Orgânico		PS/N-isopropilacrilamida

1.5 - Síntese e estabilização de nanopartículas

Existem duas abordagens distintas para a síntese de NP metálicas, de-cima-para-baixo (top-down) ou de-baixo-para-cima (bottom-up), resultando em diferentes formas e tamanhos. O primeiro é um método físico/mecânico que consiste na redução de partículas macroscópicas para a escala nano. Pouco apropriado quando se pretende um controle estreito do tamanho e da forma. O segundo é um método químico, também conhecido como auto-montagem. Começa com o controle de átomos e moléculas a fim de obter estruturas funcionais maiores [11] e envolve a dissolução de um sal num determinado solvente. O primeiro passo envolve a redução dos íons metálicos em solução por um agente redutor adequado.



Os átomos produzidos atuam como centros de nucleação catalisando a redução dos íons remanescentes presentes na solução [42]. Existe hoje um vasto conjunto de métodos de síntese. Por exemplo no artigo de revisão de Wahajuddin e Arora [83] encontra-se uma descrição detalhada para a preparação nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético através de processos que vão desde o antigo método da co-precipitação até à pirólise induzida por laser. No caso da prata e do ouro e em particular para um sistema núcleo-concha, Anandan et al. descrevem um processo de síntese sonoquímica [84], através do qual é possível produzir nanomateriais com uma distribuição de tamanhos muito inferior à obtida por outros métodos. Neste trabalho as NP foram preparadas por redução química em solução aquosa. Neste caso, temos um sistema de três componentes: um solvente (a água), um precursor (sal metálico) e um agente redutor. Adicionalmente podemos ter também um agente surfatante, um tensoativo que é utilizado para promover a estabilização das nanopartículas. Na figura seguinte apresenta-se o mecanismo de síntese de NP na fase líquida.

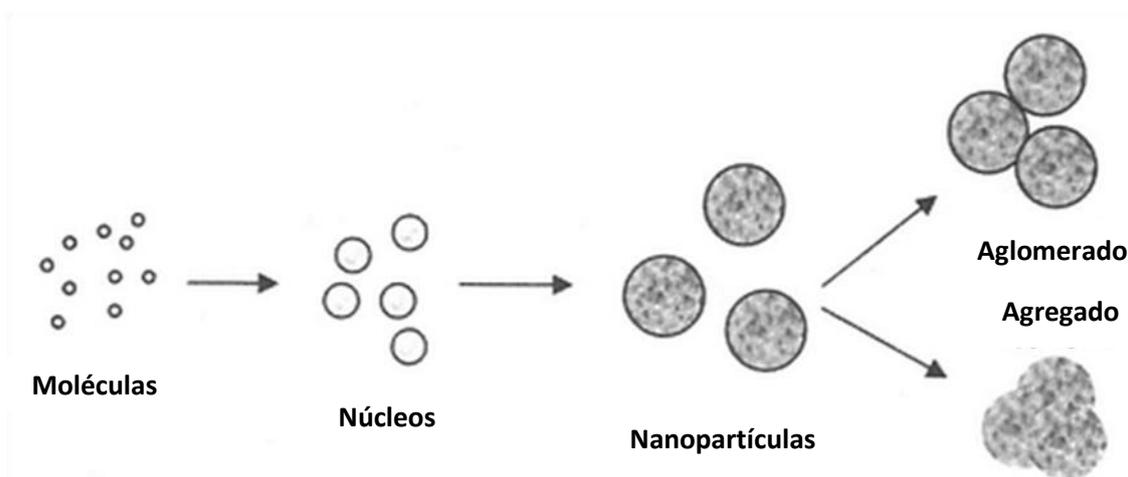


Figura 9 - Mecanismo de síntese de NP na fase líquida. Adaptado da Ref. [1]

Atkins *et al.* [11] consideram como etapas básicas desta síntese a solvatação dos reagentes e aditivos, a formação de um núcleo sólido e estável a partir da solução e o crescimento das partículas sólidas pela incorporação de material até que os reagentes tenham sido consumidos. Os três passos são então a nucleação, o crescimento e a estabilização.

Uma das limitações quando se trabalha com NP é a reprodutibilidade da síntese. Lim e Lee [85] estudaram um conjunto de fatores experimentais que afetam a síntese por redução química de NP de prata e concluíram que todos os parâmetros se relacionam de forma não linear.

Uma vez em contato, um par ou grupo de NP vai coalescer de forma a reduzir a energia de superfície [86]. Numa dispersão coloidal estabilizada e dado o seu movimento Browniano (movimento aleatório das partículas num fluido) as partículas podem colidir mas nunca agregar-se [87]. A estabilização pode ser conseguida com estabilizantes, por exemplo, polímeros, metais e carboxilatos entre outros e pode também ser alcançada através de forças eletrostáticas de iões adsorvidos à superfície das partículas [13, 88, 89]. Na Figura 10 apresentam-se as duas principais metodologias para a estabilização das nanopartículas.

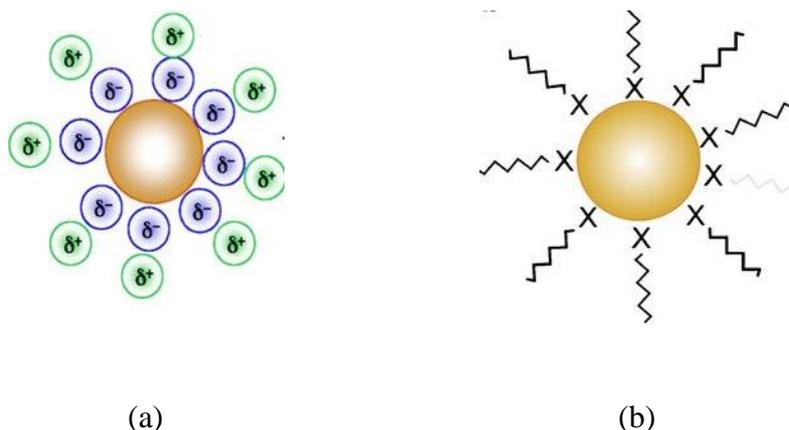


Figura 10 - Partícula estabilizada (a) eletrostaticamente e (b) por repulsões estéricas. Adaptado da Ref. [89]

Outra forma de estabilização consiste no encapsulamento em polímeros. Nanaie et al. descrevem a síntese de nanoestruturas núcleo-concha de prata e ouro estabilizadas em dendrímeros [90].

A escolha do agente redutor é muito importante para controlar a velocidade da reação e o tamanho das partículas [13]. Existe uma grande variedade de agentes redutores e a capacidade de redução do metal está estritamente relacionada com o potencial redox dos diferentes metais. Na tabela seguinte apresenta-se o potencial de redução dos metais em estudo.

Tabela 3 - Potencial de redução dos metais em estudo [13]	
Reação	Potencial do eletrodo padrão, E^0 (V)
$\text{Fe}^{2+} + 2e^- = \text{Fe}$	-0,447
$\text{Ag}^+ + e^- = \text{Ag}$	0,7996
$\text{Au}^+ + e^- = \text{Au}$	1,692

Para determinadas aplicações biológicas é necessário funcionalizar a superfície das NP (Figura 11). As nanopartículas podem ser associadas a ligandos (fármacos, anticorpos, proteínas, enzimas, etc.) que reconheçam de forma específica determinado tipo de células. A modificação da superfície de NP de ouro e prata com diferentes recetores orgânicos é importante, por

exemplo, para o desenvolvimento de marcadores biológicos assim como nanodispositivos optoelectrónicos [91]. O ouro, por exemplo, pode ser repetidamente funcionalizado com moléculas orgânicas de tióis [67, 92].



Figura 11 – NP funcionalizada. Adaptado da Ref. [17]

1.6 - Caracterização das nanopartículas

Depois de sintetizadas as NP têm de ser caracterizadas. A caracterização é importante para perceber e controlar a síntese e as aplicações. As principais técnicas utilizadas na caracterização de NP estão resumidas na Tabela 4. As propriedades óticas de uma NP metálica dependem sobretudo da ressonância da superfície plasmónica. A cor está diretamente relacionada com a absorção parcial da luz pelos eletrões livres das NP, resultando na visibilidade da parte complementar da luz [93]. Na Figura 12 apresenta-se o espectro eletromagnético com os respetivos comprimentos de onda e a rosa das cores.

Os máximos da ressonância plasmónica dependem do tamanho e da forma da nanopartícula, da espécie metálica e do meio dielétrico circundante. Partículas esféricas têm uma função dielétrica complexa dependente da frequência. O coeficiente de absorção é independente do tamanho para grandes partículas mas para partículas pequenas, a existência de eletrões livres na banda de condução, caso da prata e do ouro, conduz a uma mudança na função dielétrica e nas propriedades óticas [93].

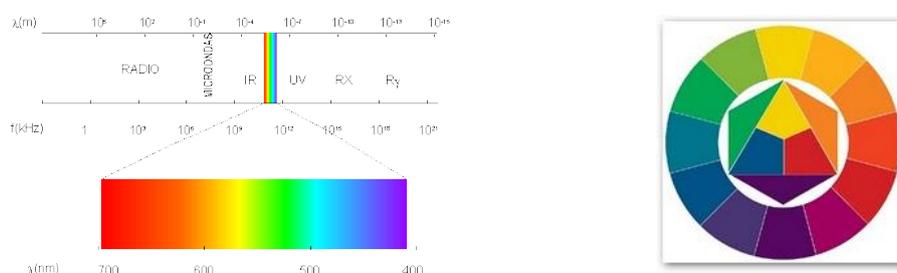


Figura 12 - Espectro eletromagnético e rosa das cores [94]

As NP de prata coloidal esféricas absorvem a um comprimento de onda de 390-420 nm, apresentando uma cor amarela. As NP esféricas de ouro absorvem tipicamente a cerca de 500nm e tem uma cor que varia entre o rosa, violeta, azul e o bordeaux. Este facto permite confirmar a sua formação. A intensidade de absorvância não pode relacionar-se linearmente com o número de partículas uma vez que é dependente do tamanho dos aglomerados [93].

Tabela 4 - Principais técnicas utilizadas na caracterização de NP		
Técnica	Aplicação	Ref.
Curvas de magnetização	Estudo das propriedades magnéticas	[30, 71, 80, 95-97]
DLS	Diâmetro hidrodinâmico	[48, 59, 98]
EDX	Composição química	[92, 96, 99]
FT-IR	Identificação dos tipos de funcionalidades de ligandos associados às NP	[92, 100]
SEM	Análise morfológica (forma e tamanho)	[57, 59, 98]
TEM	Análise morfológica (forma e tamanho)	[23, 30, 48, 57, 59, 67, 71, 80, 92, 95-102]
UV-Vis	Identificação da amostra – ressonância da superfície plasmónica	[23, 67, 71, 92, 99-102]
XRD	Identificação da estrutura através dos padrões de difração	[67, 71, 92, 96, 100, 103]

De forma a confirmar a formação de nanoestruturas núcleo-concha é frequente a utilização de técnicas de XRD em que a estrutura cristalina do núcleo se torna indetetável após recobrimento. Podem também usar-se técnicas eletroquímicas, nomeadamente a voltametria. Aoki *et al.* descrevem a deteção independente de propriedades do núcleo e da concha através da voltametria [88, 104].

1.7 - Farmacocinética e biodistribuição vs citotoxicidade

Conforme já se referiu, no estudo da interação das nanopartículas com as células um dos primeiros aspetos a ter em consideração é a sua biocompatibilidade, a capacidade do material para dar uma resposta adequada numa aplicação específica [33]. As NP deverão ser desenhadas/preparadas para que não sejam tóxicas para as células testadas [105]. Harper *et al.* [106] investigaram a influência do tamanho do núcleo, a química e a carga da superfície na toxicidade do material. Auffan *et al.* [107] descrevem o efeito da estabilidade química e a toxicidade *in vitro*.

Outro dos desafios para a aplicação das nanopartículas *in vivo* é a sua entrega no tecido alvo. A eficácia da maioria destes sistemas está limitada pela presença de barreiras biológicas (Figura 13) [17, 27].

Os parâmetros chave do desempenho das nanopartículas são a sua superfície química, devendo apresentar propriedades físico-químicas uniformes, e o tamanho, deverão ser monodispersas (apresentar uma distribuição estreita de tamanhos) e ter diâmetros inferiores a 100nm.

A biocompatibilidade e a estabilidade das nanopartículas magnéticas podem ser melhoradas através do revestimento - com polímeros ou outros compostos hidrofílicos (polietilenoglicol (PEG), polissacarídeos e outros) [108, 109] - o qual pode aumentar o tempo de meia vida destas de minutos para dias [110]. Para aumentar a eficiência das nanoestruturas magnéticas revestidas com Au, as suas propriedades físico-químicas devem ser minuciosamente controladas [27]. O tamanho deve ser tão pequeno quanto possível para escapar à filtração esplênica (as NP são absorvidas pelas células fagocitárias, acumulando-se no sistema retículo-endotelial, tais como as células “Kupffer” do fígado) [111], mas suficientemente grande para evitar a depuração renal. Por exemplo, nanopartículas maiores que 200nm são sequestradas pelas células fagocitárias do fígado e NP com diâmetros inferiores a 5,5nm são rapidamente removidas através da depuração renal. Além do tamanho, outro aspeto a ter em conta é o tempo de meia vida que deverá ser alargado, de modo a garantir a acumulação no tecido alvo [111]. A superfície química é particularmente importante para evitar a ação do sistema imunológico e aumentar o tempo de meia vida das nanopartículas.

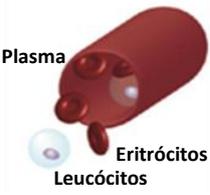
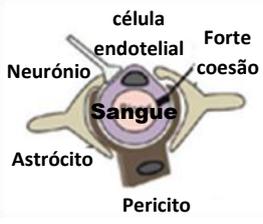
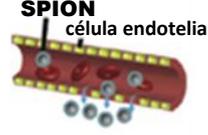
	Sangue	Fígado e Baço	Rins	Barreira Hemato-Encefálica	Extravasão
Barreira	 <p>Plasma Eritrócitos Leucócitos</p>			 <p>célula endotelial Forte coesão Neurónio Sangue Astrócito Pericito</p>	 <p>SPION célula endotelial</p>
Restrições	<ul style="list-style-type: none"> - Fluido altamente complexo - Degradação enzimática - Reconhecimento imunitário 	<ul style="list-style-type: none"> - Objetos > 100 nm são reconhecidos e eliminados da circulação 	<ul style="list-style-type: none"> - Objetos < que os poros de 10 nm do glomérulo são filtrados para fora do sangue 	<ul style="list-style-type: none"> - A forte coesão entre as células endoteliais do cérebro previne o transporte passivo de substâncias 	<ul style="list-style-type: none"> - Os intervalos entre as células endoteliais restringem a saída de materiais do sangue
Estratégias	<ul style="list-style-type: none"> - PEGylation - Polímeros Zwitterionic - Encapsulação do fármaco ou da bioterapêutica 	<ul style="list-style-type: none"> - Diâmetro hidrodinâmico < 100 nm 	<ul style="list-style-type: none"> - Diâmetro hidrodinâmico > 10nm 	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmólise das células endoteliais para abrir o espaço intercelular - Transporte ativo através dos vasos sanguíneos 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da permeabilidade e do efeito de retenção - Diâmetro hidrodinâmico entre 30 e 100 nm

Figura 13 - Barreiras fisiológicas e limitações que condicionam a ação de uma nanopartícula para ação terapêutica. Adaptado da Ref. [17]

Além de se acumularem no retículo endotelial do baço e do fígado, atuando de forma passiva na localização de determinados alvos (*targeting* passivo), as nanopartículas podem, conforme já se referiu, apresentar a capacidade de *targeting* ativo (por exemplo, em relação a determinadas células cancerígenas) através da conjugação a grupos funcionais que possuem uma afinidade elevada para determinadas moléculas ou estruturas biológicas, [27].

Para já centraremos a nossa atenção na aplicação *in vitro*. O primeiro passo para a compreensão de como o organismo reage na presença de um corpo estranho envolve estudos de células em cultura. As nanopartículas podem ter vários efeitos adversos ao nível celular interagindo com os componentes celulares vitais tais como a membrana, citoplasma, ou núcleo. Danos ao nível do ADN, stress oxidativo, apoptose são alguns dos possíveis resultados adversos [112]. Além de um simples teste de inspeção visual microscópica de células, a maioria dos estudos de citotoxicidade usados nos artigos que estudam as nanopartículas mede a morte celular através de métodos colorimétricos nos quais se incluem os que medem a integridade da membrana plasmática e os que estudam a atividade das mitocôndrias [15, 112]. O teste que utilizaremos neste trabalho é o ensaio de viabilidade (para distinguir as células vivas das mortas) mais utilizado. O método

baseia-se na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, que quando ativa, é capaz de metabolizar o MTT (tetrazólio amarelo) num composto púrpura. O número de células vivas pode ser determinado quantificando a produção deste composto e medindo a absorvância a cerca de 500nm [15].

Capítulo 2 - Parte experimental

2.1 - Reagentes

Para a síntese nas NP foram utilizados os seguintes reagentes: ácido cloroaúrico tri-hidratado (Acros, AnalarR Normapur Probalo e Alfa Aesar), amido (Merck), borohidreto de sódio (Riedel-de Haën), β -ciclodextrina (TCI Europe nv), citrato trisódico dihidratado (May & Baker), β -D-glucose (Sigma), hidróxido de sódio (Fluka e Fisher Scientific), nitrato de prata (Panreac), cloreto de ferro (III) hexahidratado (Panreac), cloreto de ferro (II) tetrahidratado (Merck), hidróxido de amónio (Riedel-de Haën), ácido clorídrico (Fisher Scientific) e ácido perclórico (Merck p.a.). As soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura (condutividade 18M Ω) obtida através do sistema de purificação Milli-Q Direct 8 (Millipore).

Nos estudos de citotoxicidade foram utilizadas células de tecido do embrião do rato suíço (fibroblastos de rato) da linha celular NIH 3T3 (DSMZ), meio DMEM (Gibco), AA (Gibco), SBF (Gibco), PBS (Sigma), solução de tripsina (Gibco), MTT (Sigma) e DMSO (Labscan, Riedel-de Haën).

2.2 - Equipamento

Os reagentes foram pesados numa balança (Mettler Toledo AB204). As soluções foram agitadas e aquecidas numa placa de aquecimento Heidolph MR 3001. Os valores de pH das soluções foram medidos utilizando um pH - metro 691 (Metröhm). O micro-ondas (Becken) utilizado tem uma potência de saída de 700W e uma frequência das micro-ondas de 2450MHz. Os espectros de UV-vis foram obtidos num espectrofotómetro Cintra 40 tendo-se utilizado a água ultra pura como branco das amostras e uma célula de quartzo (Labox). As medições de *DLS* foram realizadas no Zetasizer Nano ZS (Malvern). Para a centrifugação das amostras usou-se uma centrifugadora Sigma 3-30K.

A morfologia e composição das amostras foram confirmadas através de imagens de TEM e EDX por um microscópio JEOL 2010F a operar a 200 kV. As amostras para TEM foram preparadas pela deposição de uma gota da suspensão diluída num grelha de cobre revestida com carbono e secas ao ar antes das medições. No anexo I apresenta-se uma descrição das técnicas experimentais utilizadas na caracterização dos nanocristais preparados.

As culturas celulares foram preparadas em câmara de fluxo laminar *Class II Biological Safety Cabinet* (Nuair) e incubadas numa estufa a 37°C e 5% CO₂ *DH Autoflow Automatic CO₂ Air-jacked Incubator* (Nuair). Para a observação das células utilizou-se um microscópio invertido (Olympus CK40) e um microscópio invertido (Nikon) para a obtenção de fotografias. A absorvância foi medida num leitor de placas (Perkin Elmer). As amostras utilizadas nos testes de citotoxicidade foram desidratadas no RVT400 Refrigerated Vapor Trap (Thermo Savant), pesadas numa microbalança (Mettler Toledo AT20) e redispersas num banho de ultrasons (Branson 2510).

2.3 - Preparação de nanopartículas

Tal como já foi referido as NP podem ser sintetizadas por uma grande variedade de métodos usando processos na fase gasosa, líquida ou sólida [1]. Neste trabalho as nanopartículas foram preparadas através da redução de iões metálicos em solução aquosa com diferentes agentes redutores, seguindo ou adaptando diferentes métodos publicados. Depois de sintetizadas procedeu-se à caracterização por UV-Vis, DLS e nalguns casos a TEM e EDX. No anexo II estão os protocolos elaborados. Apresenta-se seguidamente uma descrição detalhada das diferentes metodologias e respetivas condições de síntese.

2.3.1 - Nanopartículas de Au

2.3.1.1 - Redução de H₂AuCl₄·3H₂O com β-D- glucose

As primeiras NP preparadas foram de Au tendo-se utilizado o H₂AuCl₄·3H₂O como precursor e a β-D-glucose como agente redutor e passivante. O método utilizado seguiu o descrito por Liu *et al.* [113]. Fez-se a mistura de 50 µL de uma solução de β-D-glucose (0,03M) e 200 µL de H₂AuCl₄·3H₂O (0,05M). A solução foi agitada à temperatura ambiente por 30min sem haver alteração da cor. Adicionou-se seguidamente gota a gota uma solução de NaOH (0,05M) até não se verificar alteração da cor. Os valores de pH foram sistematicamente medidos durante a adição de NaOH, tendo variado entre 3 e 7.

2.3.1.2 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com β -D- glucose na presença de amido

O protocolo seguiu o artigo de referência de Raveendran *et al.* de 2006 [100]. Neste procedimento as NP foram preparadas à temperatura ambiente através da adição de 80 μL de uma solução 0,1M de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e de 120 μL de uma solução 0,1M de β -D-glucose a 4 mL de uma solução aquosa de amido a 0,20% (p/v), seguida da adição de 30 μL de uma solução 1M de NaOH (pH=4). Neste caso, o amido foi utilizado como agente passivante da superfície das NP a fim de evitar a aglomeração.

2.3.1.3 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com β -ciclodextrina

As NP foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Pande *et al.* [91] através da dissolução, seguida de agitação, de 0,0396g de β -ciclodextrina (β -CD) em 5mL de água. Seguidamente foi feita a adição de 0,02mL da solução do sal metálico HAuCl_4 (10 mM). Passados 2 min., de modo a elevar o pH até 11, adicionou-se 0.05mL de NaOH (1.0 M) à solução. Finalmente, a mistura reacional foi rigorosamente agitada e aquecida em banho-maria (<100 °C). A formação das NP metálicas foi confirmada após 5 min. através da observação da mudança de cor da solução, inicialmente incolor, para cor de rosa-salmão.

2.3.2 - Nanopartículas de Ag

2.3.2.1 - Redução de AgNO_3 com β -D-glucose através do uso de microondas

O protocolo seguiu o artigo de referência de Raveendran *et al.* de 2006 [100]. As NP foram preparadas através da adição de 10 μL de uma solução 0,1M de AgNO_3 e de 25 μL de uma solução 0,1M de β -D-glucose a 2mL de uma solução aquosa de amido a 0,20% (p/v). Para a redução dos íons metálicos a mistura reacional foi aquecida (100°C) no microondas durante 60 segundos.

2.3.2.2 - Redução de AgNO_3 com β -D-glucose num banho termostatizado

As NP de Ag foram sintetizadas adaptando o procedimento descrito por Raveendran *et al.* de 2003 [101]. Adicionaram-se 200 μL de uma solução de AgNO_3 (0,10 M) a 6mL de uma solução aquosa de amido a 0,20% (p/v) agitando-se manualmente até à dissolução completa. Posteriormente, adicionaram-se 300 μL da solução de β -D glucose (0,10 M) à mistura anterior e agitou-se manualmente. Entre cada passo purgou-se a solução sob fluxo de azoto. A mistura

resultante foi finalmente colocada em banho termostatzado à temperatura de 60°C durante 22 horas.

2.3.2.3 - Redução de $AgNO_3$ com $NaBH_4$

As NP de Ag foram sintetizadas de acordo com Solomon *et al.* [102]. Depois de preparadas as soluções aquosas arrefeceu-se a solução de $NaBH_4$ (2 mM) num banho de gelo. Seguidamente, procedeu-se à adição gota a gota, de 10mL da solução de $AgNO_3$ (1 mM), a 30mL da solução de $NaBH_4$ sob agitação vigorosa (700 rpm) numa placa de agitação magnética, até à adição completa da solução de $AgNO_3$.

A mistura reacional passou imediatamente de incolor a amarelo brilhante.

2.3.2.4 - Redução de $AgNO_3$ com β -ciclodextrina

Para a síntese das NP seguiu-se o artigo de Pande *et al.* [91]. Começou-se pela dissolução, seguida de agitação, de 0,0396 g de β -ciclodextrina (β -CD) em 5mL de água. Seguidamente foi feita a adição de 0,02mL da solução do sal metálico $AgNO_3$ (10 mM). Passados 2 min. adicionou-se 0,05mL de NaOH (1,0 M) à solução para elevar o pH até 12. Finalmente, a mistura reacional foi agitada vigorosamente e aquecida em banho-maria (<100 °C). A formação das NP metálicas foi confirmada através da alteração da cor da solução. Passados cerca de 5 min, a solução de prata tornou-se amarela.

2.3.3 - Co-redução de uma mistura de iões de ouro e prata

O protocolo seguiu o artigo de referência de Raveendran *et al.* de 2006 [100]. Neste procedimento as NP foram preparadas à temperatura ambiente com vários rácios Au/Ag (0:1, 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0) através da adição em simultâneo das soluções 0,1M de $H AuCl_4 \cdot 3H_2O$ e 0,1 M de $AgNO_3$ e de 120 μ L duma solução 0,1M de β -D-glucose a 4 mL de uma solução aquosa de amido a 0,20% (p/v), seguida da adição de 30 μ L de uma solução 1M de NaOH. Para a razão 0:1 adicionou-se apenas 80 μ L da solução 0,1M de $AgNO_3$ e para a razão 1:0 adicionou-se apenas 80 μ L da solução 0,1M de $H AuCl_4 \cdot 3H_2O$. No caso da razão de 1:1 adicionou-se 40 μ L de cada um dos sais metálicos e para as razões 1:3 e 3:1 20 μ L e 60 μ L de cada uma das soluções dos sais metálicos.

2.3.4 - Redução sucessiva dos dois sais metálicos

2.3.4.1 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sobre NP de Ag

A redução sucessiva é normalmente utilizada para a preparação de NP bimetálicas com estrutura núcleo-concha [114]. Neste procedimento a síntese das NP de Ag-Au foi feita à temperatura ambiente através da redução de átomos de Au sobre a prata coloidal preparada segundo o procedimento descrito no ponto 2.3.2.3. Começou por misturar-se 80 μL da solução 0,1M de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a 3mL da solução de Ag coloidal na presença de 120 μL de β -D- glucose e 1mL de amido (0,2% peso). Verificou-se e ajustou-se o pH a ~ 7 através da adição de 30 μL de uma solução 1M de NaOH. O procedimento foi repetido usando 160 μL da solução 0,1M de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. A solução passou de violeta a roxo com o aumento da concentração de ouro.

2.3.4.2 - Redução de AgNO_3 sobre NP de Au e $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sobre NP de Ag

A preparação das NP núcleo-concha seguiu o artigo de Pande et al. [91]. Para a síntese de NP Au-Ag adicionou-se gota a gota 0,04 mL de AgNO_3 (10 mM) a 5 mL da solução de ouro coloidal preparada seguindo a metodologia descrita em 2.3.1.3 deixando-se repousar durante 5 min. e aquecendo ($<100^\circ\text{C}$) seguidamente em banho-maria durante cerca de 30min. A formação das NP Au-Ag foi confirmada através da alteração da cor da solução que passou de rosa/salmão a amarelo/avermelhado. Para a síntese de NP Ag-Au adicionou-se gota a gota, sob agitação vigorosa, 0,04 mL HAuCl_4 (10 mM) a 5 mL da solução de prata coloidal preparada em 2.3.2.4. No decorrer da reação, o amarelo da prata coloidal passou a rosa (em cerca de 20min.) o que é indicativo da formação de NP Ag-Au.

2.3.5 - Nanopartículas de óxido de ferro

2.3.5.1 - Em meio básico

As NP foram sintetizadas por co-precipitação do Fe (III) e Fe (II) com hidróxido de amónio de acordo com Khan et al. [96]. Neste procedimento, misturaram-se sob fluxo de azoto, 5 mL da solução de cloreto de ferro (III) hexahidratado (1M) e 1,25 mL da solução de cloreto de ferro (II) tetra hidratado (2M) dissolvido em ácido clorídrico e adicionou-se lentamente 62,5 mL de uma solução de hidróxido de amónio (0,7M). Esta mistura foi vigorosamente agitada por 30 minutos

numa atmosfera de azoto à temperatura ambiente. Após 30 min sob agitação mediu-se e ajustou-se o pH a 10 com hidróxido de sódio (2M). Todas as soluções foram preparadas com água desoxigenada por 30 min. sob fluxo de N₂.

2.3.5.2 – Em meio ácido

A síntese foi baseada nos artigos de referência de Massart [103] e Lo *et al.* [92]. Tal como em 3.3.5.1, as NP foram preparadas pela co-precipitação do Fe (III) e Fe (II) com hidróxido de amónio numa atmosfera de azoto. Misturaram-se as soluções aquosas de FeCl₃ (4mL, 1M) e FeCl₂ (1mL, 2M) dissolvido em HCl (2M) e adicionou-se a mistura a uma solução de NH₄OH (50mL, 0,7M). Depois de agitado por 30 min. o precipitado foi isolado por decantação magnética, agitado com HClO₄ (50mL, 2M) e isolado por centrifugação. Finalmente depois de decantado foi redisperso em 50mL de água desoxigenada por 30 min. sob fluxo de N₂.

2.3.6 - Revestimento de nanopartículas de óxido de ferro com ouro

O objetivo desta síntese é o revestimento de NP magnéticas com ouro [80]. O procedimento adotado para a síntese seguiu o descrito por Lo *et al.* [92]. As NP de Fe₃O₄-Au foram preparadas em duplicado através da redução de 15mL 2mg/cm³ de HAuCl₄·3H₂O adicionado a 105mL de água e aquecidos até à ebulição. Seguidamente adicionou-se, sob agitação, 5mL das NP de Fe₃O₄ preparadas em 3.3.5.1 e em 3.3.5.2 e 5mL de C₆H₅Na₃O₇ (80mmol/dm³). A solução foi novamente levada à ebulição sob agitação durante cerca de 5min.

2.3.7 - Revestimento de nanopartículas de óxido de ferro com prata

A deposição da Ag foi feita à temperatura ambiente através da redução de AgNO₃ usando ácido ascórbico. O procedimento foi baseado no trabalho de Xu *et al.* [67]. Sob fluxo de azoto e agitação misturou-se 5mL de Fe₃O₄ (preparada de acordo com 2.3.5.1) com 3mL de AgNO₃ (1mM) e 3mL de ácido ascórbico (1mM). Seguidamente adicionou-se 0,1mL de NaOH (0,01M). Após a síntese esperou-se cerca de 4h para fazer a medição UV-vis. Foi feita nova adição de AgNO₃, ácido ascórbico e NaOH para estudar o efeito do aumento da espessura da concha no máximo de absorvância característico da prata.

2.4 - Caracterização de nanopartículas

Neste trabalho experimental a espectroscopia de UV-Vis serviu para confirmar a formação das nanopartículas, ao mostrar a ressonância da superfície plasmônica dos elétrons na banda de condução da prata e do ouro [115].

Nem sempre se procedeu à diluição das amostras. Os valores de absorvância apresentados não foram normalizados e são superiores a 1 nalguns casos. Uma vez que o valor da concentração de NP não é conhecido optou-se por mostrar o resultado real após a síntese. De qualquer forma verificou-se que após diluição não há alteração do valor do comprimento de onda do máximo de absorvância.

A *DLS* foi usada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico e também do potencial zeta. Importa referir que na análise por *DLS* a presença de um ruído de fundo pode afetar o espectro de dispersão das NP alterando os resultados [116]. Este pode ser causado pela luz ambiente ou por resíduos da preparação das soluções.

Com o propósito de confirmar a formação de estruturas em multicamada núcleo-concha algumas amostras foram enviadas para a Faculdade de Química, Engenharia Química e Biotecnologia, Donghua University, Shanghai, República Popular da China, onde se procederam a análises de *TEM* e de *EDX* que permitiram igualmente analisar a sua composição.

2.5 - Ensaio de citotoxicidade

Para ter uma compreensão básica do modo de interação entre a superfície das nanopartículas e as células, determinou-se a capacidade de sobrevivência das células expostas a duas concentrações de nanopartículas. Os protocolos elaborados estão no anexo II.

2.5.1 - Cultura de células

Foram utilizadas células da linha celular fibroblástica NIH 3T3. Começou por proceder-se ao descongelamento das células criopreservadas. Depois de centrifugadas à temperatura ambiente (8 min. a 2000rpm) as células foram distribuídas em caixas de Petri com 10mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) enriquecido com 1% de uma solução de antibiótico e antimicótico (AA) e 10% de soro bovino fetal (SBF). As células foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h, tendo a adesão e o crescimento celular sido verificados pela observação no microscópio invertido, procedeu-se à tripsinização. Para isso removeu-se o meio, lavou-se a cultura com uma solução tampão salina (*phosphate buffered*

saline solution, PBS) e adicionaram-se 2 mL de tripsina. As caixas de Petri foram colocadas na estufa por 10 min. Desagregou-se e homogeneizou-se a suspensão e procedeu-se à contagem das células com uma câmara de Neubauer. A contagem permitiu a obtenção de suspensões de células a concentrações de $3,75 \times 10^5$ células/mL de DMEM, para a realização do teste de citotoxicidade.

2.5.2 - Teste de citotoxicidade

Para a realização do teste do MTT (um sal de tetrazólio), 100µL de células fibroblástica numa concentração de $3,75 \times 10^5$ células/mL em DMEM contendo 1% AA e 10% de SBF, foram depositadas em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 150µL de meio fresco e 50 µL de diluições em PBS de 1mM e 0,1mM de cada amostra. Para referência, foram preparados poços apenas com meio (200 µL) e poços com 150µL de meio e 50µL PBS. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Após 3 dias, passadas cerca de 70h removeu-se o meio e adicionou-se 100 µL de MTT a uma concentração de 5mg/mL. As placas foram incubadas por 3 h a 37°C para a redução do MTT. Posteriormente, através da adição de 100 µL de uma solução de DMSO solubilizaram-se os cristais resultantes da redução do MTT. Observou-se a conversão do MTT (amarelo) num produto púrpura nas duas placas. Finalmente realizou-se a análise espectrofotométrica, usou-se o DMSO como branco e mediu-se a absorvância a 550nm. A quantidade de produto de redução do MTT presente (doseado por medição da intensidade de radiação emitida a 550nm) é proporcional ao número de células viáveis.

As nanopartículas utilizadas nos testes de citotoxicidade foram selecionadas tendo por base a análise por TEM efetuada anteriormente. A amostra FeO_x/Au foi escolhida por apresentar a cor bordeaux, indicativa da deposição de Au sobre o óxido de ferro e a amostra de Fe₃O₄ foi utilizada para comparação de resultados.

As características apresentadas pelas soluções coloidais, antes da sua utilização nas células, estão reunidas na Tabela 5.

Tabela 5 – Composições monometálicas e núcleo-concha testadas durante o estudo de citotoxicidade

Características		Amostras			
		CM-02-11- Fe ₃ O ₄ /Au	CM-01-47- Au	CM-01-73- Ag	CM-01-81- Ag/Au
Cor		Bordeaux	Roxo/lilás	Amarelo	Bordeaux
UV-Vis	λ do pico máximo (nm)	534	540	395	531
	Abs.	1,37	0,99	1,40	1,39
DLS	Diâmetro médio (nm)	10	50	2	80
	Potencial zeta (mV)	-37,4±9,3	-26,9±18,5	-34,5±13,9	-22,8±19,1

Apresenta-se seguidamente uma possível forma de cálculo do valor da concentração dos coloides. Este cálculo é baseado na proposta de RL Johnston¹ e corresponde a uma estimativa. O raio é apurado através da análise de DLS ou TEM e o valor do raio atómico corresponde ao medido empiricamente.²

Assume-se que para NP esféricas (clusters metálicos)

$$V_{\text{cluster}} = N V_{\text{átomo}}$$

Em que N é o n.º átomos do cluster ou o n.º átomos por NP.

$$N = \left(\frac{r_{\text{cluster}}}{r_{\text{átomo}}} \right)^3$$

O n.º de NP formadas por x moles de metal (quando 1dm³ é reduzido) é N_{NP}

$$N_{\text{NP}} = \frac{N \text{ átomos}}{N} = \frac{\text{moles metal} \times N_A}{N}$$

Assim, a concentração (mol/dm³) final do coloide é estimada dividindo o N_{NP} pelo volume total

$$C_{\text{NP}} = \frac{N_{\text{NP}}}{V_{\text{total}}}$$

¹ [Johnston RL. Atomic and Molecular Clusters. Francis Ta, Ed. 2002]

² [Slater JC. J. Chem. Phys. 1964; 41:3199]

Capítulo 3 - Resultados e discussão

No anexo III apresenta-se uma tabela-resumo das características de todas as NP preparadas.

3.1 - Nanopartículas de Au

3.1.1 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com $\beta\text{-D-glucose}$

Nesta experiência, o ácido cloroaúrico tri-hidratado é o precursor para a formação de nanopartículas de ouro e a $\beta\text{-D-glucose}$ atua como agente redutor e estabilizador. À temperatura ambiente e em condições básicas, conseguidas através do ajuste do pH com hidróxido de sódio, a $\beta\text{-D-glucose}$ reduziu os iões de Au^{3+} para Au^0 .

Na Tabela 6 apresentam-se os resultados da variação do pH e da cor das soluções em função da quantidade de NaOH (0,05M) adicionado.

pH	N.º de gotas de NaOH adicionadas	Cor observada
3,5	Após agitação	Incolor
3,6	5	Amarelo pálido
3,9	11	Rosa
5,0	15	Arroxeadada
6,3	23	Roxo escuro

No decorrer da adição do NaOH estudou-se a dinâmica da reação de formação de NP de Au através da espectroscopia do UV-Vis. Na Figura 14 apresentam-se os resultados obtidos.

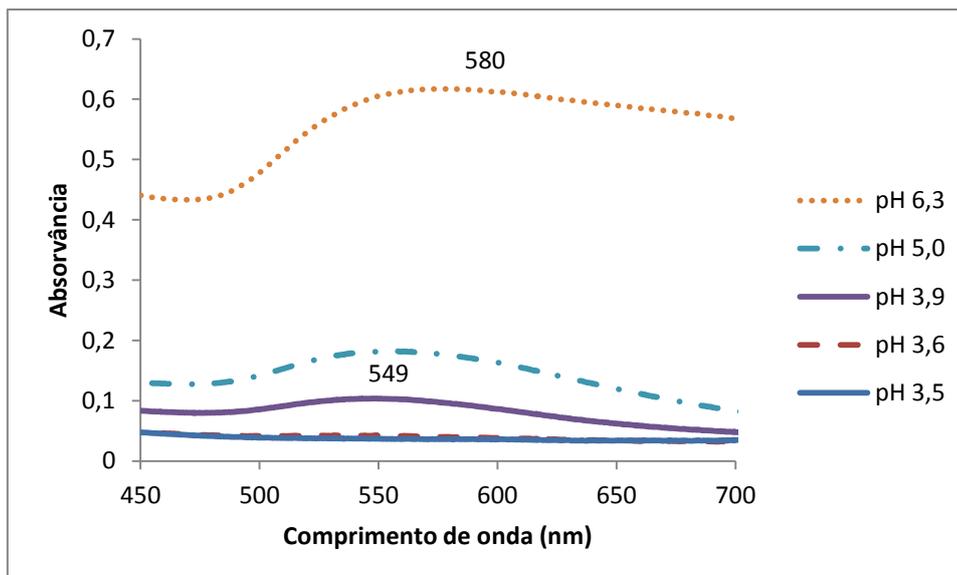


Figura 14 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Au. Evolução da banda de absorção com o pH.

A intensidade do máximo de absorvância aumenta com o aumento do valor de pH. Com o aumento do pH verifica-se igualmente um ligeiro desvio do máximo de absorvância para a zona do vermelho de 549 nm a pH=3,9 para 580 nm com pH=6,3. Este facto deverá estar relacionado com o aumento do tamanho das NP de Au formadas, confirmado por estudos DLS.

Em relação à distribuição de tamanhos das NP de Au obteve-se um diâmetro hidrodinâmico médio de 101nm num primeiro ensaio e de 77nm na repetição do procedimento. A diferença encontrada prende-se com a otimização da prática experimental, nomeadamente a adição rigorosamente controlada do NaOH. Os valores obtidos são muito superiores ao valor reportado no artigo de referência em que o diâmetro médio é de cerca de 8nm. Associa-se esta diferença à utilização de diferentes técnicas de medição. Tal como reportado por Mahl *et al.* [98] a técnica de *DLS* permite determinar a distribuição de tamanhos das NP dispersas, fundamentando-se no seu movimento Browniano, mas uma vez que o poder de dispersão das NP aumenta com o aumento do tamanho (ver Anexo I), poucas NP de grande dimensão poderão esconder um grande número de pequenas NP. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 15.

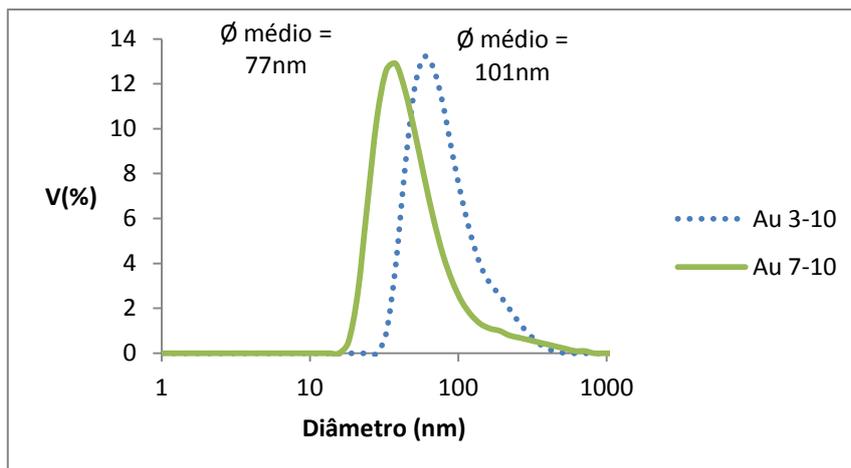


Figura 15 – Distribuição de tamanhos das NP de Au, obtida por DLS.

Em busca de ouro coloidal vermelho pesquisou-se uma nova metodologia para a síntese.

3.1.2 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com β -D- glucose na presença de amido

Apesar de no artigo da referência [100] ser dito que a solução permanece incolor por 30 minutos, verificou-se uma mudança imediata de cor após a adição do hidróxido de sódio, tendo a solução adquirido a cor bordeaux característica.

Uma vez que o agente estabilizante desempenha um papel crucial no controlo da nucleação e crescimento das nanopartículas de metais nobres [117], neste procedimento utilizou-se o amido para a estabilização das nanopartículas [118]. Este procedimento foi repetido diversas vezes pelo que se apresentam os resultados mais à frente (3.4).

3.1.3 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com β -ciclodextrina

Trata-se de um procedimento simples que permite a síntese de nanopartículas de ouro relativamente monodispersas com um diâmetro médio de cerca de 14nm. A β -ciclodextrina reduz eficazmente o ouro e, em cerca de 10 minutos, observou-se a mudança da cor da solução, indicativa da formação de nanopartículas (cor-de-rosa). Os gráficos elaborados apresentam-se à frente (3.5.2) para a comparação das características obtidas para as NP monometálicas e bimetálicas.

3.2 - Nanopartículas de Ag

3.2.1 - Redução de AgNO₃ com β-D-glucose através do uso de microondas

A síntese de NP de Ag através do método descrito no 2º Procedimento Experimental (Anexo II) revelou-se improdutivo uma vez que não se mostrou reproduzível pois nem sempre se verificou a alteração de cor da solução após o aquecimento por microondas. Isto significa que provavelmente o aquecimento não foi suficiente para a redução da prata e consequente formação de nanopartículas. Além disso, verificou-se uma grande evaporação de água (cerca de 75%). Este problema experimental levou-nos a uma nova tentativa.

3.2.2 - Redução de AgNO₃ com β-D-glucose num banho termostaticado

Tal como no caso anterior, a síntese de NP de Ag através deste método, descrito no 3º Procedimento Experimental (Anexo II), revelou-se improdutivo. Após 22 horas num banho termostaticado a 60°C as soluções preparadas exibiram uma banda de absorvância reduzida atribuída a uma baixa concentração de nanopartículas. Com estes resultados e os anteriores conclui-se que a β-D-glucose é um agente redutor pouco eficiente.

3.2.3 - Redução de AgNO₃ com NaBH₄

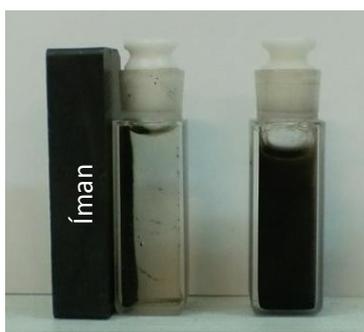
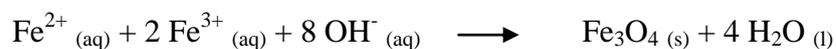
Trata-se de um procedimento simples e rápido que permite a síntese de nanopartículas de Ag relativamente monodispersas com um diâmetro médio de cerca de 12nm como se verá adiante. O borohidreto de sódio é um dos agentes redutores mais utilizado e é muito eficiente [13]. A estabilização das NP coloidais é conseguida por forças eletrostáticas repulsivas conferidas pela adsorção de borohidreto de sódio [89, 93].

3.2.4 - Redução de AgNO₃ com β-ciclodextrina

O procedimento é simples e permite a preparação de NP de Ag relativamente monodispersas com cerca de 16nm de diâmetro como se verá adiante. Após 10 minutos de aquecimento a solução apresentava a coloração amarela típica dos coloides de prata.

3.3 - Nanopartículas de Fe₃O₄

O método de síntese utilizado foi o da co-precipitação de Fe²⁺ / Fe³⁺. As soluções obtidas são de cor preta e tal como esperado apresentam um comportamento magnético na presença de um íman (Figura 16).



(a) (b)

Figura 16 - Nanopartículas de Fe₃O₄ (a) sob a influência de um íman e (b) dispersas em água.

De acordo com a termodinâmica da reação (equação anterior) espera-se a precipitação completa da magnetite para valores de pH entre 9 e 14. Na figura seguinte é possível ver o mecanismo de reação de formação de partículas de magnetite a partir de uma mistura aquosa de cloreto ferroso e férrico por adição de uma base em condições de ausência de oxigénio (borbulhando azoto).

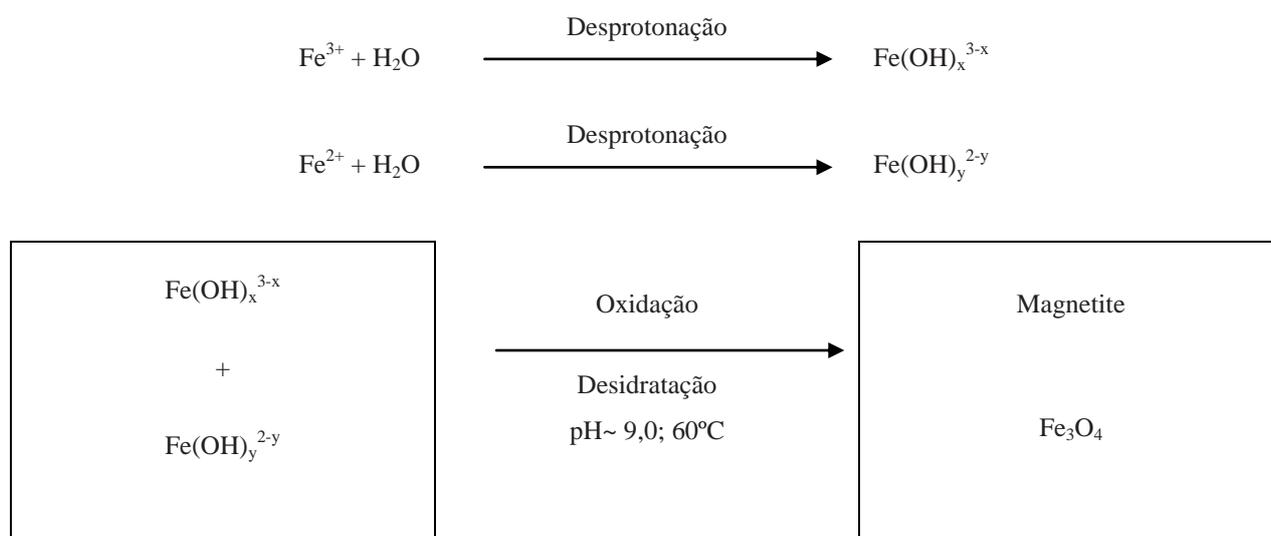
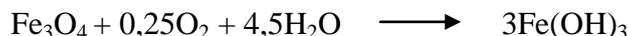


Figura 17 – Mecanismo de reação de formação de partículas de magnetite a partir de uma mistura aquosa de cloreto ferroso e férrico por adição de uma base [57].

As propriedades físico-químicas das NP magnéticas podem ser afetadas caso o ferro sofra oxidação conforme se mostra pela equação seguinte [57]



Uma das formas de minimizar este problema é através da purga da solução com azoto.

Existem duas formas distintas de tratar o precipitado obtido: em meio básico no qual se utilizou o NaOH para a precipitação da magnetite, por troca de Na^+ por catiões de NH_4^+ adsorvidos à superfície das NP sintetizadas e em meio ácido no qual a ação dos aniões ClO_4^- é predominante [103].

Apresentam-se adiante (3.5.3) os resultados obtidos após o revestimento com ouro, para comparação de resultados.

3.4 - Ligas de nanopartículas de Ag e Au

Apesar da redução sucessiva de iões de dois metais diferentes ser considerada uma das metodologias mais indicada para a produção de nanoestruturas com uma morfologia núcleo-concha é possível obter este tipo de nanopartículas através da co-redução/redução simultânea dos iões precursores [84]. O método seguido foi o da co-redução de uma mistura de iões de ouro e prata (2.3.3) e os resultados obtidos deixam-nos com algumas dúvidas. Imediatamente após a adição de hidróxido de sódio, sob uma suave agitação, as cores das misturas reacionais mudaram, acompanhadas pela emergência de espectros de absorção de NP Ag/Au distintos. Na Figura 18 mostra-se o aspeto das soluções coloidais preparadas imediatamente após a síntese bem como o respetivo espectro de absorção UV-Vis.

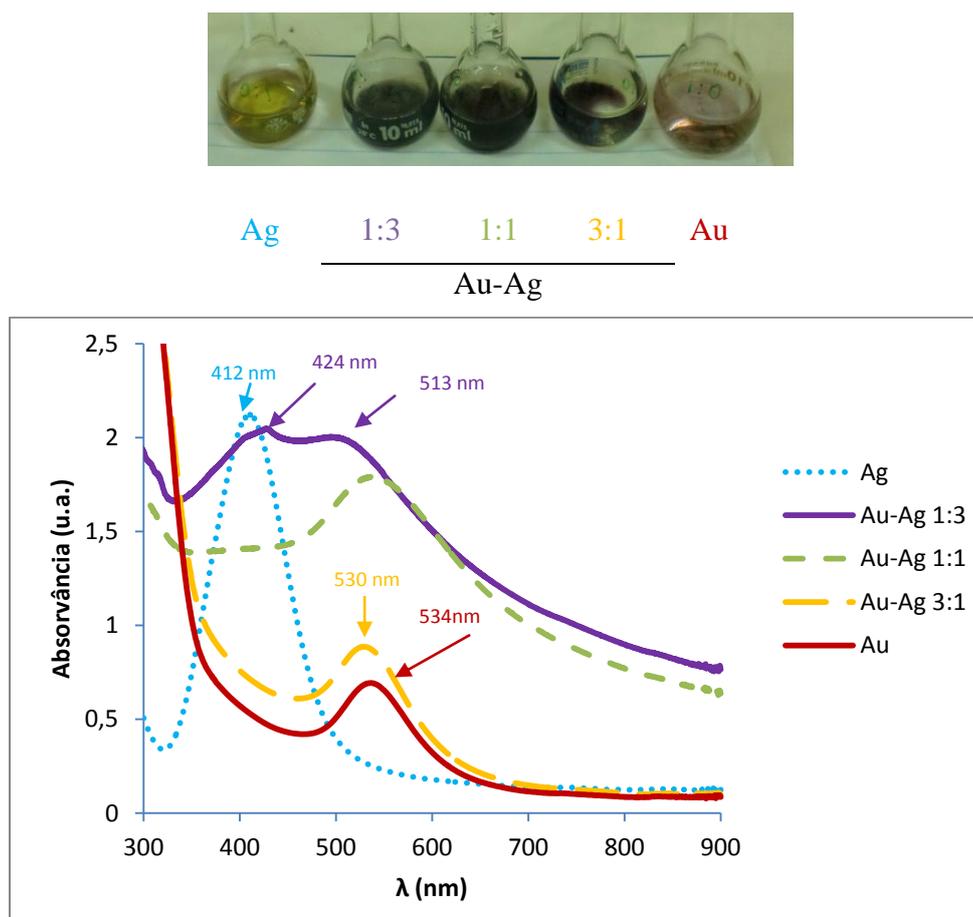


Figura 18 – Fotografia das NP de Au-Ag e respetivo espetro de absorção UV-Vis.

O máximo de absorvância característico da prata surge a 412nm e o do ouro a 534nm. A amostra Au-Ag 1:3 exibe dois máximos, a 424nm e 513nm, atribuídos à formação de uma estrutura bimetalica, uma liga de prata e ouro ou uma núcleo-concha [119]. Existe alguma contradição entre os artigos referenciados [23, 100, 119] no que respeita a formação de estruturas núcleo-concha e à existência de um ou dois picos no espetro de absorção de UV-Vis. De acordo com Raveendran *et al.* o surgimento de um único pico é atribuído à formação de NP ligadas homogéneas. Já Shore *et al.* [23] reportam a existência de uma estrutura núcleo-concha na presença de apenas um pico de absorvância.

Os valores da distribuição de tamanhos foram determinados por *DLS* e estão resumidos na Figura 19. A menor dimensão da prata poderá estar relacionada com a sua menor capacidade autocatalítica (Tabela 3 - Potencial de redução dos metais em estudo).

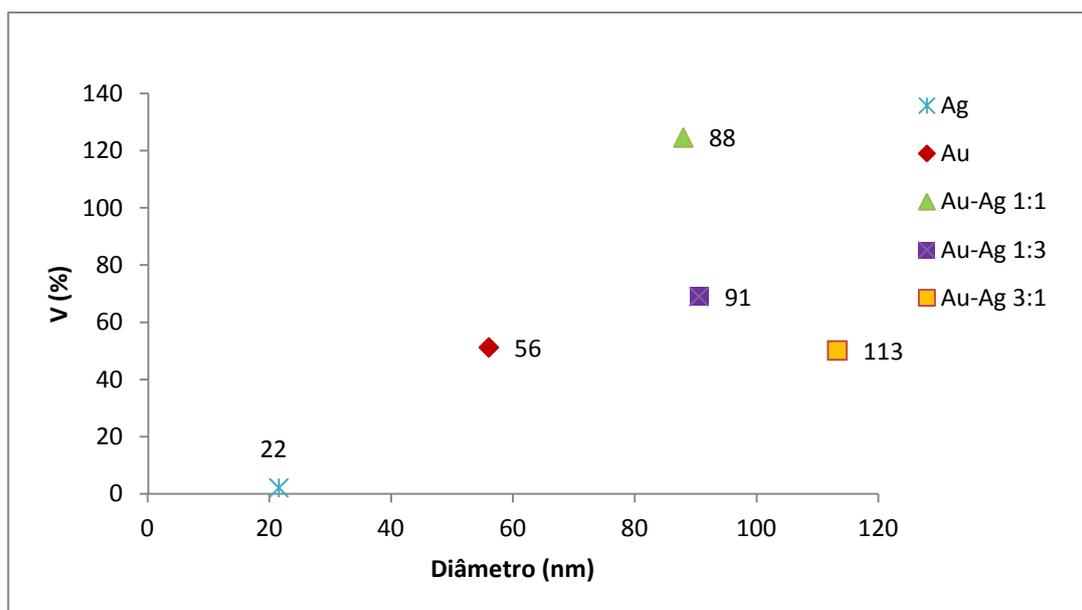


Figura 19 – Distribuição de tamanhos das NP preparadas por co-redução dos dois sais metálicos, obtida por DLS.

A formação de nanopartículas bimetálicas de prata e ouro foi confirmada através da análise *EDX* (Figura 20). Os espectros obtidos permitem confirmar a presença dos dois metais à superfície da amostra Au-Ag 1:3, o que consiste numa evidência da interdifusão dos dois metais [120] levando-nos a concluir que se preparou uma liga de NP de Au e Ag.

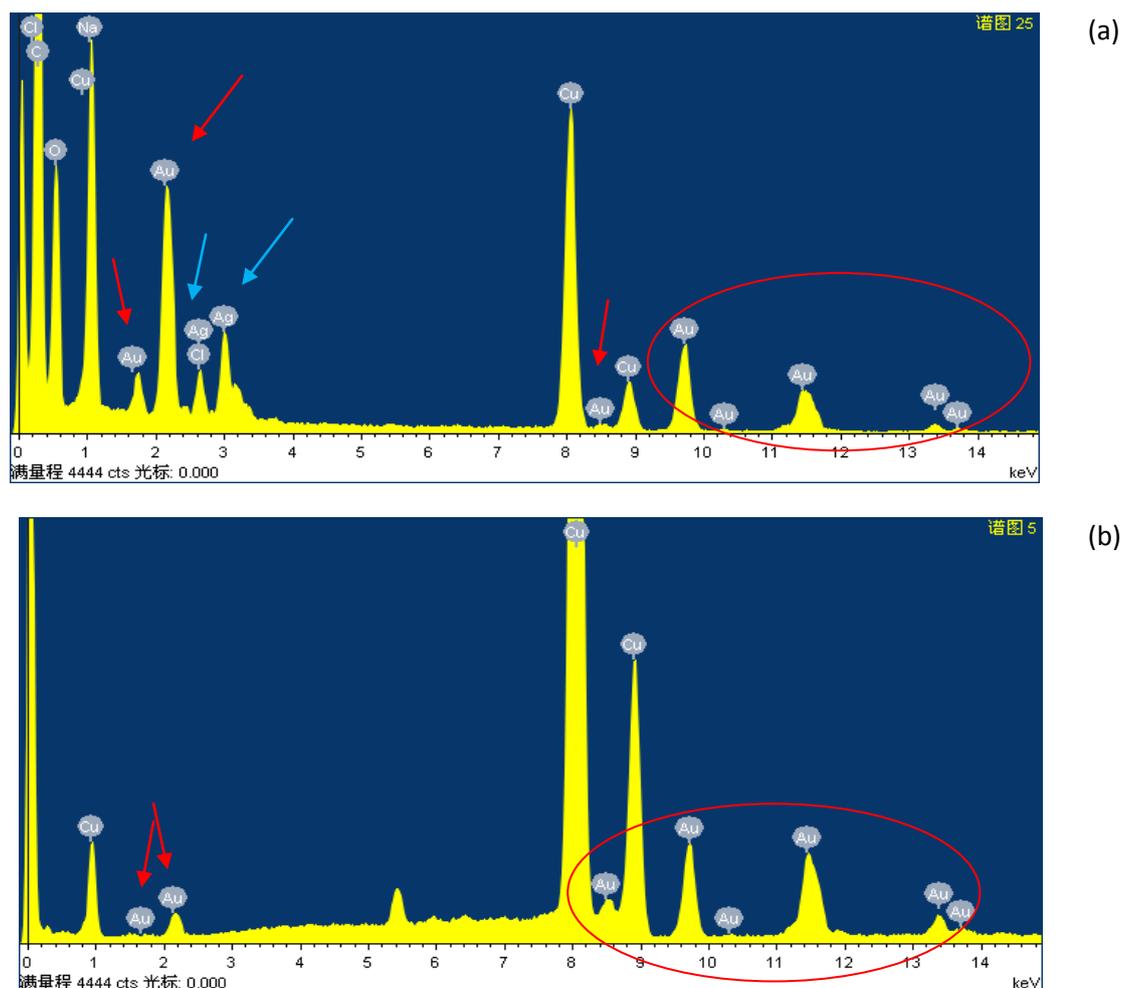


Figura 20 - Espetros de EDX das amostras (a) Au-Ag 1:3 e (b) Au-Ag 1:1.

Na amostra Au-Ag 1:1 apenas existem os picos do Au. A ausência da Ag no espectro de EDX associada à existência de um único máximo de absorção de UV-Vis poderão ser indicativos da formação de uma estrutura em multicamada núcleo-concha Ag/Au [91].

A nanoestrutura das nanopartículas foi analisada por TEM. Investigou-se a forma e o tamanho. As micrografias eletrônicas na Figura 21 mostram a formação de NP de Ag e Au relativamente mono dispersas e esféricas com um diâmetro médio de cerca de 12nm. O envelhecimento da liga de Au e Ag resultou na formação de aglomerados de nanopartículas esféricas polidispersas com o tamanho máximo de cerca de 50nm. Mais uma vez os resultados de DLS são superiores aos observados por TEM (ver 3.1.1).

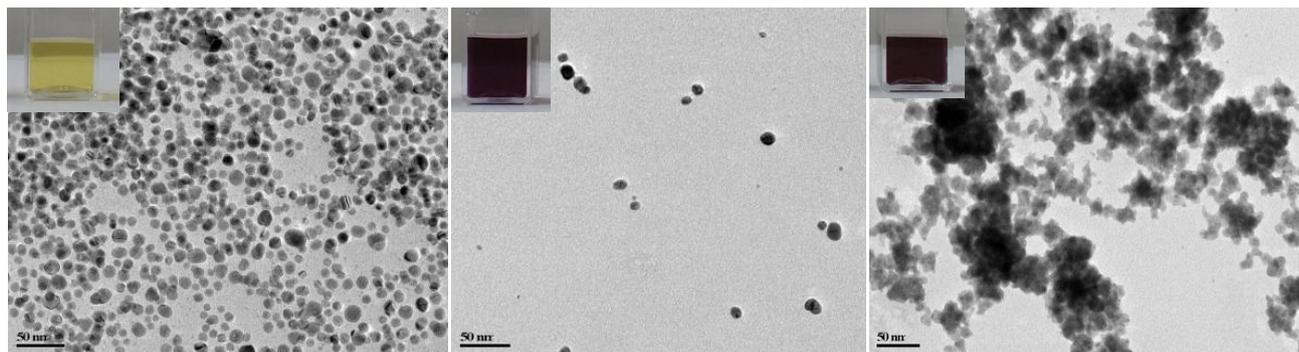


Figura 21 – Fotografias e imagens TEM das amostras de Ag, Au e Au-Ag 1:3.

Os resultados não são conclusivos pois o contraste entre o núcleo e a concha não é evidente. Tal como esperado, o valor do diâmetro hidrodinâmico estimado através da análise das micrografias eletrônicas é inferior ao obtido através da DLS.

3.5 - Nanopartículas em multicamada núcleo-concha

3.5.1 - Redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sobre NP de Ag

As nanopartículas foram preparadas pela redução sucessiva dos sais de Ag e Au de acordo com a metodologia descrita em 2.3.4.1. A caracterização por espectroscopia do UV-Vis das NP núcleo-concha mostra um desvio do máximo de absorvância para maiores comprimentos de onda [13].

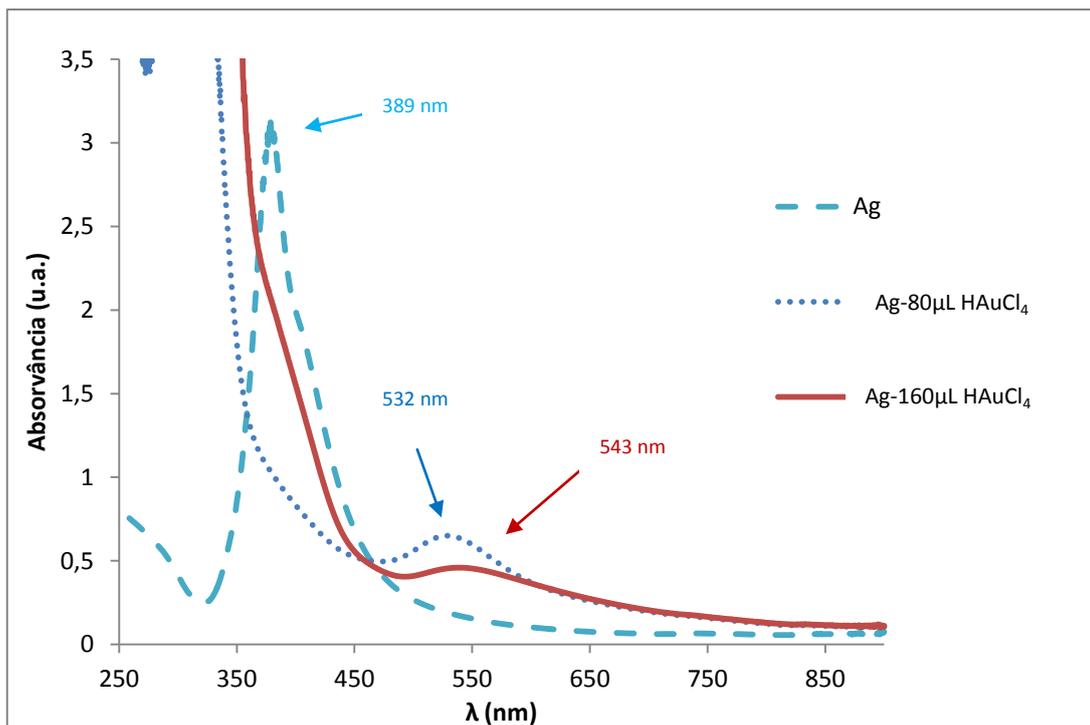


Figura 22 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Ag-Au obtidas pela redução sucessiva de ouro sobre prata coloidal.

Através da análise do UV-Vis (Figura 22) é possível constatar um desvio para a zona do vermelho do espectro, de 389nm para a Ag para 532nm na amostra Ag-Au 1 e 543nm na amostra Ag-Au 2, atribuída ao crescimento das NP por deposição sucessiva de Au (aumento da espessura da concha de Au). Este desvio para o vermelho do espectro pode no entanto ser interpretado como significando que as NP têm uma forma menos arredondada [116]. Na Figura 23 apresenta-se a distribuição de tamanhos obtida.

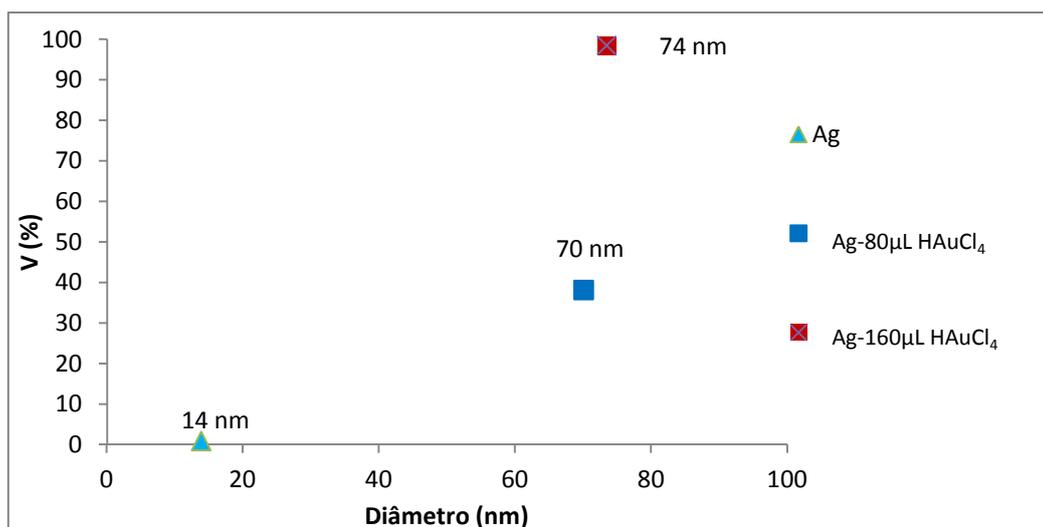


Figura 23 – Distribuição de tamanhos das NP de Ag-Au, obtida por DLS.

O aumento de diâmetro verificado após a adição do precursor de Au e do aumento da sua concentração são indicativos da redução de Au sobre as NP de Ag. Os resultados TEM e EDX estão na figura seguinte.

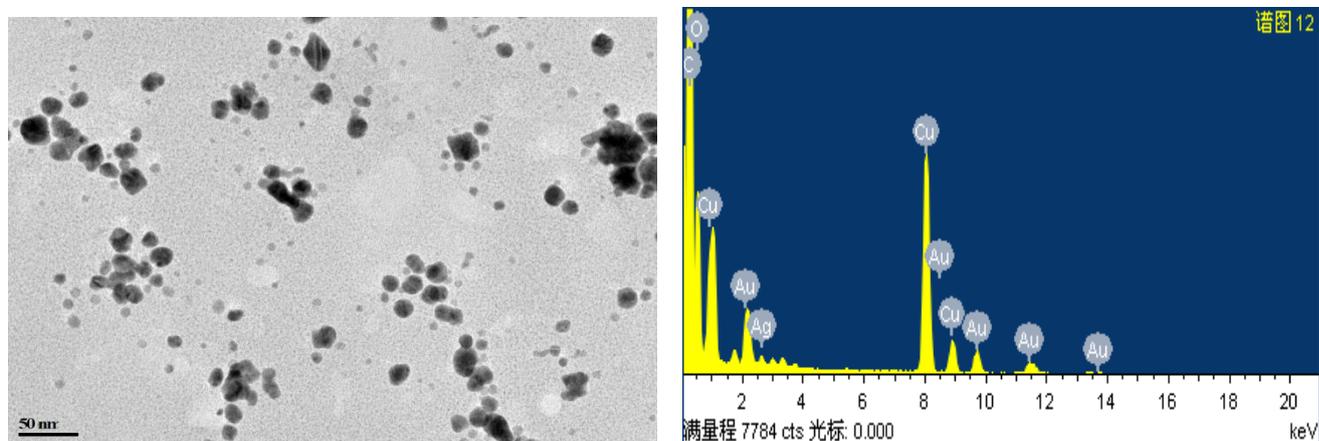


Figura 24 – Micrografia TEM e espectro EDX da amostra CM-01-81 Ag/Au.

Os resultados de TEM evidenciam NP esféricas com cerca de 20nm com uma estrutura núcleo-concha. O espectro EDX vem confirmar uma presença maioritária de ouro (4 vezes superior) em relação à prata o que vem confirmar que as nanopartículas de prata foram revestidas com ouro.

3.5.2 - Redução de AgNO_3 sobre NP de Au e $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sobre NP de Ag com β -ciclodextrina

Na busca de um resultado claro que não deixasse dúvidas quanto ao sucesso na obtenção de uma estrutura em multicamada núcleo-concha, testou-se a β -ciclodextrina, um homólogo da β -D glucose, como agente redutor e estabilizador das NP de acordo com o artigo reportado por Pande *et al.* [84]. Os resultados experimentais das alterações físico-químicas, cor, tamanho das partículas e máximo ótico da superfície plasmônica, permitiram confirmar a formação da nanoestrutura núcleo-concha. A síntese de nanopartículas de prata foi confirmada pela coloração amarela da dispersão coloidal e a de ouro pela cor rosa adquirida pela mistura reacional. Em relação aos máximos de absorção da prata e do ouro são os esperados, 410nm para a prata e 530nm para o ouro (Figura 25). Após a redução do ouro sobre as NP de prata verificou-se um deslocamento do máximo de absorção de 410nm para 530nm tendo a solução adquirido uma cor lilás acinzentado e para o sistema Au-Ag registou-se um desvio para o azul no espectro UV-Vis tendo a solução adquirido a cor laranja.

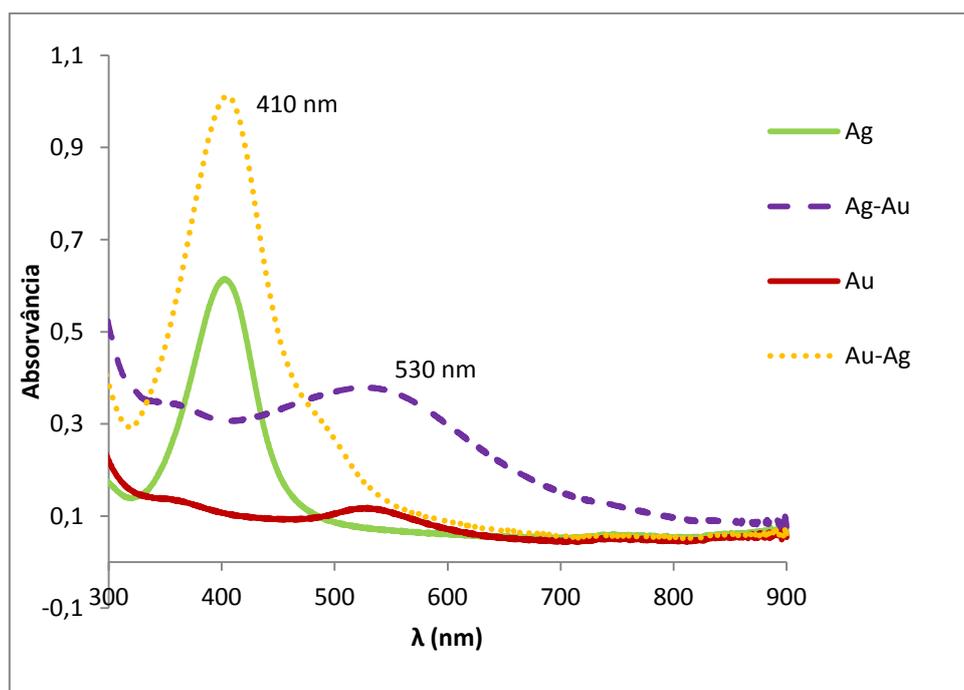


Figura 25 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Ag, Ag-Au, Au e Au-Ag preparadas usando a β -ciclodextrina como agente redutor.

Depois do revestimento das NP monometálicas de prata e ouro verificou-se um aumento de diâmetro (Figura 26) que mais uma vez nos ajuda a concluir que se conseguiu a formação da estrutura núcleo-concha. No gráfico Ag-Au refere-se às nanopartículas núcleo-concha obtidas através da adição de 40 μ L de ácido cloroaúrico tri-hidratado a 5mL da solução de prata coloidal

e Au-Ag refere-se à estrutura obtida pela adição de 40 μ L de nitrato de prata a 5mL de ouro coloidal.

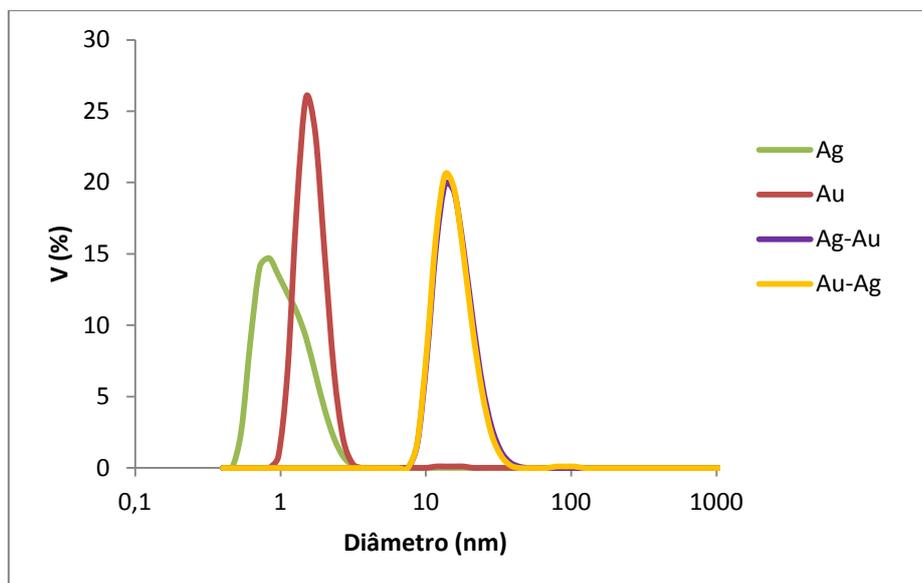


Figura 26 – Distribuição de tamanhos, obtida por DLS, das NP de Ag, Ag-Au, Au e Au-Ag preparadas usando a β -ciclodextrina como agente redutor.

Uma amostra de Au-Ag foi enviada para TEM para a confirmação da suspeita da obtenção da estrutura núcleo-concha. Os resultados obtidos deixam no entanto algumas dúvidas. Na Figura 27 pode ser visualizado o aspecto das NP Au/Ag e o respectivo espectro de EDX.

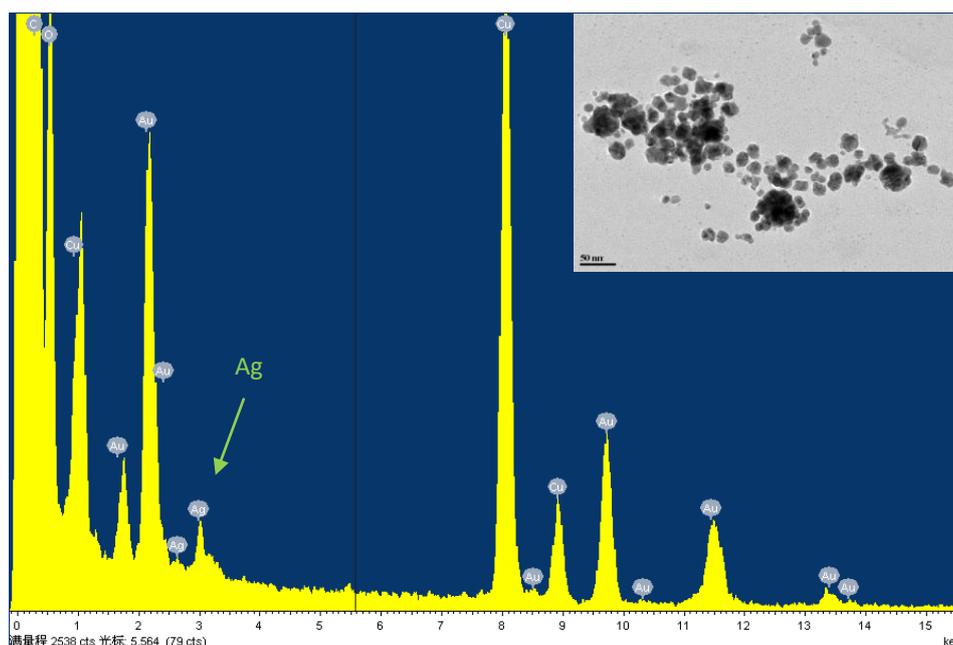


Figura 27 - Micrografia TEM e espectro EDX da amostra Au-Ag.

A imagem TEM permite confirmar a formação de NP esféricas de diâmetro médio igual ou inferior a 20nm e também a presença de alguns aglomerados com cerca de 50nm. Relativamente ao espectro de EDX, a presença dos dois metais e a abundância de ouro apontam para uma nucleação independente dos dois metais ou para uma estrutura núcleo-concha na qual se esperaria encontrar uma quantidade superior de prata à superfície. De facto o espectro de UV-Vis apresenta um perfil de absorção bem definido com um máximo a 410nm, característico das nanopartículas de prata. No espaço de tempo entre a síntese e a análise por TEM e EDX houve seguramente uma alteração na estabilidade da solução coloidal.

3.5.3 - Nanopartículas de Fe₃O₄-Au

As NP de magnetite sintetizadas sob condições alcalinas (2.3.5.1 e 3.3.1) foram utilizadas como sementes para a redução do precursor de ouro de forma a produzir NP Fe₃O₄-Au. Isto foi conseguido através da redução do Au³⁺ pelo citrato. Após a síntese, a solução de magnetite passou da cor preta a castanho avermelhado. Contudo, este facto não é por si só indicativo do revestimento da magnetite com ouro uma vez que a oxidação da magnetite conduziria à mesma coloração [121]. Os resultados experimentais mostram o aparecimento de um máximo de absorção característico da ressonância da superfície plasmónica do ouro a 590nm, ligeiramente deslocado para a gama dos vermelhos, não observável no espectro de absorção UV-Vis das NP de Fe₃O₄, o que sugere a obtenção da estrutura núcleo-concha (Figura 28).

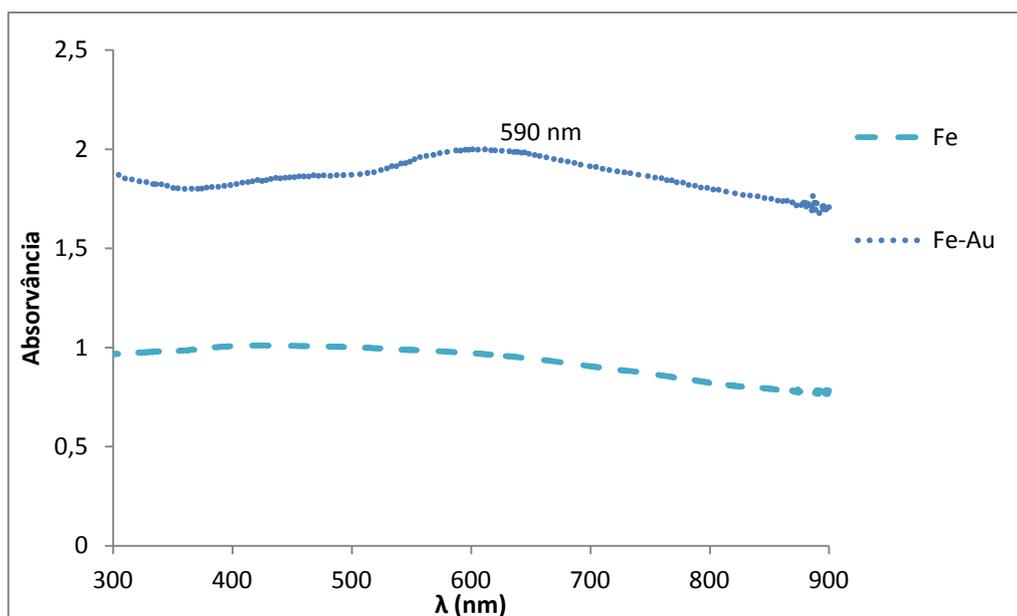


Figura 28 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$.

Os resultados de EDX não confirmam claramente a formação da estrutura núcleo-concha (Figura 29). Tem-se por um lado um espectro em que apenas existe ouro, o que seria à partida indicativo de uma estrutura núcleo-concha, mas tem-se outro espectro da mesma amostra no qual estão presentes ferro e ouro. A presença dos dois metais evidencia um revestimento descontínuo dos núcleos de magnetite ou mesmo uma nucleação independente de ouro. De acordo com *Lyon et al.* [60] se no espectro de EDX estão presentes os dois metais então a estrutura não é núcleo-concha no entanto *Lo et al.* [92] determinam a composição da estrutura núcleo-concha na presença dos dois metais no espectro.

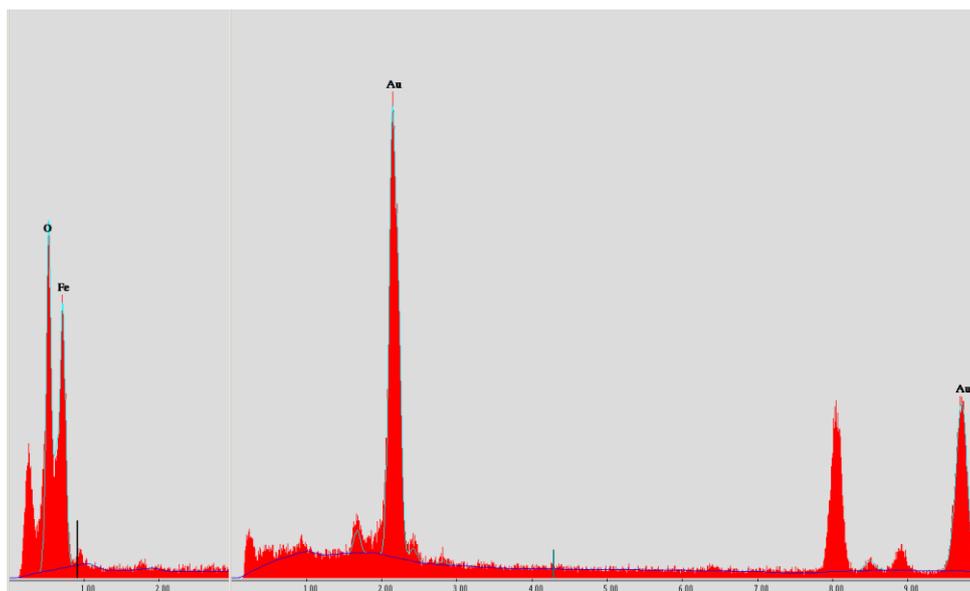


Figura 29 – Espectro de EDX das NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$.

Por outro lado, a presença de um só metal poderá ser indicativa de uma nucleação independente.

As imagens de TEM também nos deixam algumas dúvidas (Figura 30). Temos por um lado a micrografia (a) em que se tem uma estrutura núcleo-concha aparente e as imagens (b) e (c) nas quais não é óbvio se os dois metais estão juntos ou se houve uma nucleação independente.

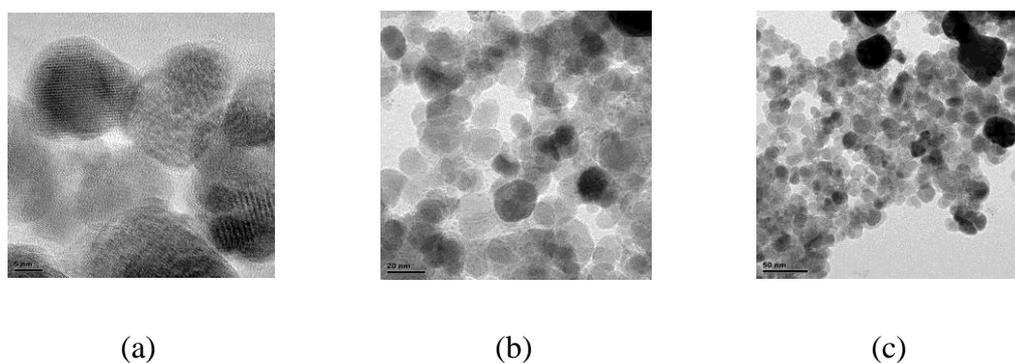


Figura 30 – Imagens TEM das NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$.

De qualquer forma, verifica-se a existência de NP esféricas diferentes. Segundo Banerjee *et al.* [95] as partículas que aparecem com menor contraste são de Fe_3O_4 enquanto as NP que apresentam maior contraste (negras) são de Au.

Em relação às NP obtidas através da redução do precursor de ouro sobre magnetite preparada em condições ácidas (2.3.5.2 e 3.3.2), a suspeita da formação da estrutura núcleo-concha ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$) acontece imediatamente após a síntese, através da alteração da cor da solução de magnetite que passou de preto a *bordeaux*, tal como refere Lu *et al.* [92]. A imagem da Figura 31 evidencia a diferença de cor entre as NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ preparadas via básica, e via-ácida.



(a) (b)

Figura 31 – Imagem das NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ preparadas (a) sob condições ácidas e (b) em meio básico.

No espectro de UV-Vis (Figura 32) verifica-se a existência de um pico máximo a 534nm o que comparativamente às NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ cuja magnetite foi preparada em condições básicas, representa um desvio para menores comprimentos de onda, o que é característico do ouro e poderá dever-se à sua mais eficiente síntese nestas condições.

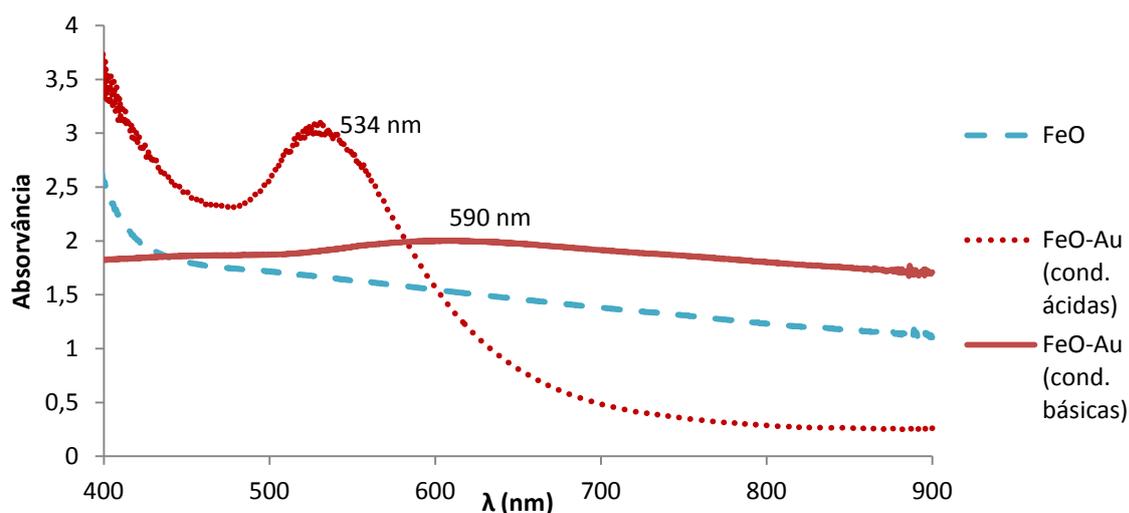


Figura 32 – Espectro de absorção UV-Vis das NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$.

Os resultados das medições de DLS para a magnetite e das primeiras NP de Fe_3O_4 -Au sintetizadas (3.3.5.1) indicam aglomerados com cerca de um micron de diâmetro. Este facto está diretamente relacionado com o magnetismo microscópico observado. Na figura seguinte apresenta-se a distribuição de tamanhos das NP de magnetite, sintetizada em condições ácidas, revestida com ouro com um pico estreito indicativo da presença de NP.

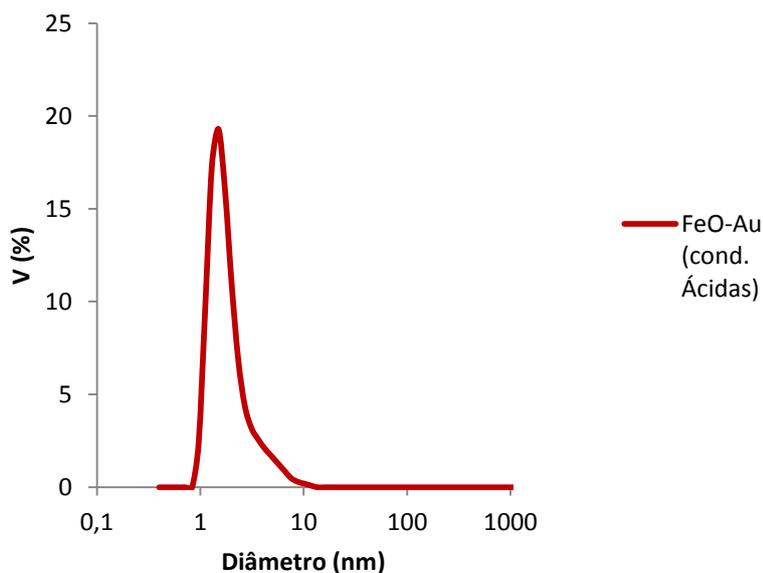


Figura 33 – Distribuição de tamanhos das NP de Fe_3O_4 -Au, obtida por DLS.

Além dos ensaios realizados, as propriedades magnéticas podem igualmente ser utilizadas para a confirmação da formação da nanoestrutura núcleo-concha. Nomeadamente através de medições e da análise de curvas de magnetização. O aumento da espessura da concha de ouro conduziria, em princípio, a um decréscimo do momento magnético [67, 122].

Para o caso da magnetite preparada sob condições básicas, após o revestimento com ouro continua a ser perceptível o magnetismo das NP precipitadas apesar de se verificar um abrandamento do efeito, atribuído a algum desordenamento dos momentos superficiais devido à interação com o ouro [95].

As NP de Fe_3O_4 -Au em que a amostra de magnetite foi sintetizada em condições ácidas são intrinsecamente não-magnéticas e portanto não têm tendência para agregar em solução. O

diâmetro hidrodinâmico médio é de cerca de 2nm e portanto as NP são superparamagnéticas, deste modo, têm uma elevada área superficial e estão perfeitamente dispersas na solução [96].

O artigo de Lo *et al.* [92], referência para este procedimento, não analisa esta situação pois utiliza as NP de Fe₃O₄-Au protegidas com o citrato para subsequente troca de citrato com homocisteína.

Outra explicação possível é a de que a magnetite tenha sofrido uma transformação de fase e se tenha oxidado a magemite. De acordo com Thanh [56], a oxidação ao ar não é o único processo a ocorrer nestas transformações, O pH do meio pode favorecer a transferência eletrônica entre espécies: em meio básico os cátions Fe³⁺ incorporam-se na estrutura da magnetite depois de iniciada a redução com oxigênio à superfície das nanopartículas, enquanto que em meio ácido, os cátions Fe²⁺ são retirados da superfície originando lacunas de modo a manter o equilíbrio de cargas na rede. A difração de raios-X é o método tradicional que poderia ser utilizado para a caracterização dos diferentes óxidos de ferro.

3.5.4 - Nanopartículas de Fe₃O₄-Ag

O gráfico de Uv-Vis apresentado (Figura 34) permite comparar o efeito do aumento da concentração de prata. Constata-se um desvio para a gama do vermelho e simultaneamente um decréscimo no valor da absorvância com o aumento da concentração de prata. A que se deve este efeito? Estes resultados deixam-nos com algumas dúvidas. O aumento da espessura do revestimento de prata sobre o óxido de ferro afina as propriedades plasmónicas destas NP núcleo-concha, tal como constatado por Xu *et al.* [67] ou estaremos na presença de revestimentos de partículas de óxido de ferro com diferentes diâmetros? Não foi possível repetir o procedimento nem tão pouco testar outro método.

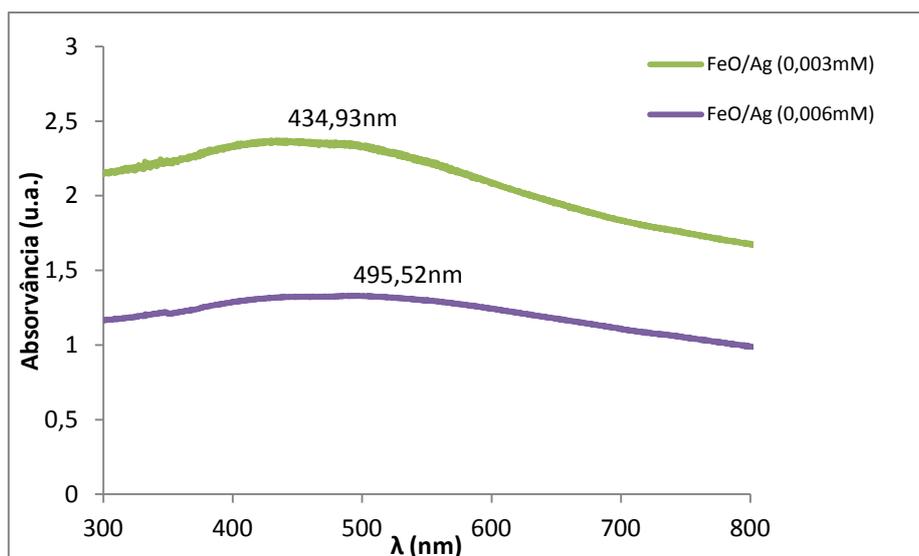


Figura 34 - Espectro de absorção UV-Vis das NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$.

Relativamente ao tamanho, uma vez mais e dadas as propriedades magnéticas destas NP, verifica-se a aglomeração obtendo-se leituras de DLS com cerca de $5\mu\text{m}$.

3.6 - Ensaio de citotoxicidade

Através de técnicas de cultura de células e do teste do MTT avaliou-se a citotoxicidade das NP preparadas anteriormente. Antes de se proceder aos testes e com o objetivo de confirmar a estabilidade dos coloides a utilizar foi feita a sua caracterização. Apresentam-se seguidamente os espectros de UV-Vis obtidos.

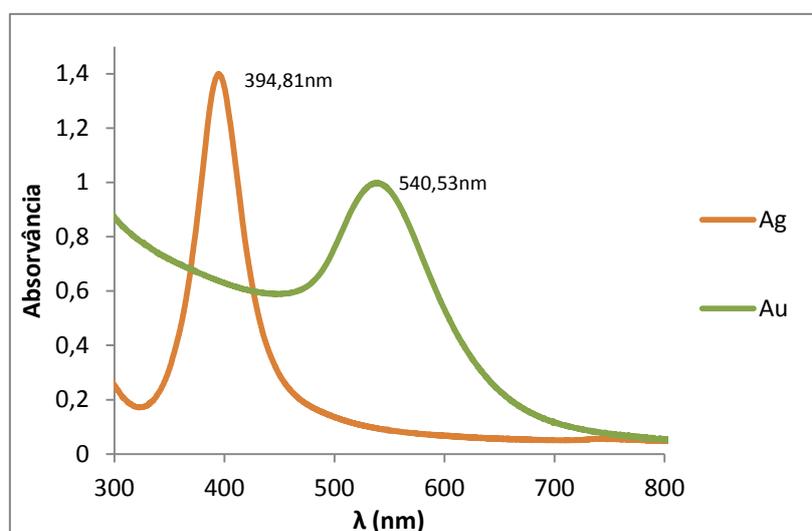


Figura 35 - Espectros de absorção UV-Vis das NP monometálicas usadas nos testes de citotoxicidade.

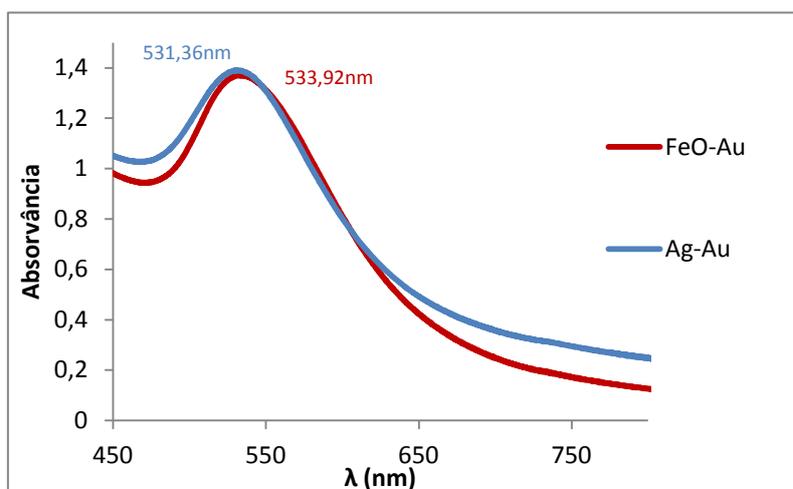


Figura 36 - Espectros de absorção UV-Vis das NP núcleo-concha usadas nos testes de citotoxicidade.

Os espectros de UV-Vis apresentam picos máximos Gaussianos o que indica que as soluções apresentam-se estáveis e com concentrações de nanopartículas adequadas ao estudo, tal como após a síntese.

Na análise de resultados é necessário ter em conta que as culturas celulares são sensíveis não só à presença de uma determinada concentração do agente em análise como também a mudanças no ambiente tais como alterações de temperatura, variações de pH, concentração de nutrientes e de produtos de excreção das células [15]. Além disso, as próprias amostras de NP, na presença dos reagentes necessários aos ensaios nas células, podem sofrer alterações nas propriedades físico-químicas: tamanho, carga superficial e portanto estabilidade [112]. Por outro lado, a interação das nanopartículas com as células pode depender do tipo de célula [105].

Após a exposição às NP durante 70h e antes do teste de redução do MTT, as células foram observadas ao microscópio. Na Figura 37 apresentam-se os resultados obtidos. É possível a visualização de partículas sobre as células e de algumas células mortas (pontos escuros). De uma maneira geral, o n.º de células com a forma típica do fibroblasto é menor que no controlo.

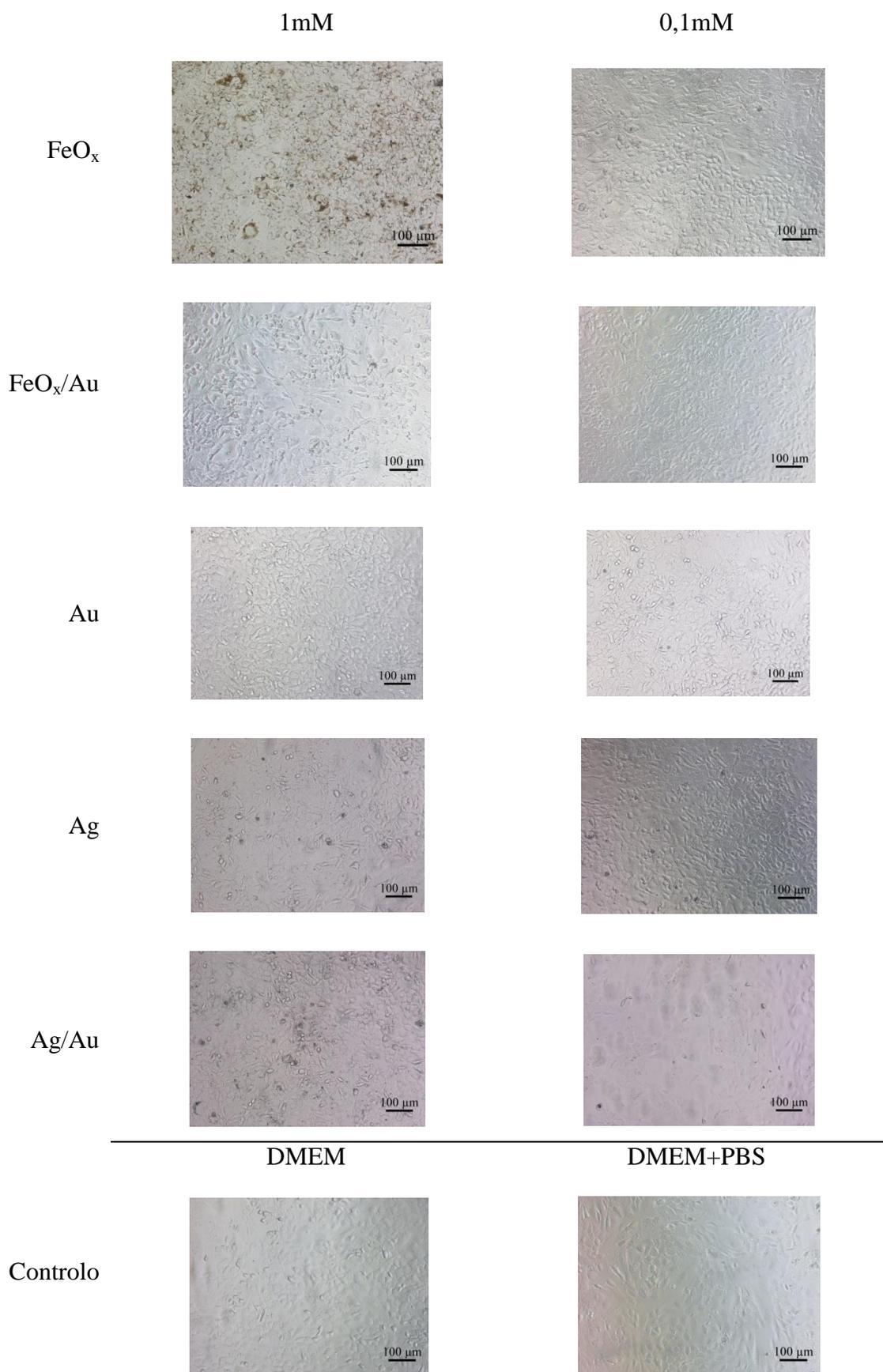


Figura 37 – Fotografias das células após 70h de exposição às diferentes concentrações de NP.

Para facilitar a análise dos resultados da percentagem de viabilidade (Figura 38), utilizaram-se as mesmas cores dos espectros UV-Vis. Para as cinco amostras e nas diferentes concentrações testadas, os resultados são muito próximos, com uma baixa dispersão dos valores dentro da mesma amostra e superiores a 80%, o que significa que, para o tipo celular testado, as amostras apresentam baixa citotoxicidade pelo que são biocompatíveis.

Com exceção das amostras contendo FeO_x , verifica-se, tal como esperado, um decréscimo na % de viabilidade para maiores valores de concentração.

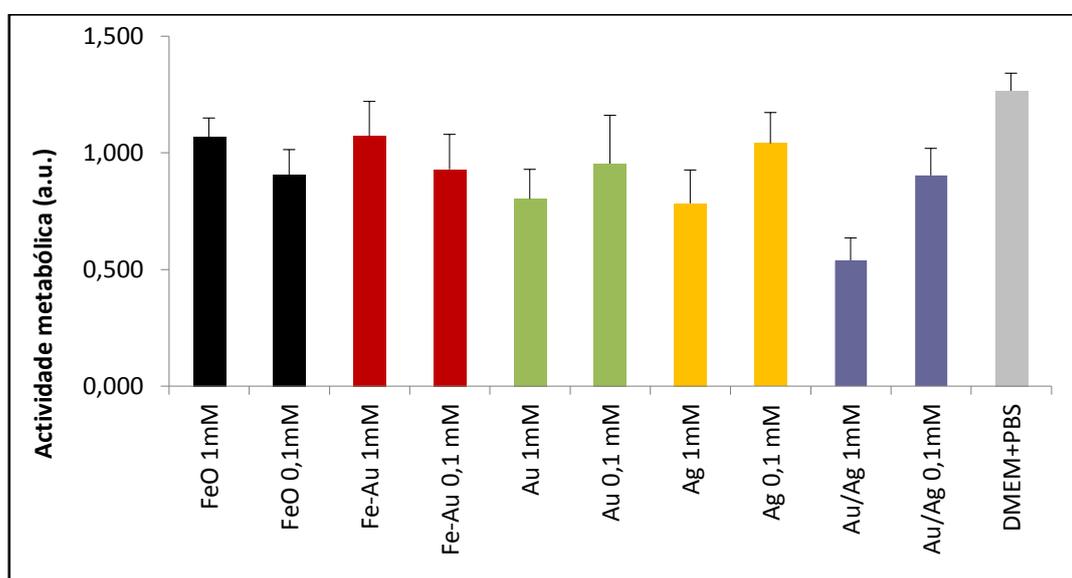


Figura 38 – Percentagem de viabilidade para as quatro amostras de NP testadas.

O teste efetuado representa uma via indireta de medição da viabilidade celular já que nos dá informação acerca da atividade metabólica das células.

Os ensaios realizados não permitem tirar conclusões acerca da localização das nanopartículas. Não é possível, pois, saber em que compartimentos celulares se encontram, por exemplo se chegaram ao núcleo.

Apesar de se terem encontrado baixos valores de toxicidade, com exceção do sistema Au-Ag para 1mM de concentração (em que a citotoxicidade se revelou superior), seria interessante investigar o processo em maior detalhe. Nomeadamente, através da avaliação da contribuição de

eventuais produtos químicos remanescentes da síntese presentes no sobrenadante e independentemente da solução coloidal purificada. Por exemplo, através da centrifugação tal como sugerem Alkilany e Murphy [112]. No seu estudo estes autores discutem os resultados mais recentes no que respeita a citotoxicidade de nanopartículas de ouro e fornecem algumas recomendações experimentais para futuras pesquisas na interface da nanotecnologia com os sistemas biológicos. Os resultados obtidos por estes investigadores (Figura 39) mostram que os níveis de toxicidade encontrados na solução de nanopartículas e no sobrenadante são similares pelo que os autores concluem que as nanopartículas, por si só, não são tóxicas.

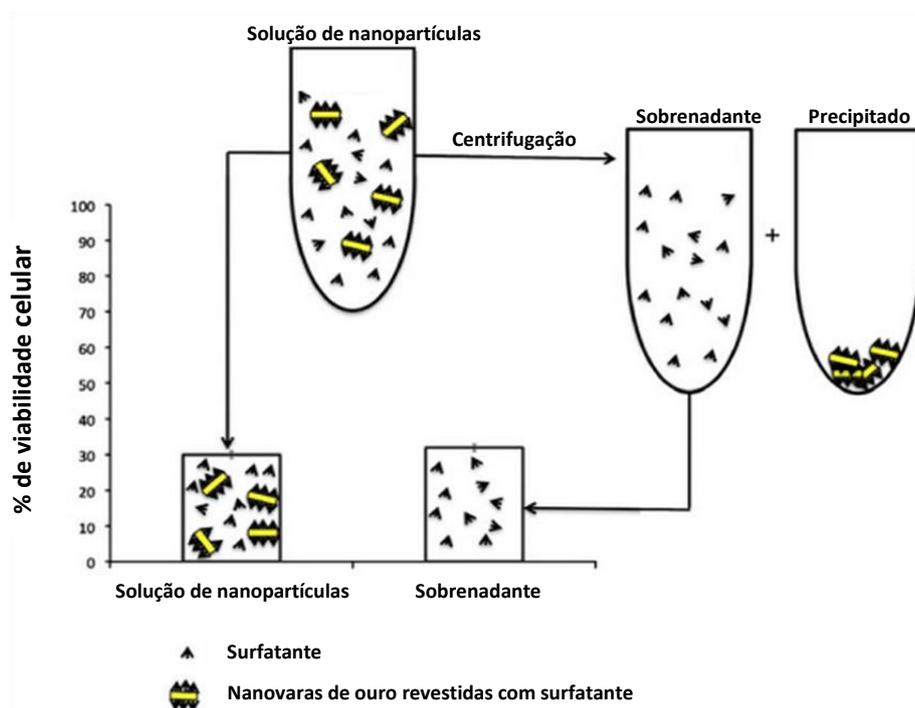


Figura 39 – Controle do sobrenadante. Adaptado da Ref. [112]

Do conjunto de artigos consultados, não se encontram estudos de citotoxicidade de nanopartículas idênticas às estruturas núcleo-concha em discussão. O mesmo não acontece em relação à citotoxicidade de nanopartículas de ouro em que a literatura disponível é vasta. Além do trabalho de Alkilany e Murphy [112] há que referir o trabalho de Harper *et al.* [106] que investigou a influência de alguns parâmetros na toxicidade, tendo mostrado que a mortalidade, malformações, a absorção e a eliminação de NP Au dependem do tamanho do núcleo, da química da superfície e da carga, evidenciando a necessidade de um controlo apertado sobre as condições experimentais e a caracterização dos nanomateriais, apesar de não se observar toxicidade inerente nestas nanopartículas, tal como referem Semmler-Behnke *et al.* [52]. No artigo de revisão de Lewinski *et al.* [15] são levantadas outras questões como, por exemplo, as

que referem poder não ser a diminuição da viabilidade celular o único efeito adverso das nanopartículas, podendo estas afetar a resposta imunológica do organismo. Este último artigo referencia, igualmente, as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas especulando-se sobre a origem da sua citotoxicidade. Esta poderá advir da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) o que pode resultar na peroxidação de lípidos, danificação do DNA e oxidação de proteínas. Esta questão é igualmente discutida por Könczöl *et al.*[59]. Kittler *et al.* [48] discutem o efeito da libertação de iões de prata, resultante do envelhecimento das soluções coloidais, no aumento da citotoxicidade de nanopartículas de prata estabilizadas com PVP.

Conclusão

Depois de sintetizadas e caracterizadas analisou-se a biocompatibilidade de um conjunto de nanopartículas monometálicas e bimetálicas núcleo-concha.

Os métodos de síntese utilizados no trabalho foram reproduzidos e adaptados a partir de um conjunto de artigos publicados na literatura. A síntese de nanopartículas de ouro constituiu um desafio muito interessante. Prepararam-se soluções coloidais com uma grande variedade de cores (rosa, violeta, azul escuro e *bordeaux*). A redução do ácido cloroáurico tri-hidratado com β -D-glucose na presença de amido produziu os melhores resultados. É de fácil e rápida execução. Os espectros de UV-Vis apresentam uma curva Gaussiana com valores de máximo de absorvância superiores aos apresentados pela síntese na ausência de amido, cuja banda é mais larga. A utilização de β -ciclodextrina para a redução do ouro também produz bons resultados e é reprodutível. No entanto, envolve aquecimento e como tal um maior consumo de energia.

Em relação à síntese de nanopartículas de prata a característica coloração amarela está sempre presente, variando entre um amarelo brilhante vivo, quando reduzida pelo borohidreto de sódio e um amarelo baço ou pálido quando se usou a β -D-glucose ou a β -ciclodextrina. O método que produziu melhores resultados foi o da redução de nitrato de prata com borohidreto de sódio. Trata-se de um procedimento simples e de fácil execução. Tal como para o caso do ouro, a síntese de nanopartículas de prata com β -ciclodextrina envolve um gasto energético superior. A síntese de nanopartículas de prata através do uso de micro-ondas e num banho termostatizado é energeticamente desfavorável e além disso nem sempre foi bem sucedida. A co-redução de uma mistura de iões de ouro e prata nem sempre se mostrou reprodutível, verificando-se variações na tonalidade das soluções coloidais preparadas. A co-redução resulta normalmente na formação de ligas de metais. No entanto, para a síntese na razão de 1:1 a existência de apenas um máximo de absorção, a cerca de 530nm, no espectro de UV-Vis associada à ausência de prata do espectro de EDX são indicativos de uma estrutura núcleo-concha que refletem o máximo característico do ouro como se a prata não estivesse presente. A redução sucessiva de ácido cloroáurico tri-hidratado, com β -D-glucose na presença de amido, sobre a prata coloidal resultou na formação de estruturas núcleo-concha. A preparação de nanopartículas núcleo-concha mediada pela β -ciclodextrina revelou-se reprodutível e produziu perfis de absorção bem definidos.

Os resultados mostram o máximo de absorção típico das nanopartículas de prata a $\lambda \sim 400\text{nm}$, correspondente à característica ressonância da superfície plasmónica destas partículas. Para o caso das nanopartículas de ouro este valor situa-se a $\lambda \sim 500\text{nm}$. No caso das nanopartículas núcleo-concha de prata revestidas com ouro observou-se um desvio do pico da prata para maiores comprimentos de onda e um efeito oposto no caso das nanopartículas de ouro revestidas com prata.

Relativamente às nanopartículas de magnetite, a sua síntese é de execução mais trabalhosa mas reprodutível. O facto de apresentarem um comportamento magnético na presença de um íman torna estas soluções coloidais fascinantes. Depois do revestimento com ouro obteve-se a coloração bourdeaux límpida, esperada desde o início dos trabalhos. Tanto o revestimento com ouro como o revestimento com prata resultaram no surgimento do respetivo máximo de absorvância característico.

A análise morfológica por microscopia eletrónica de transmissão, permitiu confirmar a presença de nanopartículas de forma esférica, confirmar o tamanho e também permitiu a visualização de aglomerados de nanopartículas, principalmente no caso das estruturas núcleo-concha. Conforme esperado, os valores relativos à dimensão das nanopartículas obtidos por dispersão dinâmica de luz foram superiores aos encontrados por TEM. Na análise por DLS a existência de aglomerados esconde partículas de menor dimensão presentes na amostra.

Conclui-se que o tipo de estabilização das nanopartículas utilizadas nos testes de citotoxicidade, sobretudo eletrostática, foi suficiente para garantir a qualidade das amostras que se revelaram biocompatíveis. No entanto, seria interessante analisar a estabilidade das várias composições após a mistura com o PBS e o meio de cultura ou mesmo na presença dos estabilizantes habitualmente utilizados: o PVP, por exemplo, para as NP de ouro e prata, e para as NP de magnetite, dextrano, PEG ou PAA que são polímeros biocompatíveis para a conjugação a agentes terapêuticos e para a melhoria do perfil de biodistribuição, tal como sugerem Wahajuddin e Arora [83]. Poderia ainda analisar-se o efeito da funcionalização das NP na biocompatibilidade. Erathodiyil *et al.* [123] reveem um conjunto de técnicas de revestimento e funcionalização que dão origem a nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos, entre outras, com propriedades físicas melhoradas. Apesar de no geral as nanopartículas preparadas apresentarem baixos valores de citotoxicidade, o próximo passo seria compreender a sua origem através da comparação entre a toxicidade da solução coloidal e a do sobrenadante separadamente.

Porém nem sempre é possível, dentro dos *timings* estabelecidos, testar todas as hipóteses que nos surgem ao analisar resultados obtidos, como gostaríamos. Experimentações futuras encontrarão, por certo, resposta a questões agora levantadas.

Apesar de modesto esperamos que este trabalho possa, de algum modo, contribuir para despertar o interesse pelo assunto e que seja o primeiro de muitos trabalhos nesta área aqui na Universidade da Madeira pois o desenvolvimento da medicina teranóstica passará seguramente pela engenharia de nanopartículas multifuncionais.

Referências

1. Nagarajan R, Hatton TA. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization. Society AC, Ed. 2008
2. Hutchings GJ, Brust M, Schmidbaur H. Gold—An Introductory Perspective. Chem. Soc. Rev. 2008;37:1759–1765.
3. http://www.britishmuseum.org/images/k741_s.jpg (acedido a 2012.08.25).
4. Wilson R. The Use of Gold Nanoparticles in Diagnostics and Detection. Chem. Soc. Rev. 2008;37:2028-2045.
5. Faraday M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. Philos. Trans. R. Soc. A 1857;147:145-181.
6. Schmid G. The Relevance of Shape and Size of Gold Nanoparticles. Journal 2009; 1 (XXIV).
7. Mie G. Beitrage Zur Optik Truber Medien, Speziell Kolloidaler Metallosungen. Annalen der Physik. 1908;26.
8. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. Discuss Faraday Soc 1951;11:55-75.
9. Kleeman W. Absorption of Colloidal Silver in KC1. Zeitschrift für Physik 1968;215:113-120.
10. Boisselier E, Astruc D. Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Preparations, Imaging, Diagnostics, Therapies and Toxicity. Chem. Soc. Rev. 2009;38:1759-1782.
11. Atkins P, Overton T, Rourke J, Weller M, Armstrong F. Shriver and Atkins Inorganic Chemistry. Bookman: 2006.
12. Daniel MC, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. Chem. Rev. 2004;104:293-346.
13. Chaudhuri RG, Paria S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. Chem. Rev. 2012;112:2373-2433.
14. Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured Nanoparticles: An Overview of Their Chemistry, Interactions and Potential Environmental Implications. Sci. Total Environ. 2008;400:396-414.
15. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. Small 2008;4:26 – 49.

16. Shi JJ, Xiao Z, Kamaly N, Farokhzad OC. Self-Assembled Targeted Nanoparticles: Evolution of Technologies and Bench to Bedside Translation. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:1123-1134.
17. Kievit FM, Zhang M. Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:853-862.
18. Bell CS, Yu SS, Giorgio TD. The Multistrata Nanoparticle: an FeOx/Au Core/Shell Enveloped in a Silica-Au Shell. *Small* 2011;7:1158-1162.
19. Leung KCF, Xuan S, Zhu X, Wang D, Chak CP, Lee SF, Ho WKW, Chung BCT. Gold and Iron Oxide Hybrid Nanocomposite Materials. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41:1911-1928.
20. Yoo D, Lee JH, Shin TH, Cheon J. Theranostic Magnetic Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:863-874.
21. Ho D, Sun X, Sun S. Monodisperse Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Acc. Chem. Res.* 2011;44 875-882
22. Bardhan R, Lal S, Joshi A, Halas NJ. Theranostic Nanoshells: From Probe Design to Imaging and Treatment of Cancer. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:936-946.
23. Shore MS, Wang J, Johnston-Peck AC, Oldenburg AL, Tracy JB. Synthesis of Au(Core)/Ag(Shell) Nanoparticles and their Conversion to AuAg Alloy Nanoparticles. *Small* 2011;7:230-234.
24. Schärfl W. Current Directions in Core–Shell Nanoparticle Design. *Nanoscale* 2010;2:829-843.
25. Hirsch LR, Gobin AM, Lowery AR, Tam F, Drezek RA, Halas NJ, West JL. Metal Nanoshells. *Ann. Biomed. Eng.* 2006;34:15-22.
26. Hao R, Xing R, Xu Z, Hou Y, Gao S, Sun S. Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. *Adv. Mater.* 2010;22:2729-2742.
27. Melancon M, Lu W, Li C. Gold-Based Magneto/Optical Nanostructures: Challenges for In Vivo Applications in Cancer Diagnostics and Therapy. *Mater Res Bull.* 2009;34:415-421.
28. Dreaden EC, El-Sayed MA. Detecting and Destroying Cancer Cells in More than One Way with Noble Metals and Different Confinement Properties on the Nanoscale. *Acc. Chem. Res.* 2011;10.1021/ar2003122.
29. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 2005;100:1-11.

30. Figuerola A, Corato RD, Manna L, Pellegrino T. From Iron Oxide Nanoparticles Towards Advanced Iron-Based Inorganic Materials Designed for Biomedical Applications. *Pharmacol. Res.* 2010;62:126–143.
31. Koo H, Huh MS, Sun IC, Yuk SH, Choi K, Kim K, Kwon IC. In Vivo Targeted Delivery of Nanoparticles for Theranosis. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:1018-1028.
32. Wang LS, Chuang MC, Ho JA. Nanotheranostics - A Review of Recent Publications. *Int. J. Nanomed.* 2012:4679-4695.
33. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine.* Academic Press: 1996.
34. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41:2740-2779.
35. http://maisunifra.com.br/wp-content/uploads/img_nan_conceitos-basicos_ouro.jpg (accedido a 2012.08.26).
36. Lv W, Wang Y, Feng W, Qi J, Zhang G, Zhang F, Fan X. Robust and Smart Gold Nanoparticles: One-Step Synthesis, Tunable Optical Property, and Switchable Catalytic Activity. *J. Mater. Chem.* 2011;21:6173-6178.
37. Liu Y, Han X, He L, Yin Y. Thermoresponsive Assembly of Charged Gold Nanoparticles and Their Reversible Tuning of Plasmon Coupling. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012;51:6373-6377.
38. Dykman L, Khlebtsov N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: Recent Advances and Perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41:2256-2282.
39. Chen PC, Mwakwari SC, Oyelere AK. Gold Nanoparticles: From Nanomedicine to Nanosensing. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2008;1:45-66.
40. Brown SD, Nativo P, Smith JA, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B, Flint DJ, Plumb JA, Graham D, Wheate NJ. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132:4678-4684.
41. Kennedy LC, Bickford LR, Lewinski NA, Coughlin AJ, Hu Y, Day ES, West JL, Drezek RA. A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small* 2011;7:169-183.
42. Sperling RA, Gil PR, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2008;37:1896-1908.
43. Day ES, Bickford LR, Slater JH, Riggall NS, Drezek RA, West JL. Antibody-Conjugated Gold-Gold Sulfide Nanoparticles as Multifunctional Agents for Imaging and Therapy of Breast Cancer. *Int. J. Nanomed.* 2010;5 445-454.

44. Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2008;1:17-32.
45. Craig GE, Brown SD, Lamprou DA, Graham D, Wheate NJ. Cisplatin-Tethered Gold Nanoparticles that Exhibit Enhanced Reproducibility, Drug Loading, and Stability: a Step Closer to Pharmaceutical Approval? *Inorg. Chem.* 2012;51:3490-3497.
46. El-Nour KMMA, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar RAA. Synthesis and Applications of Silver Nanoparticles. *Arab. J. Chem.* 2010;3:135-140.
47. Choi S, Dickson RM, Yu J. Developing Luminescent Silver Nanodots for Biological Applications. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41:1867-1891.
48. Kittler S, Greulich C, Diendorf J, Köller M, Epple M. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chem. Mat.* 2010;22:4548-4554.
49. Lankveld DPK, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Jong AT, Noorlander CW, Van Eijkeren JCH, Geertsma RE, De Jong WH. The Kinetics of the Tissue Distribution of Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Biomaterials* 2010;31:8350-8361.
50. Thakor AS, Jokerst J, Zavaleta C, Massoud TF, Gambhir SS. Gold Nanoparticles: A Revival in Precious Metal Administration to Patients. *Nano Lett.* 2011;11:4029-4036.
51. Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, Morrell-Falvey JL, Gu B, Doktycz MJ. Cytotoxicity Induced by Engineered Silver Nanocrystallites Is Dependent on Surface Coatings and Cell Types. *Langmuir* 2012;28:2727-2735.
52. Semmler-Behnke M, Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S, Schmid G, Brandau W. Biodistribution of 1.4- and 18-nm Gold Particles in Rats. *Small* 2008;4:2108-2111.
53. Smith WF, Principles of Materials Science and Engineering. 1996.
54. Henriques AB, Rimal JC. Electromagnetismo. IST press: 2006.
55. Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008;60:1252-1265.
56. Thanh NTK. Magnetic Nanoparticles From Fabrication to Clinical Applications. CRC Press: 2012.
57. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* 2005;26:3995-4021.
58. Gossuin Y, Gillis P, Hocq A, Vuong QL, Roch A. Magnetic Resonance Relaxation Properties of Superparamagnetic Particles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2009;1:299-310.

59. Könczöl M, Ebeling S, Goldenberg E, Treude F, Gminski R, Gieré R, Grobéty B, Rothen-Rutishauser B, Merfort I, Mersch-Sundermann V. Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chem. Res. Toxicol.* 2011;24:1460-1475.
60. Lyon JL, Fleming DA, Stone MB, Schiffer P, Williams ME. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. *Nano Lett.* 2004;4:719-723.
61. Corot C, Robert P, Idee J, Port M. Recent Advances in Iron Oxide Nanocrystal Technology for Medical Imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006;58:1471-1504.
62. Cheong S, Ferguson P, Feindel KW, Hermans IF, Callaghan PT, Meyer C, Slocombe A, Su CH, Cheng FY, Yeh CS, Ingham B, Toney MF, Tilley RD. Simple Synthesis and Functionalization of Iron Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011;50:4206-4209.
63. Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Veverka P, Goglio G, Demourgues A, Portier J, Pollert E, Duguet E. Magnetic Nanoparticle Design for Medical Applications. *Prog. Solid State Chem.* 2006;34:237-247.
64. Peiris PM, Bauer L, Toy R, Tran E, Pansky J, Doolittle E, Schmidt E, Hayden E, Mayer A, Keri RA, Griswold MA, Karathanasis E. Enhanced Delivery of Chemotherapy to Tumors Using a Multicomponent Nanochain with Radio-Frequency-Tunable Drug Release. *ACS Nano* 2012;6:4157-4168.
65. Xu C, Wang B, Sun S. Dumbbell-like Au-Fe₃O₄ Nanoparticles for Target-Specific Platin Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 2009;131:4216-4217.
66. Fang C, Zhang M. Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Medical Imaging Applications. *J. Mater. Chem.* 2009;19:6258-6266.
67. Xu Z, Hou Y, Sun S. Magnetic Core/Shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag Nanoparticles with Tunable Plasmonic Properties. *J. Am. Chem. Soc.* 2007;129:8698-8699.
68. Sounderya N, Zhang Y. Use of Core/Shell Structured Nanoparticles for Biomedical Applications. *Rec. Pat. Biomed. Eng.* 2008;1:34-42.
69. Zhang J, Tang Y, Weng L, Ouyang M. Versatile Strategy for Precisely Tailored Core@Shell Nanostructures with Single Shell Layer Accuracy: The Case of Metallic Shell. *Nano Lett.* 2009;9:4061-4065.
70. Liu X, Liu X. Bimetallic Nanoparticles: Kinetic Control Matters. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012;51:3311-3313.

71. Wang L, Luo J, Fan Q, Suzuki M, Suzuki IS, Engelhard MH, Lin Y, Kim N, Wang JQ, Zhong CJ. Monodispersed Core-Shell Fe₃O₄@Au Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 2005;109:21593-21601.
72. Tsuji M, Yamaguchi D, Matsunaga M, Ikedo K. Epitaxial Growth of Au@Ni Core-Shell Nanocrystals Prepared Using a Two-Step Reduction Method. *Cryst. Growth Des.* 2011;11:1995-2005.
73. Rodriguez JA. Physical and Chemical Properties of Bimetallic Surfaces. *Surf. Sci. Rep.* 1996;24:223-287.
74. Cortie MB, McDonagh AM. Synthesis and Optical Properties of Hybrid and Alloy Plasmonic Nanoparticles. *Chem. Rev.* 2011;111:3713-3735.
75. Huang YF, Lin YW, Chang HT. Growth of Various Au-Ag Nanocomposites from Gold Seeds in Amino Acid Solutions. *Nanotechnology* 2006;17:4885-4894.
76. Aaron JS, Oh J, Larson TA, Kumar S, Milner TE, Sokolov KV. Increased Optical Contrast in Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor Using Magnetically Actuated Hybrid Gold/Iron Oxide Nanoparticles. *Opt. Express* 2006;14:12930-12943.
77. Huang C, Jiang J, Muangphat C, Sun X, Hao Y. Trapping Iron Oxide into Hollow Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2011;6:43-47.
78. Xie J, Liu G, Eden HS, Al H, Chen X. Surface-Engineered Magnetic Nanoparticle Platforms for Cancer Imaging and Therapy. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:883-892.
79. Lim IIS, Njoki PN, Park HY, Wang X, Wang L, Mott D, Zhong CJ. Gold and Magnetic Oxide/Gold Core/Shell Nanoparticles as Bio-Functional Nanoprobes. *Nanotechnology* 2008;19:305102.
80. Wang L, Park HY, Lim SII, Schadt MJ, Mott D, Luo J, Wang X, Zhong CJ. Core@Shell Nanomaterials: Gold-Coated Magnetic Oxide Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2008;18:2629-2635.
81. Gao J, Gu H, Xu B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Application. *Acc. Chem. Res.* 2009;42:1097-1107.
82. Day ES, Thompson PA, Zhang L, Lewinski NA, Ahmed N, Drezek RA, Blaney SM, West JL. Nanoshell-Mediated Photothermal Therapy Improves Survival in a Murine Glioma Model. *J. Neuro-Oncol.* 2010;104:55-63.
83. Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetic Nanoplatfroms as Drug Carriers. *Int. J. Nanomed.* 2012:3445-3471.
84. Anandan S, Grieser F, Ashokkumar M. Sonochemical Synthesis of Au-Ag Core-Shell Bimetallic Nanoparticles. *J. Phys. Chem.* 2008 112:15102-15105.

85. Lim JH, Lee JS. A Statistical Design and Analysis Illustrating the Interactions Between Key Experimental Factors for the Synthesis of Silver Nanoparticles. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2008;322:155-163.
86. Ingham B, Lim TH, Dotzler CJ, Henning A, Toney MF, Tilley RD. How Nanoparticles Coalesce: An In Situ Study of Au Nanoparticle Aggregation and Grain Growth. *Chem. Mater.* 2011;23:3312-3317.
87. Handy RD, Kammer F, Lead JR, Hasselov M, Owen RC, M. The Ecotoxicology and Chemistry of Manufactured Nanoparticles. *Ecotoxicology* 2008;17:287-314.
88. Yang N, Aoki K. Molecular Numbers in Core and Shell: Structural Dependence of Reactivity of Alkylcarboxylate-Stabilized Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 2005;109:23911-23917.
89. Dumur F, Guerlin A, Dumas E, Bertin D, Gignes D, Mayer CR. Controlled Spontaneous Generation of Gold Nanoparticles Assisted by Dual Reducing and Capping Agents. *Gold Bull.* 2011;44:119-137.
90. Nanaie H, Cooper A, Sanders S, Zhao D. Inter-Dendrimer Stabilized Ag/Au Alloy and Core-Shell Nanoparticles. *J. Phys. Nat. Sci.* 2007;1:1-7.
91. Pande S, Ghosh SK, Praharaj S, Panigrahi S, Basu S, Jana S, Pal A, Tsukuda T, Pal T. Synthesis of Normal and Inverted Gold-Silver Core-Shell Architectures in β -Cyclodextrin and Their Applications in SERS. *J. Phys. Chem.* 2007;111:10806-10813.
92. Lo CK, Xiao D, Choi MMF. Homocysteine-Protected Gold-Coated Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Characterisation. *J. Mater. Chem.* 2007;17:2418-2427.
93. Klabunde K. *Nanoscale Materials in Chemistry*. Wiley, Ed. 2001.
94. http://www.sagan-gea.org/hojared_radiacion/imagenes/espectroem3.gif
http://4.bp.blogspot.com/_Q-2j2ApepA/SXWnt1CyFNI/AAAAAAAAATA/Ovwxzo_v738/s200/rosa+das+cores.bmp (accedidos a 2011.07.01).
95. Banerjee S, Raja SO, Sardar M, Gayathri N, Ghosh B, Dasgupta A. How Gold Nanoparticle Acquires Magnetism? - Formation of Large Orbital Moment at the Interface. 2010;arXiv:0912.3319v2.
96. Khan FA, Süss-Fink G. Superparamagnetic Core-Shell-Type Fe₃O₄/Ru Nanoparticles as Catalysts for the Selective Hydrogenation of an Unconstrained α,β -Unsaturated Ketone. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012:727-732.
97. Rossi LM, Vono LLR, Silva FP, Kiyohara PK, Duarte EL, Matos JR. A Magnetically Recoverable Scavenger for Palladium Based on Thiol-Modified Magnetite Nanoparticles. *Appl. Catal. A: Gen.* 2007;330:139-144.

98. Mahl D, Diendorf J, Meyer-Zaika W, Epple M. Possibilities and Limitations of Different Analytical Methods for the Size Determination of a Bimodal Dispersion of Metallic Nanoparticles. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2011;377:386-392.
99. Kumar A, Singhal A. Synthesis of Colloidal Silver Iron Oxide Nanoparticles—Study of their Optical and Magnetic Behavior. *Nanotechnology* 2009;20:295606.
100. Raveendran P, Fu J, Wallen SL. A Simple and “Green” Method for the Synthesis of Au, Ag, and Au–Ag Alloy Nanoparticles. *Green Chem.* 2006;8:34-38.
101. Raveendran P, Fu J, Wallen SL. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2003;125:13940-13941.
102. Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam AV, Rutkowsky SA, Boritz C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles *J. Chem. Edu.* 2007;84:322-325.
103. Massart. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* 1981;17:1247–1248.
104. Aoki K, Chen J, Yang N, Nagasawa H. Charge-Transfer Reactions of Silver Stearate-Coated Nanoparticles in Suspensions. *Langmuir* 2003;19:9904-9909.
105. Mailander V, Landfester K. Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules* 2009;10:2379–2400.
106. Harper SL, Carriere JL, Miller JM, Hutchison JE, Maddux BLS, Tanguay RL. Systematic Evaluation of Nanomaterial Toxicity: Utility of Standardized Materials and Rapid Assays. *ACS Nano* 2011;5:4688-4697.
107. Auffan M, Rose J, Wiesner MR, Bottero JY. Chemical Stability of Metallic Nanoparticles: A Parameter Controlling Their Potential Cellular Toxicity In Vitro. *Environ. Pollut.* 2009;157:1127-1133.
108. Lee H, Yu MK, Park S, Moon S, Min JJ, Jeong YY, Kang HW, Jon S. Thermally Cross-Linked Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Application as a Dual Imaging Probe for Cancer in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* 2007;129:12739-12745.
109. Tassa C, Shaw S, Weissleder R. Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics, and Therapy. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:842–852.
110. Kenzaoui BH, Vilà MR, Miquel JM, Cengelli F, Juillerat-Jeanneret L. Evaluation of Uptake and Transport of Cationic and Anionic Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles by Human Colon Cells. *Int. J. Nanomed.* 2012;7:1275-1286.

111. Lee PW, Hsu SH, Wang JJ, Tsai JS, Lin KJ, Wey SP, Chen FR, Lai CH, Yen TC, Sung HW. The Characteristics, Biodistribution, Magnetic Resonance Imaging and Biodegradability of Superparamagnetic Core–Shell Nanoparticles. *Biomaterials* 2010;31:1316-1324.
112. Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and Cellular Uptake of Gold Nanoparticles: What We Have Learned So Far? *J Nanopart Res* 2010;12:2313-2333.
113. Liu J, Qin G, Raveendran P, Ikushima Y. Facile “Green” Synthesis, Characterization, and Catalytic Function of β -D-Glucose-Stabilized Au Nanocrystals. *Chem. Eur. J.* 2006;12:2131-2138.
114. Toshima N, Yonezawa T. Bimetallic Nanoparticles—Novel Materials for Chemical and Physical Applications. *New J. Chem.* 1998;22:1179-1201.
115. Güzel R, Üstündağ Z, Ekşi H, Keskin S, Taner B, Durgun ZG, Turan AAİ, Solak AO. Effect of Au and Au@Ag Core–Shell Nanoparticles on the SERS of Bridging Organic Molecules. *J. Colloid Interface Sci.* 2010;351:35-42.
116. Hall WP, Hartland G, Duyne RV, Petrova H. Single Nanoparticle Spectroscopy: An Analysis of Sample Preparation and Microscopy Techniques. *Nanoscale* 2005;2:35-41.
117. Wu Y, Jiang P, Jiang M, Wang TW, Guo CF, Xie SS, Wang ZL. The Shape Evolution of Gold Seeds and Gold@Silver Core–Shell Nanostructures. *Nanotechnology* 2009;20:305602-305612.
118. Chairam S, Poolperm C, Somsook E. Starch Vermicelli Template-Assisted Synthesis of Size/Shape-Controlled Nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 2009;75:694-704.
119. Li ZY, Wilcoxon JP, Yin F, Chen Y, Palmer RE, Johnston RL. Structures and Optical Properties of 4–5 nm Bimetallic AgAu Nanoparticles. *Faraday Discuss.* 2008;138:363-373.
120. Shibata T, Bunker BA, Zhang Z, Meisel D, Vardeman II CF, Gezelter JD. Size-Dependent Spontaneous Alloying of Au-Ag Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2002;124:11989-11996.
121. Kang YS, Risbud S, Rabolt JF, Stroeve P. Synthesis and Characterization of Nanometer-Size Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Particles. *Chem. Mater.* 1996;8:2209-2211.
122. Banerjee S, Raja SO, Sardar M, Gayathri N, Ghosh B, Dasgupta A. Enhanced Magnetism, Memory and Aging in Gold-Iron Oxide Nanoparticle Composites. 2009;arXiv:0906.1497v2.
123. Erathodiyil N, Ying JY. Functionalization of Inorganic Nanoparticles for Bioimaging Applications. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:925-935.

ANEXOS

Anexo I - Técnicas experimentais

I.1 - Difração de raios-X

A difração de raios-X é uma técnica de identificação da estrutura de materiais. Admitindo que os átomos do material em análise se encontram igualmente espaçados a uma determinada distância interplanar d , ao serem expostos a uma radiação com comprimento de onda inferior a d , esta vai ser dispersa em diferentes direções. Alguns destes fótons vão interagir entre si construtivamente e outros destrutivamente. A forma como a radiação se dispersa depende do comprimento de onda da mesma e da estrutura atômica da amostra cristalina. Na Figura encontra-se esquematizada uma interação construtiva da radiação com o material. Com base em relações geométricas é possível chegar à lei de Bragg dada por $n\lambda=2d\sin\theta$. Em que λ é o comprimento de onda dos fótons incidentes, d a distância interplanar e θ o ângulo entre o plano dos átomos e o feixe de fótons incidentes (θ varia entre 0 e 90°).

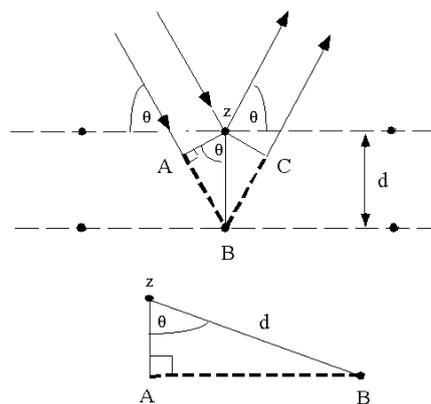


Figura - Esquema da interação da radiação com uma amostra cristalina

O erro relativo do método é dado pela relação $\frac{\Delta d}{d} = -\cot\theta \Delta\theta$. Pelo que se conclui que quanto maior o ângulo de incidência menor será o erro relativo da medida. Para além do erro matemático existem outros condicionantes experimentais que podem induzir a erros mais significativos nas medidas tais como o correto posicionamento da amostra no porta-amostras, a espessura e a compactação da amostra.

Com os dados de XRD é possível obter uma estimativa das dimensões das cristalites que formam os grãos. Para tal recorreu-se à fórmula de Scherrer, $\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$ em que K é o fator de forma, λ o comprimento de onda da radiação incidente, β a largura a meia altura do pico em radianos e θ o ângulo de Bragg. Esta fórmula não é aplicável a grãos com dimensões superiores a $0,1\mu\text{m}$ e o

fator de forma varia com a estrutura da cristalite. É, no entanto, afetada por diferentes fatores como por exemplo as especificações do equipamento e as condições de preparação da amostra (espessura, homogeneidade, deformações da rede, polidispersão, etc.). Este método tem como desvantagem a preparação da amostra, uma vez que têm de ser preparadas amostras secas.

Referências:

- Zvi Szafran, Ronald M. Pike, Mono M. Singh *Microscale Inorganic Chemistry, A comprehensive Laboratory Experience John Wiley & Sons, Inc., 1991;*
- Skoog *et al.*, *Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole, 6th ed., 2007,* 169-173.
- Handy R.D., Kammer F. von der, Lead J.R., Hassellöv M., Owen R., Crane M., *The ecotoxicology and chemistry of manufactured Nanoparticles, Ecotoxicology, 2008, 17,* 287-314.

I.2 - Dispersão dinâmica da luz

A técnica de Dispersão Dinâmica da Luz é também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons e pode ser usada para determinar o perfil de distribuição de tamanho de pequenas partículas em suspensão. O seu princípio de funcionamento baseia-se na medição do movimento browniano das partículas. Este movimento ocorre quando as moléculas do meio líquido colidem com as partículas em suspensão. Por esta razão, as partículas de maior dimensão possuem uma velocidade de difusão mais lenta que as menores. O cálculo da dimensão das partículas não é por isso direto e é influenciado por diferentes fatores como a temperatura e a força iónica do meio. No que respeita a primeira ela interfere diretamente na viscosidade do meio causando maior ou menor atrito. A temperatura tem por isso de se manter estável para que as correntes de convecção não adulterem os resultados. É importante ter em conta que a medida adquirida não corresponde às partículas em si nem mesmo aos agregados, correspondendo antes ao Diâmetro Hidrodinâmico por elas formado. Este diâmetro corresponde ao de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão translacional que a partícula/agregado em si. Este coeficiente é influenciado pela partícula em si, pela sua superfície, pela concentração e o tipo de iões do meio. O diâmetro Hidrodinâmico é então calculado através da equação de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Sendo k a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio e D o coeficiente de difusão translacional.

A técnica apresenta algumas limitações em particular no que respeita a forma, as partículas em suspensão devem ser esféricas, ao índice de dispersão, em que idealmente devem ser monodispersas sendo igualmente afetada pela aglomeração.

Esta técnica baseia-se na análise da variação da intensidade medida num ângulo fixo durante um determinado intervalo de tempo. A variação deste ângulo resulta em diferenças nalgumas ordens de grandeza na concentração máxima que o equipamento é capaz de medir. O equipamento da Malvern NS mede esta difração a um ângulo de 173° e pode medir concentrações até 5% da massa tendo em conta uma densidade de 1g/cm^3 para partículas entre os 10 e os 100 nm. As flutuações originadas pelo movimento Browniano das partículas vizinhas podem causar interferências construtivas ou destrutivas na difração da luz numa dada direção. Neste equipamento a intensidade da luz é medida durante pequenos intervalos de tempo (da ordem dos

micro/milissegundos). Esta intensidade é posteriormente relacionada entre si através de uma função de correlação.

A capacidade de difusão no meio das partículas muito pequenas (nanométricas) é muito grande pelo que o gráfico da sua correlação é muito mais irregular.

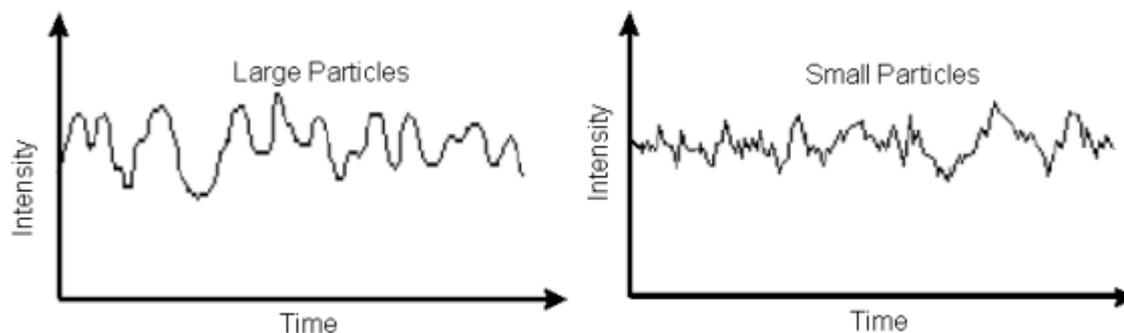


Figura - Intensidade típica para partículas grandes e pequenas.

Fazendo um gráfico da taxa de decaimento ao longo do tempo também é possível retirar informação acerca da dimensão das partículas. Quanto menor o tempo de decaimento menor a dimensão.

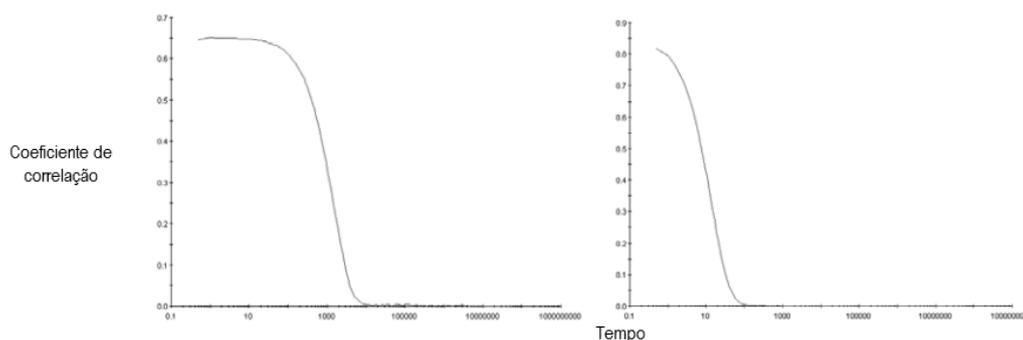


Figura – Coeficiente de Correlação vs Tempo para partículas grandes e para partículas pequenas.

A taxa de decaimento pode ser convertida em Dq^2 sendo D o coeficiente de difusão e q um vetor de onda; $q = \frac{\pi}{\lambda} \eta \sin(\pi/4)$ com η o índice de refração e λ o comprimento de onda da radiação

incidente. Sabendo o Coeficiente de Difusão é então possível calcular o diâmetro hidrodinâmico. Este diâmetro hidrodinâmico é então convertido num coeficiente de intensidade (z-average).

Este princípio tem uma limitação. Considerando o parâmetro de dispersão d , quando a dimensão da partícula é superior ao comprimento de onda incidente, a intensidade da luz dispersa depende apenas do ângulo difratado. Porém, para partículas de dimensões menores, com $d < \lambda/20$, há que considerar outros parâmetros como, por exemplo, o ângulo de dispersão ou as propriedades da solução. Usa-se por isso a aproximação de Rayleigh em que a intensidade $I \propto d^6$. Esta questão não se coloca para as partículas com dimensões entre $\lambda/20 < d < \lambda$, usando-se a aproximação de Mie em que: $d \propto I^2$.

Para termos uma visão mais realística de cada pico presente a distribuição de tamanhos por intensidade é convertida numa distribuição por volume.

Referências:

- M. Instruments, “Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes,” [http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/\\$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf), pp. 1-8 [consultado em 2011.07.16].

I.3 - Espectroscopia de dispersão de energia

É a técnica analítica mais usada para a análise elementar qualitativa ou para a caracterização química de uma amostra. É usada para determinar que elementos estão presentes e a sua abundância relativa. O equipamento permite identificar os raios-x (medindo o número e a energia) característicos de uma determinada estrutura elementar. Neste tipo de espectroscopia o detetor é um díodo semiconductor (Si ou Ge) e os raios-x, emitidos pela amostra irradiada por um feixe de elétrons, são detetados e convertidos num sinal elétrico que é processado num amplificador, analisado e exibido através de um espectro de EDS. As diferentes fases são assim visualizadas e a composição química é diretamente determinada.

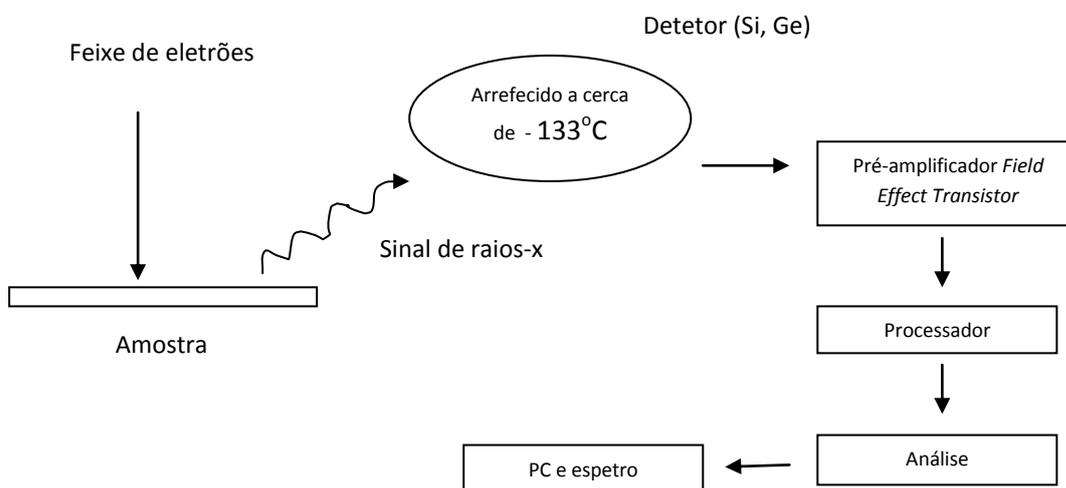


Figura – Circuito de processamento do sinal (adaptado de Egeston)

Referências:

- Egeston, R. F., Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM and AEM, Springer, 2005.

I.4 - Espectroscopia do ultravioleta-visível

A espectroscopia do ultravioleta-visível é uma técnica de caracterização óptica de materiais que se baseia na interação entre a radiação e a amostra. Para um dado comprimento de onda incidente, a técnica permite quantificar a Absorvância (A), a Refletância (R) e a Transmitância (T), parâmetros que se relacionam entre si através de: $A(\lambda)+T(\lambda)+R(\lambda) = 1$.

O Espectrofotômetro de UV-Vis possui dois tipos de lâmpadas, uma para a radiação visível geralmente de Deutério e outra para a Ultravioleta, de Tungstênio/Halogénio. Depois de atravessar um monocromador, a luz é dividida em dois feixes, um dos quais atravessa a amostra em estudo e o outro a de referência. A quantidade de luz que é transmitida ou refletida pela amostra é então comparada com a de referência. Deste modo, os dados obtidos representam a razão entre a radiação que atravessa a amostra e a incidente. Pela lei de Beer-Lambert é possível inferir a concentração de uma dada solução tendo em conta a absorção a um dado comprimento de onda através da relação $A = \alpha dc$. A é absorção, d é a distância percorrida pela luz ao longo do corpo, c a concentração da suspensão e α é uma constante dependente do comprimento de onda dada por $\alpha = 4\pi k/\lambda$ sendo k o coeficiente de extinção. A absorvância de uma amostra é $A = \log(I_0/I)$ em que I_0 é a intensidade incidente e I a intensidade medida depois de atravessar a amostra. A concentração pode então ser calculada através da fórmula:

$$c = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \frac{\lambda}{d4\pi k}$$

Referências:

- Szafran, Z., Pike, R. M., Singh, M. M., *Microscale Inorganic Chemistry, A comprehensive Laboratory Experience, John Wiley & Sons, Inc., 1991;*
- Skoog *et al.*, *Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole, 6th ed., 2007,* 169-173.

I.5 - Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão é a ferramenta central para a completa caracterização dos materiais à escala nano. Uma caracterização ideal envolve a determinação da estrutura cristalina, composição química, densidade (quantidade), tamanho, forma e distribuição das fases. A TEM permite estudar a quantidade, tamanho, morfologia, distribuição das fases e defeitos cristalinos. O microscópio eletrônico de transmissão produz imagens através de um feixe de elétrons que atravessa a amostra. A imagem é formada por um feixe de elétrons (primários) produzido por um filamento de tungstênio aquecido no topo de uma coluna. Esse feixe é acelerado através da coluna por uma alta voltagem (usualmente entre 75 a 120 KV). São utilizadas bobinas eletromagnéticas para condensar o feixe de elétrons que depois atravessa um seção muito fina da amostra. À medida que os elétrons a atravessam alguns são absorvidos e outros são dispersos, mudando de direção. As diferenças no feixe de elétrons secundários disperso ou difratado produzido pelos diferentes elementos ou defeitos da estrutura produzem um contraste que permite a observação detalhada da forma como os átomos estão ordenados sendo possível atingir resoluções da ordem do Angstrom. O microscópio possui detectores que identificam os elétrons secundários retrodifundidos, os raio-X característicos e os elétrons transmitidos.

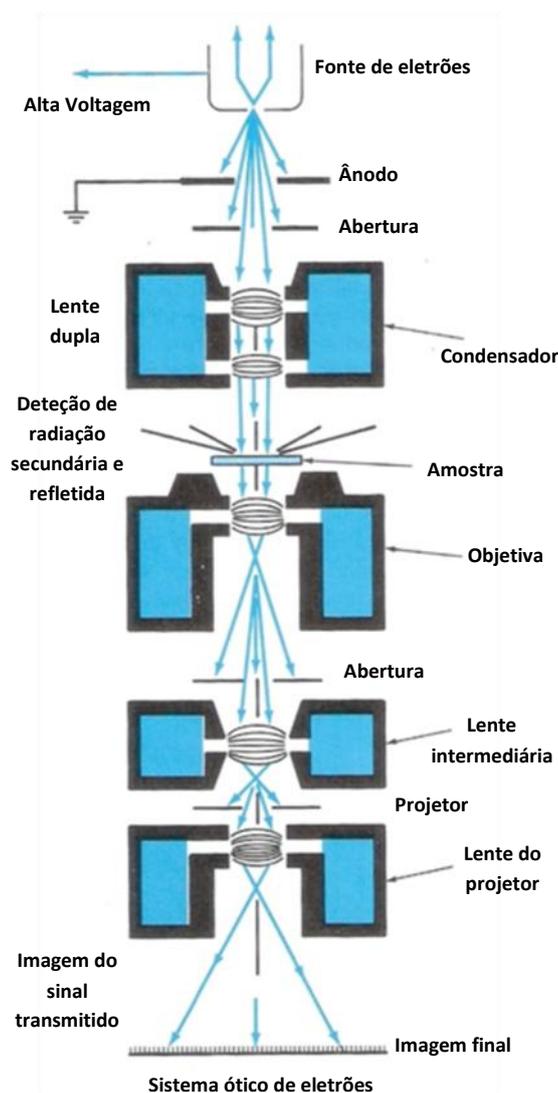


Figura – Disposição do sistema de lentes no microscópio eletrônico de transmissão. O caminho do feixe de elétrons da fonte até à imagem final está indicado por setas. A amostra é colocada entre o condensador as lentes da objetiva [Adaptado de Smith]

Referências:

- Smith W.S., Principles of Materials Science and Engineering, McGraw Hill, 1996;
- Callister W.D., Materials Science and Engineering an Introduction, Wiley, 1997;
- Williams, D. B., Carter, C. B., Transmission Electron Microscopy. 4th Edition, Springer, 1997.

I.6 - Potencial zeta

Em contacto com a água as nanopartículas adquirem uma carga elétrica superficial. Esta carga superficial afeta a distribuição de iões da solução na sua vizinhança, o que conduz ao aumento da concentração de contra iões à sua volta, formando desta forma uma dupla camada elétrica (Figura). Esta camada é composta por uma região interna em que os iões se encontram ligados fortemente à superfície e uma região externa variável, dependente das forças eletrostáticas e da temperatura. O potencial nesta camada exterior decresce com o afastamento da partícula até atingir o valor nulo (potencial zero). Ao aplicar um campo elétrico, as NP e a camada interna vão mover-se em uníssono, causando um arrasto da camada externa. A interface entre a camada interna e externa, vai sofrer forças contrárias levando ao rompimento das ligações. À região em que este fenómeno ocorre dá-se o nome de plano de escorregamento. O potencial zeta pode ser definido como a diferença entre o potencial elétrico do plano de escorregamento e um ponto no fluido da suspensão longe da partícula.

Ao aplicar um campo elétrico as partículas vão migrar em direção ao eletrodo contrário à sua carga. A sua velocidade é proporcional à magnitude do seu potencial zeta. Este método é muito sensível a contaminações. Este valor não pode ser medido diretamente mas pode ser calculado a partir de modelos teóricos que têm em conta, entre outros parâmetros, a viscosidade da suspensão e medidas de mobilidade eletroforética. Ou seja, através da medida de Mobilidade Eletroforética é possível calcular o potencial zeta das partículas, obtendo-se assim uma medida da carga superficial da amostra. As partículas têm de estar em suspensão. Esta informação é fundamental no estudo da toxicidade ou na reatividade das nanopartículas. Contudo, esta técnica não tem em conta a heterogeneidade das cargas de cada molécula, fornecendo um valor médio. Existe uma variação do potencial zeta com alterações de pH e força iónica.

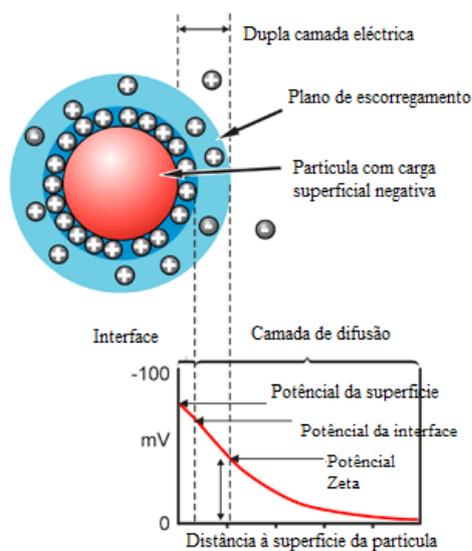


Figura - Potencial Zeta adaptado de http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm (acedido em 2011.09.26)

Referências:

- http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm (10 Outubro 2010);
- Oberdörster, J. J. G., Biswas, P., Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *Journal of Nanoparticle Research*, **2008**, *11*, 77-89.

Anexo II - Procedimentos experimentais

1º Procedimento Experimental (Setembro 2011) - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

OBJECTIVO: preparação de NP de Au por redução de iões Au $3+$ numa dispersão aquosa de β -D-Glucose. Investigação do pH e caracterização por espectroscopia UV-Vis, IV-TF, Difração de RX e Dispersão Dinâmica de Luz.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

I. MATERIAL, EQUIPAMENTO E REAGENTES	
Reagentes	Material/Equipamento
H ₂ AuCl ₄ .3H ₂ O	Balões volumétricos
β -D-Glucose	Goblés
Água desionizada	Erlenmeyer
NaOH	Placa de agitação magnética, agitador e pescador
	Espectrofotómetro UV-Vis
	Medidor de pH
	Difratómetro de RX
	Zetasizer

II. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	tempo estimado ~5h
1. Preparação das soluções: - 50 mL de β -D-Glucose (0,03M) - 200 μ L de H ₂ AuCl ₄ 3H ₂ O (0,05M) - NaOH (0,05M)	
2. Mistura das soluções de β -D-Glucose e H ₂ AuCl ₄ 3H ₂ O	
3. 30 minutos de agitação	
4. Adição gota a gota da solução de NaOH à mistura	
5. Verificação do pH	
6. Estudo da dinâmica da formação das NPAu com um Espectrofotómetro UV/Vis	

III. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA IV-TF	tempo estimado ~5h
7. Centrifugação da dispersão de NPAu t~20 min, v~6000 rpm	
8. Isolamento do precipitado de NPAg com uma pipeta plástica	
9. Repetir 3 vezes os passos 7. e 8.	
10. Membrana de centrifugação (peso molecular de cutoff 3000) para remover excesso de iões isolados à superfície	
11. Secagem a frio sob vácuo durante a noite para obtenção de um compósito seco de NPAu	
12. Preparação de pastilhas finas e transparentes de KBr (95mg) com NPAu (1mg)	
13. Subtração do espectro de uma pastilha pura de 100mg de KBr utilizada como referência	

IV. TAMANHO	tempo estimado ~5h
Zetasizer	

V. ESTUDOS DE CRISTALINIDADE	tempo estimado ~5h
Difratômetro XRD	

Tabela de dados químicos

	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Tfusão (°C)	Frases R/S
PERCLORATO DE OURO	16961-25-4	HAuCl ₄ .3H ₂ O	393,83			
β-D-GLUCOSE	492-61-5	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,10	1,54	150	-
HIDRÓXIDO DE SÓDIO	1310-73-2	NaOH	39,99	2,13	322	R35,36 e 38 S1/2, 26, 36, 37, 39 e 45

Artigo de referência: Liu J., Qin G., Raveendran P., Ikushima Y., *Facile "Green" Synthesis, Characterization, and Catalytic Function of β-D-Glucose-Stabilized Au Nanocrystals*, *Chem.-Eur. J.*, **2006** 12(8), 2131-2138.

2º Procedimento Experimental (Outubro 2011) - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA

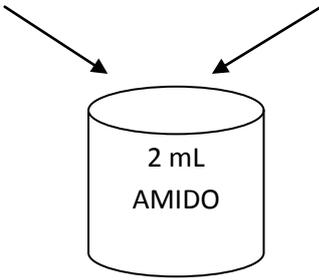
OBJECTIVO: preparação de NP_{Au} por redução de íons Au^{3+} do $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e de NP_{Ag} por redução de Ag^+ do AgNO_3 numa dispersão aquosa de Amido. Caracterização por espectroscopia UV-Vis e Dispersão Dinâmica de Luz (DLS).

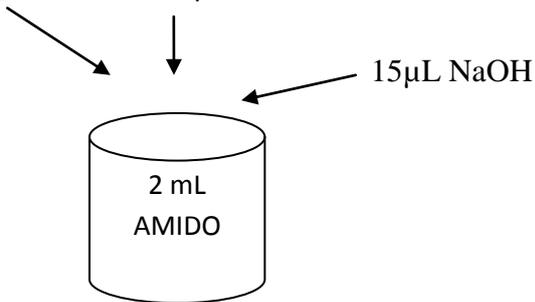
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

I. MATERIAL, EQUIPAMENTO E REAGENTES	
Reagentes	Material/Equipamento
$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Balões volumétricos
β -D-Glucose	Goblés
Água desionizada	Pipetas e micropipeta
NaOH	Espectrofotómetro UV-Vis
AgNO_3	Zetasizer
Amido	Medidor de pH

NOTA: Antes de iniciar a síntese todo o material deve ser verificado. O material de vidro deve ser lavado convenientemente em solução de RBS 25 (20g/L).

II. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	tempo estimado ~1h
- 5 mL de β -D-Glucose (0,1M) - 5 mL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,1M) - 5 mL de NaOH (1M) - 5 mL de AgNO_3 (0,1M) - 5 mL de Amido (0,20% peso)	

III. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE Ag	tempo estimado ~2h
<p>1. $10\mu\text{L AgNO}_3$ $25\mu\text{L } \beta\text{-D-Glucose}$</p>  <p style="text-align: center;">2 mL AMIDO</p>	
2. 60 segundos no microondas para a redução dos iões Ag^+	
3. Estudo da dinâmica da formação das NPAg com um Espectrofotômetro UV/Vis	
4. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer	

IV. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE Au	tempo estimado ~2h
<p>5. $40\mu\text{L HAuCl}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $60\mu\text{L } \beta\text{-D-Glucose}$ $15\mu\text{L NaOH}$</p>  <p style="text-align: center;">2 mL AMIDO</p>	
6. Medição do pH em intervalos de 10 minutos até 30 minutos, tempo a partir do qual a solução deverá tornar-se vermelha...	
7. Estudo da dinâmica da formação das NPAg com um Espectrofotômetro UV/Vis	
8. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer	

V. PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Au E Ag	tempo estimado ~2h
9. As NP ligadas com vários raios Au/Ag (0:1, 0,25:0,75, 0,5:0,5, 0,75:0,25 e 1:0) serão preparadas usando o procedimento anterior (IV), partindo de raios molares predeterminados de íons de Au e Ag em solução.	
10. Estudo da dinâmica da formação das NP com um Espectrofotômetro UV/Vis	
11. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer	

Tabela de dados químicos

	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Tfusão (°C)	Frases R/S
Ácido cloroáurico tri-hidratado	16961-25-4	HAuCl ₄ .3H ₂ O	393,83			R 22 e 34 S 26, 36/37/39 e 45
β-D Glucose	492-61-5	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,10	1,54	150	-
Nitrato de prata	7761-88-8	AgNO ₃	169,88	4,352	212	R8,R34, R50/53 (S1/2), S26, S45, S60, S61
Amido	9005-25-8	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n		1,5	A 200°C decompõe-se	-
Hidróxido de sódio	1310-73-2	NaOH	39,99	2,13	322	R35,36 e 38 S1/2, 26, 36, 37, 39 e 45

Artigo de referência: Raveendran P., Fu J., Wallen S.L., A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles, *Green Chem.*, **2006**, 8, 34-38.

OBJECTIVO: preparação de NP de Ag e de Au por redução, com β -D-Glucose, de iões de Ag^+ do AgNO_3 e de Au^{3+} do $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ numa dispersão aquosa de Amido. Deposição do Au sobre a Ag. Caracterização das três soluções coloidais por espectroscopia UV-Vis e Dispersão Dinâmica de Luz (*DLS*).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

I. MATERIAL, EQUIPAMENTO E REAGENTES	
Reagentes	Material/Equipamento
AgNO_3	Balões volumétricos
$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Goblés
β -D-Glucose	Pipetas e micropipeta
Amido	Placa de agitação magnética
Água desionizada	Banho termostaticado
NaOH	Espectrofotómetro UV-Vis
	Zetasizer
	Medidor de pH

II. Lavagem e preparação do material e equipamento	tempo estimado ~3h
--	--------------------

III. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	tempo estimado ~1h
- 100 mL de Amido (0,20% peso) - 5 mL de β -D-Glucose (0,2M) - 5 mL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,1M) - 5 mL de NaOH (1M) - 5 mL de AgNO_3 (0,1M)	
Nota: antes da utilização das soluções proceder a uma purga com azoto	

IV. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE Ag	tempo estimado ~3h
1. Mistura e dissolução completa de 200 μ L AgNO ₃ (0,1M) e 12mL de amido (0,20% peso)	
2. Sob agitação adicionar 300 μ L de β -D-Glucose (0,2M)	
3. Aquecer a mistura a 60°C durante 3h (ou até a alteração da cor da solução) num banho termostaticado	
4. Estudo da dinâmica da formação das NPAg com um Espectrofotómetro UV/Vis	
5. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer	

V. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE Au	tempo estimado ~2h
<p>6. 80μL HAuCl₄3H₂O (0,1M) 120μL β-D-Glucose (0,2M)</p> <p>30μL NaOH (1M)</p> <p>4 mL AMIDO (0,20% peso)</p>	
7. Controlo do pH	
8. Estudo da dinâmica da formação das NPAg com um Espectrofotómetro UV/Vis	
9. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer	

VI. PREPARAÇÃO DAS NP núcleo-concha Ag-Au	tempo estimado ~2h
<p>10. As NP serão preparadas de duas formas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Através da mistura das soluções coloidais de Ag e Au com vários raios Ag-Au (1:2, 1:1 e 2:1); - Através da mistura da solução de H₂AuCl₄·3H₂O (0,1M) à solução de prata coloidal. 	
11. Estudo da dinâmica da formação das NP com um Espectrofotômetro UV/Vis	
12. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer	

Tabela de dados químicos

	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Tfusão (°C)	Frases R/S
Ácido cloroáurico tri-hidratado	16961-25-4	H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O	393,83			R 22 e 34 S 26, 36/37/39 e 45
β-D Glucose	492-61-5	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,10	1,54	150	-
Nitrato de prata	7761-88-8	AgNO ₃	169,88	4,352	212	R8,R34, R50/53 (S1/2), S26, S45, S60, S61
Amido	9005-25-8	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n		1,5	A 200°C decompõe-se	-
Hidróxido de sódio	1310-73-2	NaOH	39,99	2,13	322	R35,36 e 38 S1/2, 26, 36, 37, 39 e 45

Artigos de referência:

1. Raveendran, P., J. Fu, and S.L. Wallen, Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125,13940-13941;
2. Raveendran, P., J. Fu, and S.L. Wallen, A simple and "green" method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles, *Green Chem.*, **2006**, 8, 34-38.

OBJECTIVO: preparação de NP núcleo-concha Au-Ag e Ag-Au utilizando procedimentos já testados, para envio para Microscopia Eletrônica de Transmissão (*TEM*). Caracterização das soluções coloidais por espectroscopia UV-Vis e Dispersão Dinâmica de Luz (*DLS*).

Tempo estimado: 2 dias

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

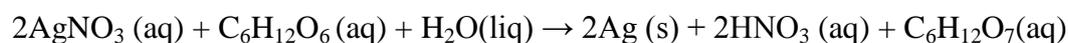
MATERIAL, EQUIPAMENTO E REAGENTES	
Reagentes	Material/Equipamento
AgNO ₃	Balões volumétricos
NaBH ₄	Balões de fundo redondo
Amido	Goblés
β-D-Glucose	Banho de gelo
HAuCl ₄ .3H ₂ O	Pipetas e micropipeta
NaOH	Placa de aquecimento e de agitação magnética
Água desionizada	Espectrofotômetro UV-Vis
	Zetasizer

I. Lavagem e preparação do material e equipamento

II. Preparação de **nanopartículas de prata** por redução de nitrato de prata usando como agente redutor o borohidreto de sódio segundo a reacção: $\text{AgNO}_3 + \text{NaBH}_4 \rightarrow \text{Ag} + 1/2 \text{H}_2 + 1/2 \text{B}_2\text{H}_6 + \text{NaNO}_3$

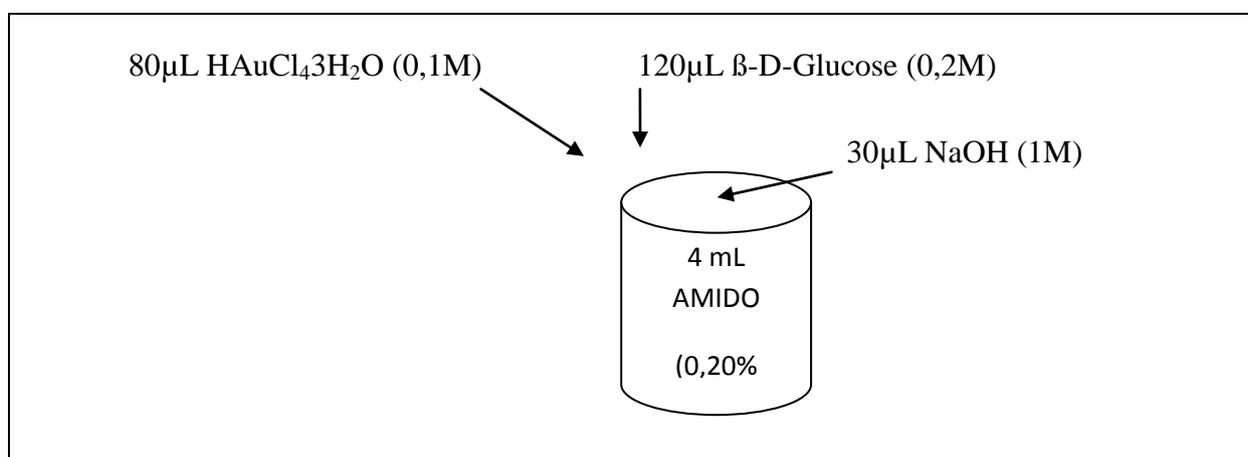
1. Preparação da solução 1,0 mM de AgNO ₃ (Volume água = 10 ml)
2. Preparação da solução 2,0 mM de NaBH ₄ (Volume água = 50 ml)
3. Arrefecimento da solução 2. num banho de gelo
4. Adição da solução 1. a 30mL da solução 2. sob agitação a 700 rpm numa placa de agitação magnética

III. Síntese de **nanopartículas de prata** na presença do agente redutor β -D(+) glucose, de acordo com a seguinte reacção de oxidação-redução:



1. Mistura e dissolução completa de 200 μ L AgNO_3 (0,1M) e 12mL de amido (0,20% peso)
2. Adição de 300 μ L de β -D-Glucose (0,1M)
3. Aquecimento da mistura a 90°C durante 1h (ou até à alteração da cor da solução) numa placa de aquecimento

IV. Síntese de **nanopartículas de ouro** (2º Procedimento Experimental)



V. Síntese de **nanopartículas núcleo-concha Au-Ag** (2º Procedimento Experimental)

As NP serão preparadas usando o procedimento anterior (IV), partindo de diferentes rácios molares Au-Ag (0:1, 0,25:0,75, 0,5:0,5, 0,75:0,25 e 1:0)

VI. Síntese de **nanopartículas núcleo-concha Ag-Au** (3º Procedimento Experimental)

As NP serão preparadas de duas formas:

- Através da mistura das soluções coloidais de Ag e Au com vários raios Ag-Au (1:2, 1:1 e 2:1);
- Através da mistura de 200 µL da solução de HAuCl₄·3H₂O (0,1M) a 3mL da solução de prata coloidal.

VII. Estudo da dinâmica da formação das NPAg com um Espectrofotômetro UV/Vis

VIII. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer

Tabela de dados químicos

	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Tfusão (°C)	Frases R/S
Ácido cloroáurico tri-hidratado	16961-25-4	HAuCl ₄ ·3H ₂ O	393,83			R 22 e 34 S 26, 36/37/39 e 45
Amido	9005-25-8	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n		1,5	A 200°C decompõe-se	-
β-D Glucose	492-61-5	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,10	1,54	150	-
Borohidreto de sódio	16940-66-2	NaBH ₄	37,83	1,074	400	-
Hidróxido de sódio	1310-73-2	NaOH	39,99	2,13	322	R35,36 e 38 S1/2, 26, 36, 37, 39 e 45
Nitrato de prata	7761-88-8	AgNO ₃	169,88	4,352	212	R8,R34, R50/53 (S1/2), S26, S45, S60, S61

Artigos de referência: 1. S. D. Solomon, M.B., A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, C. Boritz, *Synthesis and Study of Silver Nanoparticles J. Chem. Edu.*, **2007**, 84, 322-325.

2. P. Raveendran, J.F., S. L. Wallen, *Completely "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 13940-13941.

3. P. Raveendran, J.F., S. L. Wallen *A simple and "green" method for the synthesis of Au, Ag, and Au-Ag alloy nanoparticles. Green Chemistry*, **2006**, 8, 34-38.

5º Procedimento Experimental (Dezembro 2011) - Síntese e caracterização de nanopartículas ligadas de Ag e Au

OBJECTIVO: preparação de NP's de Ag e recobrimento com Au e de NP's de Au e recobrimento com Ag. Serão utilizados procedimentos testados anteriormente. As NP's preparadas serão analisadas por espectroscopia de UV-Vis e por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - Tempo estimado: 2 dias

I. Lavagem e preparação do material e equipamento

Tabela 1 – Lista de material, equipamento e reagentes

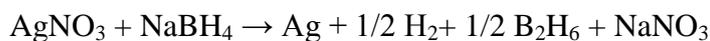
Reagentes	Material/Equipamento
AgNO ₃	Balões volumétricos
NaBH ₄	Erlenmeyer
Amido	Goblés
β-D-Glucose	Banho de gelo
HAuCl ₄ .3H ₂ O	Pipetas e micropipeta
NaOH	Placa de agitação magnética
Água desionizada	Medidor de pH
	Espectrofotômetro UV-Vis
	Zetasizer

II. Preparação das soluções

Tabela 2 – Cálculos para a preparação das soluções

Reagente	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Concentração [n/V] (mol/L)	Volume de solução(L)	Massa (g)	Pesei (g)
Ácido cloroáurico tri-hidratado	HAuCl ₄ .3H ₂ O	393,83	0,10	0,0050	0,1969	
Amido	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	0,2	0,2% peso	0,0100	0,0200	
Borohidreto de sódio	NaBH ₄	37,83	0,002	0,0500	0,0038	
β-D Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,1	0,2	0,0050	0,1801	
Hidróxido de sódio	NaOH	39,99	1,0000	0,0050	0,2000	
Nitrato de prata	AgNO ₃	169,88	0,001	0,0100	0,0017	
			0,1	0,0050	0,0849	

III. SÍNTESE DE **NANOPARTÍCULAS DE PRATA** por redução de nitrato de prata usando como agente redutor o borohidreto de sódio segundo a reação:



1. Preparação de uma solução 1,0 mM de AgNO₃ (Volume = 10 mL)
2. Preparação de uma solução 2,0 mM de NaBH₄ (Volume = 50 mL)
3. Arrefecimento da solução 2. num banho de gelo
4. Adição gota a gota da solução 1. a 30mL da solução 2. sob agitação a 700 rpm numa placa de agitação magnética
5. Verificação: pH..... Cor da solução.....
6. Estudo da dinâmica da formação das NP's com um Espectrofotómetro UV/Vis:

t (min)	Pico máximo		Observações
	λ (nm)	Absorvância	

7. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer:

Amostra	Dia	z-Average size (φ nm)	PDI	Comentário
NP Ag				
NP Ag				
NP Ag				

Tabela 3 - Concentração de prata e agente redutor						
	Massa molar (g/mol)	Concentração inicial (mol/dm ³)	Volume (dm ³)	n	massa (g)	Concentração final (mol/dm ³)
NaBH ₄	37,83	2,00E-03	3,00E-02	6,00E-05	2,27E-03	1,50E-03
Ag	107,86	1,00E-03	1,00E-02	1,00E-05	1,08E-03	2,50E-04
TOTAL			0,0400	RAZÃO		6,00

IV. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA-OURO por redução de átomos de ouro sobre a prata coloidal preparada em III. O agente redutor do ouro será a β -D-Glucose.

8. Preparação de uma solução 0,2% peso de amido (Volume = 10 mL)
9. Preparação de uma solução 0,2M de β -D-Glucose (Volume = 5 mL)
10. Preparação de uma solução 0,1M de H₂HAuCl₄·3H₂O (Volume = 5 mL)
11. Preparação de uma solução 1M de NaOH (Volume = 5 mL)
12. Mistura de 80 μ L da solução de H₂HAuCl₄·3H₂O (0,1M) a 3mL da solução de prata coloidal
13. Verificação: pH..... Cor da solução.....
14. Estudo da dinâmica da formação das NP com um Espectrofotômetro UV/Vis:

t (min)	Pico máximo		Observações
	λ (nm)	Absorvância	

15. Caso não se observe o pico máximo característico do ouro ($\lambda \sim 500$ nm) adicionar 120 μ L da solução de β -D-Glucose (0,2M) e 1mL amido (0,20% peso) à mistura 12., cc seguir para o 19.

16. Verificação: pH..... Cor da solução.....

17. Eventual ajuste de pH através da adição de 15 a 30 μL da solução de NaOH

18. Estudo da dinâmica da formação das NP com um Espectrofotômetro UV/Vis:

t (min)	Pico máximo		Observações
	λ (nm)	Absorvância	

19. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer:

Amostra	Dia	z-Average size (ϕ nm)	PDI	Comentário
NP Ag-Au				
NP Ag-Au				
NP Ag-Au				

	Massa molar (g/mol)	Concentração inicial (mol/dm ³)	Volume (dm ³)	n (mol)	massa (g)	Concentração final (mol/dm ³)
Au	196,96	1,00E-01	8,00E-05	8,00E-06	1,58E-03	2,60E-03
Ag	107,86	2,50E-04	3,00E-03	7,50E-07	8,09E-05	2,44E-04
		TOTAL	0,0031		RAZÃO	10,67

V. **SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO** por redução do ácido cloroáurico tri-hidratado usando como agente redutor a β -D-Glucose.

20. Preparação de uma solução 0,1M de $\text{HAuCl}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Volume = 5 mL)

21. Preparação de uma solução 1M de NaOH (Volume = 5 mL)

22. Preparação de uma solução 0,2% peso de amido (Volume = 10 mL)

23. Preparação de uma solução 0,2M de β -D-Glucose (Volume = 5 mL)

24. Mistura de 80 μ L de $\text{HAuCl}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,1M), 4 mL amido (0,20% peso), 120 μ L β -D-Glucose (0,2M) e 30 μ L NaOH (1M)

25. Verificação: pH..... Cor da solução.....

26. Estudo da dinâmica da formação das NP com um Espectrofotômetro UV/Vis:

t (min)	Pico máximo		Observações
	λ (nm)	Absorvância	

27. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer:

Amostra	Dia	z-Average size (ϕ nm)	PDI	Comentário
NP Au				
NP Au				
NP Au				

VI. **SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO-PRATA** por redução de átomos de prata à superfície das NP's de ouro preparadas em V. O agente redutor do nitrato de prata será a β -D-Glucose (0,2M) e será efectuado um aquecimento da mistura para aumentar a taxa de redução dos iões de prata.

28. Preparação de uma solução 0,1M de AgNO_3 (Volume = 5 ml)

29. Mistura de 100 μL da solução de AgNO_3 (0,1M), 150 μL β -D-Glucose (0,2M), 3mL amido (0,20% peso) a 3mL da solução de ouro coloidal e aquecer a mistura durante 1min no microondas.

30. Verificação: pH..... Cor da solução.....

31. Estudo da dinâmica da formação das NP's com um Espectrofotómetro UV/Vis:

t (min)	Pico máximo		Observações
	λ (nm)	Absorvância	

32. Determinação da distribuição de tamanhos através do Zetasizer:

Amostra	Dia	z-Average size (ϕ nm)	PDI	Comentário
NP Au-Ag				
NP Au-Ag				
NP Au-Ag				

Tabela 5 - Dados químicos						
Reagente	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Tfusão (°C)	Frases R/S
Ácido cloroáurico tri-hidratado	16961-25-4	HAuCl ₄ .3H ₂ O	393,83			R22 e 34 S 26, 36/37/39 e 45
Amido	9005-25-8	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n		1,50	A 200°C decompõe-se	-
Borohidreto de sódio	16940-66-2	NaBH ₄	37,83	1,074	400	-
β-D Glucose	492-61-5	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,10	1,54	150	-
Hidróxido de sódio	1310-73-2	NaOH	39,99	2,13	322	R35, 36 e 38 S1/2, 26, 36, 37, 39 e 45
Nitrato de prata	7761-88-8	AgNO ₃	169,88	4,35	212	R8,R34, R50/53 (S1/2), S26, S45, S60, S61

Artigos de referência:

1. S. D. Solomon, M.B., A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, C. Boritz, Synthesis and Study of Silver Nanoparticles, *J. Chem. Edu.*, **2007**, 84,322-325.
2. J. Liu, G. Qin, P. Raveendran, Y. Ikushima, Facile “Green” Synthesis, Characterization, and Catalytic Function of β-D-Glucose-Stabilized Au Nanocrystals, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 2131-2138.
3. P. Raveendran, J. Fu, S. L. Wallen, A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles, *Green Chemi*, **2006**, 8, 34-38.
4. P. Raveendran, J.Fu, S. L. Wallen, Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125,13940-13941.

6º Procedimento Experimental (Fevereiro 2012) - Síntese e caracterização de nanopartículas de Fe₃O₄

OBJECTIVO: preparação de NP de Fe₃O₄. As NP preparadas serão analisadas por UV-Vis, DLS, Difração de Raio-X, TEM e EDX.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - Tempo estimado: 1 dia**I. Lavagem e preparação do material e equipamento**

Tabela 1 – Lista de material, equipamento e reagentes	
Reagentes	Material/Equipamento
FeCl ₂ ·4H ₂ O	5 balões volumétricos de 5 mL e 2 balões volumétricos de 250 mL de 2 tubuladuras
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Goblés
HCl	Pipetas e micropipetas
NH ₄ OH	Medidor de pH
NaOH	Espetrofotómetro UV-Vis
β-D Glucose	Zetasizer
Água desoxigenada	

II. Preparação das soluções aquosas

Tabela 2 - Cálculos para a preparação das soluções									
Reagente	Massa molar (g/mol)	[n/V] (mol/L)	Volume (L)	Massa (g)	[] % p/p	ρ (g/cm³)	V_{[]%} (mL)	V_{100%} (mL)	V_{água} (mL)
Ácido clorídrico (37%)	36,46	2	0,0050	0,3646	37	1,1800	0,308983	0,84	4,16
Hidróxido de amónio (25%)	17,03	0,70	0,1000	1,1921	25	0,9100	1,31	5,24	94,76
Cloreto de ferro (II)	198,81	2,00	0,0050	0,1981					
Cloreto de ferro (III)	270,30	1,00	0,0050	1,3515					
β-D Glucose	180,10	0,4	0,0050	0,3602					
Hidróxido de sódio	40,00	2,00	0,0050	0,4000					

III. Preparação das NP de Fe₃O₄

Antes de iniciar a síntese desoxigenar 250mL de água sob fluxo de azoto. Sob atmosfera de azoto adiciona-se 5 mL de FeCl₃·6H₂O a 1,25 mL de FeCl₂·4H₂O dissolvido em HCl. Imediatamente após a mistura adiciona-se lentamente 62,5 mL de NH₄OH também sob fluxo de azoto. A mistura é vigorosamente (1200rpm) agitada durante 30 min. Verifica-se o pH e usando NaOH ajusta-se o pH a 10.

Tabela 3 - Dados químicos						
Reagente	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Tfusão (°C)	Frases R/S
Ácido clorídrico (37%)	7647-01-0	HCl	36,46	1,180	-114,8	R35, 36, 37 e 38 S 1/2, 9, 23, 26, 36/37/39, 45 e 60
β-D Glucose	492-61-5	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,10	1,54	150	-
Hidróxido de amónio (25%)	1336-21-6	NH ₄ OH	35,04	0,91		R 34 e 50, S 1/2, 26, 36/37/39, 45 e 61
Cloreto de ferro (III) (Cloreto férrico) hexa hidratado	7705-08-0	FeCl ₃ ·6H ₂ O	162,20	2,898	306	R22 e 34, S 26 e 28
Cloreto de ferro (II) (Cloreto ferroso) tetra hidratado	7758-94-3	FeCl ₂ ·4H ₂ O	126,75	3,130	674	R 22, 38 e 41, S 26 e 39
Hidróxido de sódio	1310-73-2	NaOH	39,99	2,130	322	R35, 36 e 38 S1/2, 26, 36, 37, 39 e 45

Artigos de referência:

1. Khan F.-A., S.-F.G., Superparamagnetic Core-Shell-Type Fe₃O₄/Ru Nanoparticles as Catalysts for the Selective Hydrogenation of an Unconstrained α,β-Unsaturated Ketone, *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2012**, 727-732.
2. Rossi L. M., V.L.L.R., Silva F. P., Kiyohara P. K., Duarte E. L., Matos J. R., A magnetically recoverable scavenger for palladium based on thiol-modified magnetite nanoparticles, *Applied Catalysis A: General*, **2007**, 330, 139-144.
3. Massart R., Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media, *IEEE Trans. Magn.*, **1981**, 17, 1247-1248.
4. Wang L., P.H.-Y., Lim S. I. I., Schadt M. J., Mott D., Luo J., Wang X., Zhong C.-J., Core@shell nanomaterials: gold-coated magnetic oxide nanoparticles, *J. Mater. Chem.*, **2008**, 18, 2629-2635.
5. Wang L., L.J., Fan Q., Suzuki M., Suzuki I. S., Engelhard M. H., Lin Y., Kim N., Wang J. Q., Zhong C.-J., Monodispersed Core-Shell Fe₃O₄@Au Nanoparticles, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 21593-21601.
6. Xu Z., H.Y., Sun S., Magnetic Core/Shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag Nanoparticles with Tunable Plasmonic Properties, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 8698-8699.

7º Procedimento Experimental (Março 2012) - Síntese e caracterização de nanopartículas de Fe₃O₄ - Au

OBJECTIVO: preparação de NP com uma estrutura núcleo-concha de Fe₃O₄- Au. As NP preparadas serão analisadas por UV-Vis, Difração de Raio-X, TEM e EDX.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - Tempo estimado: 4 horas

I. Lavagem e preparação do material e equipamento

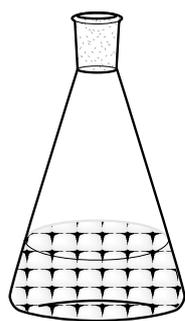
Tabela 1 – Lista de material, equipamento e reagentes	
Reagentes	Material/Equipamento
H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O	Balão volumétrico de 2 tubuladuras (250mL)
NP de Fe ₃ O ₄	Balão volumétrico (5mL)
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	Proveta (15mL)
Água desionizada	Placa de aquecimento com agitação
	Espectrofotômetro UV-Vis

II. Preparação das soluções aquosas

Tabela 2 - Cálculos para a preparação das soluções						
Reagente	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	[m/V] (mg/cm³)	[n/V] (mol/L)	Volume (L)	Massa (g)
Ácido cloroáurico tri-hidratado	H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O	393,83	2		0,0150	0,0300
		393,83	3		0,0150	0,0450
Citrato de sódio	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	294,1		0,08	0,005	0,1176

III. Síntese das NP's Fe₃O₄- Au

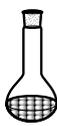
- ❖ Repetir o procedimento para diferentes concentrações do sal de ouro.



1. 105mL H₂O
desionizada



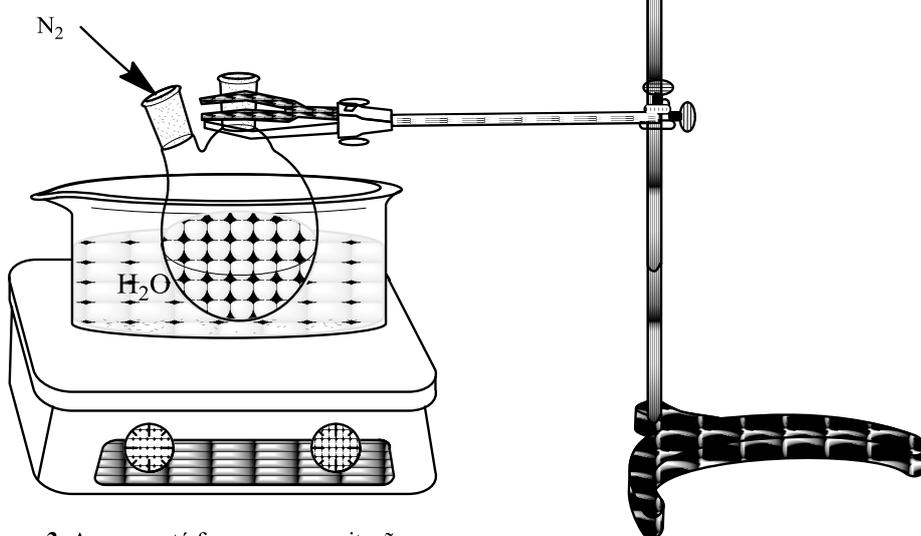
2. 15mL 2mg/cm³
HAuCl₄·3H₂O



4. 5mL NP FeO



5. 5mL 80 mmol/dm³
C₆H₅Na₃O₇·2H₂O



3. Aquecer até fervura com agitação

Artigo de referência:

⇒ Lo, C.K., D. Xiao, and M.M.F. Choi, Homocysteine-protected gold-coated magnetic nanoparticles: synthesis and characterisation, *Journal of Materials Chemistry*, **2007**, 17, 2418.

8º Procedimento Experimental (Março 2012) - Síntese e caracterização de nanopartículas de Ag, Au, Ag – Au e Au-Ag

OBJECTIVO: preparação de NP de Ag, Au e núcleo-concha Ag-Au e Au-Ag. As NP preparadas serão analisadas por UV-Vis e DLS.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - Tempo estimado: 1 dia**I. Lavagem e preparação do material e equipamento**

Tabela 1 – Lista de material, equipamento e reagentes	
Reagentes	Material/Equipamento
HAuCl ₄ ·3H ₂ O	Balões volumétricos de 5 mL
AgNO ₃	Balões de fundo Redondo
Beta-cyclodextrin (β-CD)	Pipetas
NaOH	Placa de aquecimento e agitação
Água ultra pura	Medidor de pH
	Espectrofotômetro UV-Vis
	Zetasizer

II. Preparação das soluções aquosas

Tabela 2 - Cálculos para a preparação das soluções					
Reagente	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	[n/V] (mol/L)	Volume (L)	Massa (g)
Ácido cloroáurico tri-hidratado	HAuCl ₄ ·3H ₂ O	393,83	0,01	0,0050	0,0197
Beta-cyclodextrin (β-CD)	(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₇	1134,98			0,0792
Hidróxido de sódio	NaOH	40,00	1,00	0,0050	0,2000
Nitrato de prata	AgNO ₃	169,87	0,01	0,005	0,0085

III. Síntese dos coloides monometálicos de ouro e prata

As NP serão preparadas através da dissolução, seguida de agitação, de 0,0792g de Beta-cyclodextrin (β -CD) em 9,86mL de água. Seguidamente é feita a adição de 40 μ L da solução do sal metálico H₂AuCl₄ (10 mM) e AgNO₃ (10 mM) e mede-se o pH. Passados 2 min. adiciona-se 100 μ L de NaOH (1,0 M) às soluções para que o pH suba para 10-12. Finalmente, as misturas reacionais são bem agitadas e aquecidas em banho-maria. A formação das NP metálicas é confirmada através da alteração da cor das soluções. É expectável que passados cerca de 10 min, a solução de ouro fique cor de rosa-salmão e a de prata amarela.

Faz-se a análise UV-Vis e DLS à prata e ao ouro coloidal preparados.

IV. Síntese de NP bimetálicas núcleo-concha de Au-Ag e Ag-Au

Para a síntese de NP núcleo-concha Au-Ag adiciona-se gota a gota 40 μ L de AgNO₃ (10 mM) a 5 mL da solução de ouro coloidal preparada em III deixando-se repousar durante 5 min. e aquecendo seguidamente em banho-maria durante cerca de 10min. A formação das NP Au-Ag será confirmada pela alteração da cor da solução que deverá passar de rosa/salmão a alaranjado. Para a síntese de NP Ag-Au adiciona-se, sob agitação vigorosa, gota a gota 40 μ L H₂AuCl₄ (10 mM) a 5 mL da solução de prata coloidal preparada em III. No decorrer da reação o amarelo da prata coloidal passa a rosa (em cerca de 10min.) o que é indicativo da formação de NP Ag-Au.

Faz-se a análise UV-Vis e DLS às amostras de Au-Ag e Ag-Au.

Tabela 3 - Dados químicos						
Reagente	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Tfusão (°C)	Frases R/S
Ácido cloroáurico tri-hidratado	16961-25-4	H ₂ AuCl ₄ .3H ₂ O	393,83	3,900		R22 e 34 S 26, 36/37/39 e 45
Hidróxido de sódio	1310-73-2	NaOH	39,99	2,130	322	R35, 36 e 38 S1/2, 26, 36, 37, 39 e 45
Nitrato de prata	7761-88-8	AgNO ₃	169,88	4,35	212	R8,R34, R50/53 (S1/2), S26, S45, S60, S61

Artigo de referência: Pande S., G.S.K., Praharaj S., Panigrahi S., Basu S., Jana S., Pal A., Tsukuda T., Pal T., Synthesis of Normal and Inverted Gold-Silver Core-Shell Architectures in β -Cyclodextrin and Their Applications in SERS, *J. Phys. Chem.*, **2007**, *111*, 10806-10813.

9º Procedimento Experimental /variação sobre o 6º e o 7º (Maio 2012) - Síntese e caracterização de nanopartículas de Fe₃O₄-Au

OBJECTIVO: preparação de NP de Fe₃O₄ em solução acídica. Revestimento com ouro. Caracterização UV-Vis e DLS.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - Tempo estimado: 1 dia

I. Lavagem e preparação do material e equipamento

Tabela 1 – Lista de material, equipamento e reagentes

Reagentes	Material/Equipamento
FeCl ₂ ·4H ₂ O	2 balões volumétricos de 50mL, 3 balões volumétricos de 5 mL e 3 balões volumétricos de 250 mL de 2 tubuladuras
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2 Goblés 25mL ou 50mL e 2 de 100mL
HCl	Proveta de 15mL
NH ₄ OH	Adaptador de termómetro e pipeta de Pasteur
HClO ₄	Pipetas de 5mL, 1mL, 50mL
HAuCl ₄ ·3H ₂ O	Íman
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	Placa de agitação magnética (com aquecimento)
Água ultra pura	Espectrofotómetro UV-Vis
	Zetasizer

II. Preparação das NP's de Fe₃O₄

- Preparação das soluções aquosas
- Desoxigenar 250mL de água sob fluxo de azoto.

Tabela 2 - Cálculos para a preparação das soluções

Reagente	Massa molar (g/mol)	[n/V] (mol/L)	Volume (L)	Massa (g)	[] % p/p	ρ (g/cm ³)	V _{[]%} (mL)	V _{100%} (mL)	V _{água} (mL)
Ácido clorídrico (37%)	36,46	2	0,0050	0,3646	37	1,1800	0,308983	0,84	4,16
Ácido perclórico (60%)	100,46	2,00	0,0500	10,0460	60	1,5300	6,566013	10,94	39,06
Hidróxido de amónio (25%)	35,04	0,70	0,0500	1,2264	25	0,9100	1,347692	5,39	44,61
Cloreto de ferro (II) ou cloreto ferroso	198,81	2,00	0,0050	1,9881					
Cloreto de ferro (III) ou cloreto férrico	270,30	1,00	0,0050	1,3515					

- Numa placa de agitação magnética e sob atmosfera de azoto adiciona-se 4mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1mol/dm^3) a 1mL de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2mol/dm^3) dissolvido em HCl (2mol/dm^3);
- Imediatamente após a mistura adiciona-se lentamente 50mL de NH_4OH ($0,7\text{mol/dm}^3$) também sob fluxo de azoto (trabalhar na hote);
- A mistura é vigorosamente (1200rpm) agitada durante 30 min;
- O precipitado é isolado por decantação magnética;
- Agita-se o precipitado com 50mL HClO_4 (2mol/dm^3);
- Isola-se por centrifugação;
- Finalmente o resíduo é misturado em 50mL de água desoxigenada.

III. Preparação das NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$

- Preparação das soluções com água desoxigenada

Tabela 3 - Cálculos para a preparação das soluções						
Reagente	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	[m/V] (mg/cm^3)	[n/V] (mol/L)	Volume (L)	Massa (g)
Ácido cloroáurico tri-hidratado	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	393,83	2		0,0150	0,0300
		393,83	3		0,0150	0,0450
Citrato tri-sódico dihidratado	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	294,1		0,08	0,005	0,1176

- Sobre uma placa de agitação magnética (com aquecimento) e sob fluxo de azoto, medem-se 105mL de água desoxigenada;
- Adicionam-se 15mL de uma solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2mg/cm^3);
- Aquece-se a mistura até à ebulição (em banho maria);
- Adiciona-se 5mL das NP's de Fe_3O_4 preparadas em **II.**;
- Sob agitação adiciona-se 5mL de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (80mmol/dm^3) – a cor da solução passa de castanho a bordeaux;
- A mistura reacional é aquecida até à fervura sob agitação durante 5 min.

❖ Repetir o procedimento para as duas concentrações de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

IV. Medições UV-Vis e DLS.

Tabela de Dados químicos					
Reagente	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Frases R/S
Ácido clorídrico (37%)	7647-01-0	HCl	36,46	1,180	R35, 36, 37 e 38 S 1/2, 9, 23, 26, 36/37/39, 45 e 60
Ácido cloroáurico tri-hidratado	16961-25-4	HAuCl ₄ .3H ₂ O	393,83	3,900	R22 e 34 S 26, 36/37/39 e 45
Citrato tri-sódico dihidratado	006132-04-3	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	294,10	1,70	Irritante
Ácido perclórico	7601-90-3	HClO ₄	100,46	1,53	R5, R8, R35 e S1/2, S23, S26, S36, S45
Hidróxido de amônio (25%)	1336-21-6	NH ₄ OH	35,04	0,910	R34, 50, S 1/2, 26, 36/37/39, 45 e 61
Cloreto de ferro (III) (Cloreto férrico)	7705-08-0	FeCl ₃	162,20	2,898	R22 e 34, S 26 e 28
Cloreto de ferro (II) (Cloreto ferroso)	7758-94-3	FeCl ₂	126,75	3,130	R 22, 38 e 41, S 26 e 39

Artigos de referência:

1. Lo C. K., X.D., Choi M. M. F., *Homocysteine-protected gold-coated magnetic nanoparticles: synthesis and characterisatio*, *Journal of Materials Chemistry*, **2007**, *17*, 2418-2427.
2. R., M., *Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media*, *IEEE Trans. Magn.*, **1981**, *17*, 1247–1248.

10º Procedimento Experimental (Junho 2012) - Síntese e caracterização de nanopartículas de Fe₃O₄-Ag e Fe₃O₄-Au

OBJECTIVO: revestimento de magnetite com prata para posterior análise eletroquímica. A deposição da Ag será feita através da redução de AgNO₃ usando ácido ascórbico. Depois de preparadas as NP de Fe₃O₄-Ag serão caracterizadas por UV-Vis e DLS. Será também testado outro método para a síntese de magnetite, magnetite-ouro e magnetite-prata.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - Tempo estimado: 1 dia

I. Lavagem e preparação do material e equipamento

Tabela 1 – Lista de material, equipamento e reagentes	
Reagentes	Material/Equipamento
FeCl ₂ ·4H ₂ O	4 balões volumétricos de 5mL, 3 balões volumétricos de 10mL, 1 balão volumétrico de 100 mL, 2 balões de 100mL com 2 tubuladuras e 1 balão de 250mL com 2 tubuladuras
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3 Goblés 25mL ou 50mL e 2 de 100mL
HCl	Quitazato
Ácido ascórbico	Micropipetas e pipetas de Pasteur
Ácido cítrico	Pipetas de 5mL, 3mL (2x) 1mL, 50mL
HAuCl ₄ ·3H ₂ O	Íman
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	Placa de agitação magnética (com aquecimento)
AgNO ₃	Medidor de pH
NaOH	Centrifugadora
Água ultra pura	Espectrofotômetro UV-Vis
	Zetasizer

II. Preparação das soluções

- As soluções são preparadas com água ultra pura

Tabela 2 - Cálculos para a preparação das soluções

Reagente	Massa molar (g/mol)	[n/V] (mol/L)	Volume (L)	Massa (g)	[] % p/p	ρ (g/cm ³)	V _{[]%} (mL)	V _{100%} (mL)	V _{água} (mL)
Ácido ascórbico	176,09	0,001	0,0100	0,0018					
Ácido cítrico	192,123			0,0016					
Ácido clorídrico (37%)	36,46	2	0,0050	0,3646	37	1,1800	0,308983	0,84	4,16
Ácido cloroáurico tri-hidratado	393,83	0,02	0,0050	0,0394					
Citrato trisódico	294,1	0.10	0,005	0,1471					
Citrato trisódico	294,1			0,0008					
Cloreto de ferro (II)	198,81			0,0020					
Cloreto de ferro (III)	270,30			0,0040					
Hidróxido de sódio	40,00	0,01	0,0050	0,0020					
Hidróxido de sódio	40,00	1,50	0,1000	6,0000					
Nitrato de prata	169,88	0,001	0,0100	0,0017					
Nitrato de prata	169,88	0,020	0,0100	0,0340					

III. Deposição de Ag sobre NP Fe₃O₄

- Sob fluxo de azoto e agitação mistura-se 5mL de Fe₃O₄ (anteriormente preparadas e caracterizadas) com 3mL de AgNO₃ (1mM), 3mL de ácido ascórbico (1mM);
- Seguidamente adiciona-se 0,1mL de NaOH (0,01M);
- Fazer a medição UV-vis cerca de 4h depois da síntese. Caso não surja o máximo característico da prata adicionar de novo AgNO₃, ácido ascórbico e NaOH;
- Fazer medições DLS.

IV. Preparação das NP de Fe₃O₄

- Sobre uma placa de agitação magnética e sob fluxo de azoto, misturam-se 4mg de FeCl₃ e 2mg de FeCl₂ dissolvidos em HCl (2M) e adiciona-se 100mL de NaOH (1,5M);
- Agita-se a mistura durante 30 minutos à temperatura ambiente;
- Centrifuga-se a solução e recolhe-se o sobrenadante (de modo a obter NP com uma estreita distribuição de tamanhos);
- Por decantação magnética, com um íman forte, lava-se o sobrenadante 4vezes com água ultra pura;
- Adiciona-se 20mL de uma solução tampão de citrato (1,6mg de ácido cítrico e 0,8mg de citrato tri-sódico) para se ficar com o pH=6,3;
- Finalmente a solução é liofilizada.

V. Preparação das NP de Fe₃O₄-Ag

- Adicionam-se 300μL das NP preparadas em **IV.** a 25mL de água ultra pura a ferver sob agitação;
- Adiciona-se 350μL de AgNO₃ (20mM);
- Adiciona-se 300μL de citrato trisódico (100mM);
- A solução é mantida sob agitação e fervura durante cerca de 15 minutos (até mudar de cor).

VI. Preparação das NP de Fe₃O₄-Au

- Adiciona-se 300μL das NP preparadas em **IV.** a 25mL de água ultra pura a ferver sob agitação;
- Adiciona-se 350μL de HAuCl₄ (20mM);
- Adiciona-se 300μL de citrato trisódico (100mM).
- A solução é mantida sob agitação e fervura durante cerca de 15 minutos (até mudar de cor).

Tabela3 - Dados químicos					
Reagente	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Frases R/S
Ácido ascórbico	50-81-7	C ₆ H ₈ O ₆	176,09	1,65	S24/25
Ácido cítrico	77-92-9	C ₆ H ₈ O ₇	192,123	1,665	-
Ácido clorídrico (37%)	7647-01-0	HCl	36,46	1,180	R35, 36, 37 e 38 S 1/2, 9, 23, 26, 36/37/39, 45 e 60
Ácido cloro áurico tri-hidratado	16961-25-4	HAuCl ₄ .3H ₂ O	393,83	3,900	R22 e 34 S 26, 36/37/39 e 45
Citrato tri-sódico dihidratado	006132-04-3	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	294,10	1,70	Irritante
Cloreto de ferro (III) (Cloreto férrico)	7705-08-0	FeCl ₃	162,20	2,898	R22 e 34, S 26 e 28
Cloreto de ferro (II) (Cloreto ferroso)	7758-94-3	FeCl ₂	126,75	3,130	R 22, 38 e 41, S 26 e 39
Hidróxido de sódio	1310-73-2	NaOH	39,99	2,130	R35, 36 e 38 S1/2, 26, 36, 37, 39 e 45
Nitrato de prata	7761-88-8	AgNO ₃	169,88	4,35	R8,R34, R50/53 (S1/2), S26, S45, S60, S61

Artigos de referência:

1. Xu Z., H.Y., Sun S., *Magnetic Core/Shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag Nanoparticles with Tunable Plasmonic Properties. J. Am. Chem. Soc., 2007. 129: p. 8698-8699.*
2. Banerjee S., R.S.O., Sardar M., Gayathri N., Ghosh B., Dasgupta A., *How Gold nanoparticle acquires magnetism? - Formation of large orbital moment at the interface. arXiv:0912.3319v2, 2010.*

OBJECTIVO: Descongelamento de células animais criopreservadas (da linha celular fibroblástica NIH 3T3), contagem de células, tripsinização e inoculação.

Tempo estimado: 6 dias

Cuidados especiais

1. As culturas celulares são trabalhadas em câmara de fluxo laminar, desinfetada previamente com Lâmpada de UV ~20 minutos (15 luz + 5 arejamento)

Assepsia- desinfetar todo o material que entra e sai da câmara com etanol a 70%

Utilizar luvas

Manipular cuidadosamente as culturas celulares nunca passando as mãos por cima

I. Descongelamento de células criopreservadas

2. Meio de cultura adequado para as células em estudo (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)/ pré-aquecido num banho a ~ 37°C;
3. Preparação de todo o material necessário: *ependorf* (1,5mL), micropipeta (1000µL), pipeta (10mL), *pompete*, 3 caixas de Petri devidamente identificadas: Linha celular, n.º Passagem, e data);
4. Cuidado na manipulação dos *vials* com as células criopreservadas em azoto líquido usando luvas apropriadas. Descongelamento rápido num banho de água a ~ 37°C;
5. Com o auxílio de uma micropipeta retirar as células (1000µL) do vial e depositá-las no *ependorf*;
6. Centrifugar a 2000rpm, durante 8 minutos à temperatura ambiente;
7. Distribuir 10mL de meio de cultura nas caixas de Petri;
8. Após centrifugação retirar o sobrenadante (não tocando no *pellet*);
9. Ressuspender as células com 1mL de meio de cultura completo (com soro e antibiótico) e distribuir (~333µL) nas caixas de Petri;
10. Incubar e esperar que as células adiram ao prato de cultura;
11. Limpar a câmara com etanol.

II. Tripsinização e Inoculação

1. Retirar o meio de cultura da placa contendo células e lavar a cultura com PBS (“phosphate buffer saline solution”), o suficiente para cobrir a placa;
2. Adicionar 1mL da solução de tripsina e deixar atuar durante 10 minutos (colocar a placa na estufa);
3. Observar a placa ao microscópio para ver se as células se soltaram;
4. Adicionar 2mL de meio stop (DMEM com soro e antibiótico);
5. Homogeneizar a suspensão (desagregar) enchendo a *pompete* e arrastando-a ao longo da caixa de Petri;
6. Proceder à contagem celular retirando 20µL para a Câmara de *Neubauer* ou hemocitómetro:

$$\underline{\quad} + \underline{\quad} + \underline{\quad} + \underline{\quad} = \underline{\quad} : 4 = \underline{\quad} \quad (\text{Média})$$

$$\text{Média} \quad * \quad 10^4 = \underline{\quad} \quad \text{Células /mL (Densidade celular)}$$

$$\text{Densidade celular} \quad * \quad \underline{\quad} \quad (\text{V meio}) = \underline{\quad} \quad \text{Células/placa}$$

Referências:

- <http://www.google.com/url?sa=t&rc=t=j&q=thaw+cells&source=web&cd=5&ved=0CGcQtwIwBA&url=http%3A%2F%2Fwww.youtube.com%2Fwatch%3Fv%3DCCWrLUA6Qbg&ei=wzwFUKWrDsKXhQfUuI3mBw&usg=AFQjCNEaL611Os4841Nwz5azsIYWpooKwg>
- Professora Doutora Helena Tomás, Cultura de Células Animais/ Viabilidade Celular na presença de etanol, Técnicas de Caracterização Celular e Molecular, 1º ciclo - bioquímica - 2009/2010, Aula prática nº1
- <http://www.millipore.com/cellbiology/cb3/cellfreezingthawingprotocol>
- Freshney R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, John Wiley & Sons, Inc., 2005.

12º Procedimento Experimental (Julho/Agosto 2012) - Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas de Ag, Au., Ag/Au e Fe₃O₄/Au

OBJECTIVO: Exposição das células NIH 3T3 (fibroblastos de rato) às NP e estudo da viabilidade celular através do “Teste de MTT”. Teste quantitativo que avalia a atividade metabólica das células e que pode ser usado como uma medida da viabilidade celular. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (amarelo) é adicionado à cultura celular e reduzido a um produto púrpura apenas pelas células viáveis (nas mitocôndrias). A quantidade de produto presente (a dosear por medição da intensidade de radiação absorvida a 550nm) será proporcional ao número de células viáveis.

Tempo estimado: 4 dias

I. Semear as células em placas de 96 poços (concentração= 1×10^4 células/cm²).

$$\text{Área (A) poço} = 0,33\text{cm}^2 * 10^4 = 3300 \text{ células/poço}$$

n.º de poços 288 (96*3)	*	n.º células/poço 3300	=	950 400	Densidade dos poços, n.º células que queremos
----------------------------	---	--------------------------	---	---------	---

Volume de suspensão = 950 400 Densidade dos poços Densidade celular
 _____ (queremos) / _____ (temos)

II. Exposição das células às NP

1. Preparar as soluções a testar: DMEM e DMEM + PBS (para o controlo) e soluções com as NP às diferentes concentrações.
2. Após as 24h, retirar o meio de cultura das células e adicionar a cada poço 150 µL de meio de cultura + 50µL de amostra+PBS de acordo com as condições da tabela. Para referência, serão preparados poços apenas com meio (200 µL) e poços com meio e PBS (100 µL de cada).

Tabela - Condições experimentais usadas nos testes <i>in vitro</i>				
Amostra/NP	Diâmetro médio (nm)		Potencial zeta (mV)	Concentração
	TEM	DLS		
CM-02-11-Fe ₃ O ₄ /Au	-	10	-37,4±9,27	Para cada amostra foram testadas duas concentrações: 1mM e 0,1mM
CM-01-47-Au	20	50	-26,9±18,5	
CM-01-73-Ag	12	2	-34,5±13,9	
CM-01-81-Ag/Au	20	80	-22,8±19,1	

III. Teste de redução do MTT

Após 3 dias (cerca de 72 h), fazer o teste de viabilidade do MTT (neste teste, usa-se o DMSO como branco). Antes de se proceder ao teste fazer registo fotográfico das amostras.

1. Com a luz da câmara desligada, prepara-se a solução a 10% de MTT (numa solução a 5mg/mL preparado em PBS) e DMEM;
2. Retiram-se as placas da incubadora e aspira-se o meio de cultura em cada poço;
3. Adiciona-se 100µl da solução preparada em 1. a cada poço e colocam-se as placas na estufa a 37°C, 5% CO₂;
4. Passadas cerca de 3h, remove-se a solução e adiciona-se 100 µL de DMSO a cada poço. Lê-se a absorção a 550nm.

Referências: Freshney R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, John Wiley & Sons, Inc., **2005**.

Anexo III - Resumo das características das NP preparadas

NP	n.º Proc. Exp.	Método de Síntese	Caracterização							
			Cor	pH	UV-Vis		DLS		TEM	EDX
					λ do pico máximo (nm)	Absorvância	Diâmetro Hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Diâmetro médio (nm)	Composição química
Au	1º	Mistura de 50µL de β-D-Glucose (0.03M) e 200µL de H ₂ AuCl ₄ •3H ₂ O (0.05M) seguida de 30 minutos de agitação 700rpm e da adição gota a gota de NaOH (0.05M) até obter pH 7	Roxo	Após síntese 7 1 semana depois 3	~580	0,6	101,3 60,75	0,268 0,412	-	-
Au	2º	80µL H ₂ AuCl ₄ •3H ₂ O (0,1M), 120 µL β-D-Glucose (0,1M) e 30µL NaOH (1M) adicionados a 4mL amido (0,2% peso)	Salmão Roxo/lilás	4 3,5	534	0,7	70,8 56,06	0,364 0,281	~12	-
Au	3º, 4º, 5º	80µL H ₂ AuCl ₄ •3H ₂ O (0,1M), 120 µL β-D-Glucose (0,2M) e 30µL NaOH (1M) adicionados a 4mL amido (0,2% peso)	Roxo/lilás Salmão	3,4	550	1,55	87,34	0,234	-	-
Au	8º	Dissolução de 0.0792g de Beta-cyclodextrin (β-CD) em 9.86mL de água e adição de 40µL de H ₂ AuCl ₄ (10 mM). Adição de 100µL de NaOH (1.0 M). Agitação e aquecimento em banho-maria.	Rosa/ salmão	11,4	507,89	0,05	14,32	0,397	-	-

Amostra	n.º Proc. Exp.	Método de Síntese	Caracterização							
			Cor	pH	UV-Vis		DLS		TEM	EDX
					λ do pico máximo (nm)	Absorvância	Diâmetro Hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Diâmetro médio (nm)	Composição química
Ag	2º	20µL de AgNO ₃ (0,1M) e 50 µL β-D-Glucose (0,1M) adicionados a 4mL amido (0,2%peso) 60 segundos de micro-ondas	Amarelo baço	-	~400	>1	98,72	0,243	-	-
Ag	3º	Mistura e dissolução completa de 200µL de AgNO ₃ (0,1M) e 6mL de amido (0,2%peso). Adição de 300 µL β-D-Glucose (0,2M) sob agitação. Aquecimento a 60°C até mudança de cor	Amarelo esbatido	-	400	0,2	91,58	0,155	-	-
Ag	4º, 5º	Adição gota a gota 10mL AgNO ₃ (1mM) a 30mL NaBH ₄ (2mM) (arrefecido) sob agitação 700rpm	Amarelo límpido	9,3 7,5 7,3	379,04 390	3,1 1,6	13,93 21,58 60,93	0,517 0,545 0,521	≈12	-
Ag	8º	Dissolução de 0.0792g de Beta-cyclodextrin (β-CD) em 9.86mL de água e adição de 40µL de AgNO ₃ (10 mM). Adição de 100µL de NaOH (1.0 M). Agitação e aquecimento em banho-maria.	Amarela	11,8	403,36	0,364	15,77	0,634	-	-
Ag/Au-1:3	2º, 4	20µL de AgNO ₃ (0,1M), 60µL HAuCl ₄ •3H ₂ O (0,1M), 120 µL β-D-Glucose (0,1M) e 30µL NaOH (1M) adicionados a 4mL amido (0,2%peso)	Bourdeaux	-	530	0,9	141,5 113,3	0,232 0,311	Aglomerados <50	Au e Ag

Amostra	n.º Proc. Exp.	Método de Síntese	Caracterização							
			Cor	pH	UV-Vis		DLS		TEM	EDX
					λ do pico máximo (nm)	Absorvância	Diâmetro Hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Diâmetro médio (nm)	Composição química
Ag/Au-1:1	2º, 4º	40µL de AgNO ₃ (0,1M), 40µL HAuCl ₄ •3H ₂ O (0,1M), 120 µL β-D-Glucose (0,1M) e 30µL NaOH (1M) adicionados a 4mL amido (0,2% peso)	Amarelo turvo/Acastanhado	-	536	2	150,1 88,01	0,353 0,261	Aglomerados >20	Au
Ag/Au-3:1	2º, 4º	60µL de AgNO ₃ (0,1M), 20µL HAuCl ₄ •3H ₂ O (0,1M), 120 µL β-D-Glucose (0,1M) e 30µL NaOH (1M) adicionados a 4mL amido (0,2% peso)	Castanho/Arroxeadado	-	2 picos 424 e 513	3,5	132,9 90,58	0,418 0,248	-	-
CM-01-81-Ag/Au	5º	Redução de 80µL (e 160 µL) HAuCl ₄ •3H ₂ O (0,1M), na presença de 1mL amido (0,2% peso), 120 µL β-D-Glucose e 30µL NaOH (1M), sobre 3mL NP de Ag	Violeta Roxo/rosa	2,6	532 543	0,6 0,4	70 74	0,42 0,31	~20	4,9% Au e 1,2% Ag
CM-02-01-Au/Ag	8º	Redução de 40µL AgNO ₃ (10mM) sobre 5mL NP de Au aquecendo em banho-maria	Laranja	11,10	410	1	15,88	0,27	<20 e aglomerados ~50	Au e Ag

Amostra	n.º Proc. Exp.	Método de Síntese	Caracterização							
			Cor	pH	UV-Vis		DLS		TEM	EDX
					λ do pico máximo (nm)	Absorvância	Diâmetro Hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Diâmetro médio (nm)	Composição química
CM-02-01-Ag/Au	8º	Adição gota a gota, sob agitação vigorosa, de 40µL HAuCl ₄ (10 mM) a 5 mL da solução de prata coloidal	Rosa acinzentado	11,87	530	0,4-	16,26	0,281	-	-
Fe ₃ O ₄	6º	Co precipitação de 5mL FeCl ₃ •6H ₂ O (1M) e 1,25mL FeCl ₂ •4H ₂ O (2M) dissolvido em HCl (2M) adicionados a 62,5mL NH ₄ OH (0,7M) sob fluxo de azoto e agitação 1200rpm	Preto	9,67	-	>1	4565	1	Aglomerados magnéticos	-
Fe ₃ O ₄	9º	Sob agitação e atmosfera de azoto adiciona-se 4mL de FeCl ₃ •6H ₂ O (1mol/dm ³) a 1mL de FeCl ₂ •4H ₂ O (2mol/dm ³) dissolvido em HCl (2mol/dm ³). Adiciona-se lentamente 50mL de NH ₄ OH (0,7mol/dm ³). Agita-se a 1200 rpm durante 30 min. O precipitado é isolado por decantação magnética e agitado com 50mL HClO ₄ (2mol/dm ³). Isola-se por centrifugação e mistura-se o resíduo em 50mL de água desoxigenada.	Preto	-0,4	-	-	Aglomerados com ~5µm	-	-	-
Fe ₃ O ₄ /Au	7º	15mL HAuCl ₄ •3H ₂ O (2mg/cm ³) adicionados a 105mL água desionizada. Aquecimento até fervura. Adição de 5mL Fe ₃ O ₄ e 5mL citrato de sódio (80 mmol/dm ³) sob agitação	Castanho tonalidade avermelhada	-	590	2	Aglomerados magnéticos		Fe ₃ O ₄ ~10 Au ~50	Fe ₃ O ₄ e Au

Amostra	n.º Proc. Exp.	Método de Síntese	Caracterização							
			Cor	pH	UV-Vis		DLS		TEM	EDX
					λ do pico máximo (nm)	Absorvância	Diâmetro Hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Diâmetro médio (nm)	Composição química
CM-02-11-Fe ₃ O ₄ /Au	9º	Adicionam-se 15mL de uma solução de H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O (2mg/cm ³) a 105mL de água desoxigenada. Aquece-se a mistura até à fervura (em banho maria). Adiciona-se 5mL das NP de Fe ₃ O ₄ e sob agitação adiciona-se 5mL de C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O (80mmol/dm ³). Aquecimento até à fervura sob agitação durante 5 min.	Bordeaux	3	574,3	2,4	-	-	Enviado para TEM (6.2012)	
CM-02-21-Fe ₃ O ₄ /Ag	10º	Sob fluxo de azoto e agitação mistura-se 5mL de Fe ₃ O ₄ com 3mL de AgNO ₃ (1mM), 3mL de ácido ascórbico (1mM) e 0.1mL de NaOH (0.01M)	Castanho claro	10	434,93	2,37	-	-	Enviado para TEM (6.2012)	
CM-02-21-Fe ₃ O ₄ /Ag	10º	Sob fluxo de azoto e agitação mistura-se 5mL de Fe ₃ O ₄ com 6mL de AgNO ₃ (1mM), 6mL de ácido ascórbico (1mM) e 0.2mL de NaOH (0.01M)	Castanho amarelado turvo	-	495,523	1,3	-	-	Enviado para TEM (6.2012)	



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



Governo da República Portuguesa

União Europeia

Região Autónoma da Madeira

A NOSSA Universidade

Colégio dos Jesuítas
Rua dos Ferreiros - 9000-082, Funchal

Tel: +351 291 209400
Fax: +351 291 209410
Email: gabinetedareitoria@uma.pt