

Ramon Gabriel Teixeira Rosa

Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre. Área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais – PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Celso de Araujo Duarte

Curitiba
2014

R788c

Rosa, Ramon Gabriel Teixeira

Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser. [manuscrito] / Ramon Gabriel Teixeira Rosa. – Curitiba, 2014.

75f. : il. [algumas color.] ; 30 cm.

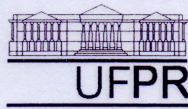
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014.

Orientador: Celso de Araujo Duarte.

Bibliografia: p. 66-71.

1. Nanopartículas. 2. Materiais - Análises. I. Universidade Federal do Paraná. II. Duarte, Celso de Araujo. III. Título.

CDD: 620.19



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais- PIPE
Setor de Tecnologia

RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos quatorze dias do mês de fevereiro de 2014, no Auditório Leo Grossmann - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pela Prof. Dr. Ana César Augusto Dartora, vice-coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a ducentésima sexagésima segunda defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: Prof. Dr. Celso de Araújo Duarte (UFPR), Ney Pereira Mattoso Filho (UFPR), Francisco Carlos Serbena (UEPG). Às 09:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **RAMON GABRIEL TEIXEIRA ROSA** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE BI PRODUZIDAS POR ABLAÇÃO A LASER**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a argüição, a banca decidiu pela APROVAÇÃO do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

Curitiba, 14 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Celso de Araújo Duarte
Orientador

Prof. Dr. Ney Pereira Mattoso Filho
Examinador

Prof. Dr. Francisco Carlos Serbena
Examinador

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not ‘Eureka’ but ‘That’s funny...’ ”

– Isaac Asimov.

Agradecimentos

Agradeço ao professor Celso de Araujo Duarte pela orientação, atenção e amizade. Foi um enorme privilégio trabalhar ao seu lado.

Devo agradecimentos especiais ao professor Arandi Ginane Bezerra Jr., que foi, sem nenhuma dúvida, a pedra fundamental deste trabalho e ao professor Wido Herwig Schreiner pelas incontáveis sugestões e contribuições, incluindo as medidas de XPS.

Agradeço ao professor Andersson Barison e à sua aluna de doutorado Fernanda Ocampos pelo enorme esforço investido na realização das medidas de RMN e ao professor Ney Pereira Mattoso Filho pelas imagens de TEM, pelo SAED e pelas várias sugestões de inestimável valor a este trabalho.

Gostaria de agradecer também ao professor Irineu Mazzaro pelo auxílio nas medidas de XRD, ao professor Gilberto Medeiros Kremer pelas explicações sobre a teoria do DLS e ao professor Cyro Ketzer Saul pelo uso da centrífuga para a preparação das amostras.

Devo agradecimentos ao professor Guinther Kellermann pelo auxílio na elaboração do projeto para realização da medida de SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, ao professor Evaldo Ribeiro pelas discussões a respeito dos espectros de fotoluminescência, pelas sugestões e pela amizade, aos professores Francisco Carlos Serbena e Ismael Leandro Graff pelas valiosas sugestões a este trabalho e ao doutorando Vinicius Silva de Oliveira pela ajuda com a realização de experimentos e com a utilização de equipamentos no início do trabalho.

Um agradecimento especial à Franciele Renata Henrique, física e companheira. Sua ajuda na realização de vários experimentos foi essencial a este trabalho e, no entanto, minha maior gratidão se deve ao seu insubstituível suporte e carinho ao longo destes anos.

Um enorme agradecimento aos meus pais, José Batista da Rosa e Maria Creuza

Teixeira, por seu incalculável apoio em todas as etapas da minha formação e da minha vida.

Gostaria de agradecer aos colegas de laboratório pela amizade, sugestões e momentos de descontração.

Agradeço ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela microscopia eletrônica de transmissão e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelo tempo de linha e pelo auxílio fornecido na realização das medidas de SAXS (não apresentadas neste texto).

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigado a todos,
Ramon Gabriel Teixeira Rosa.

Resumo

Neste trabalho produzimos nanopartículas através da ablação a laser de um alvo de bismuto imerso em água e em acetona. As amostras foram caracterizadas através de diversas técnicas: Espectroscopia UV/Vis, Espalhamento Dinâmico de Luz, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raios X, Difração de Raios X e Fotoluminescência. As nanopartículas produzidas em água são metálicas, mas com oxidação na superfície, pico de absorção em 257 nm devido à ressonância de plasmons de superfície e exibem um intenso pico de luminescência em 414 nm. Foi estudada a interação desta amostra com diferentes aminoácidos, o que revelou uma sensibilidade seletiva à cisteína. Constatamos o potencial das nanopartículas produzidas na determinação da concentração de cisteína na faixa de 80 a 720 μM . Através de medidas de ressonância magnética nuclear, elucidamos o mecanismo de interação da cisteína com as nanopartículas: ocorre a dimerização da cisteína em cistina que, provavelmente, é complexada à superfície da nanopartícula por interações eletrostáticas, o que provoca a modificação do espectro de absorção das nanopartículas.

Palavras-chave: nanopartículas, bismuto, ablação.

Abstract

In the present work we produced nanoparticles by the laser ablation of a bismuth target immersed in water and in acetone. The samples were characterized by various techniques: UV/Vis spectroscopy, Dynamic Light Scattering, Transmission Electron Microscopy, X-ray Photoelectron Spectroscopy, X-Ray Diffraction and Photoluminescence. The nanoparticles produced in water are metallic, with oxidation on its surface, absorption peak at 257 nm due to the surface plasmon resonance and an intense luminescence peak at 414 nm. The interaction between various amino acids with the nanoparticles was studied revealing a selective sensibility to cysteine. We verified the potential of the produced nanoparticles to the determination of the cysteine concentration ranging from 80 to 720 μM . Through the nuclear magnetic resonance we understood the interaction mechanism between the cysteine and the nanoparticles: occurs a dimerization of the cysteine to cystine that probably is complexed to the nanoparticle surface by electrostatic interactions, which leads to the modification of the nanoparticles absorption spectrum.

Keywords: nanoparticles, bismuth, ablation.

Sumário

1	Introdução	9
1.1	Nanopartículas	9
1.2	Bismuto	11
1.3	Ablação a laser	12
1.4	Aminoácidos	14
2	Materiais e métodos	15
2.1	Preparação das amostras	15
2.1.1	Ablação a laser em meio líquido	15
2.2	Caracterização	17
2.2.1	UV/Vis	17
2.2.2	Espalhamento Dinâmico de Luz	18
2.2.3	Difração de Raios X	22
2.2.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão	24
2.2.5	Fotoluminescência	26
2.2.6	Ressonância Magnética Nuclear	27
2.2.7	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X	28
3	Resultados e discussões	30
3.1	Caracterização	30

3.2	Interação com aminoácidos	41
3.3	Interação das nanopartículas de bismuto com a cisteína	43
3.4	Determinação da concentração de cisteína utilizando as BiNPs	61
4	Conclusões e considerações finais	63
5	Trabalhos futuros	65
	Referências Bibliográficas	66
A	Estrutura química dos aminoácidos utilizados	72

Capítulo 1

Introdução

1.1 Nanopartículas

Materiais nanoestruturados atraem grande interesse científico pois representam um elo entre as estruturas *bulk* e os átomos. Suas propriedades físicas dependem fortemente de tamanho e formato, o que atribui a estas estruturas grande potencial para aplicação nas mais diversas áreas da ciência e tecnologia [1].

As nanopartículas (NPs) têm sido exploradas pela humanidade há vários séculos. Registros indicam que no século IX, na Mesopotâmia, artesãos já as utilizavam para realizar pinturas e obter um efeito de brilho [2]. Estas e outras propriedades ópticas das nanopartículas se devem a fenômenos como o confinamento quântico e a ressonância de plasmons de superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*).

O confinamento quântico surge quando pelo menos uma das dimensões do material se aproxima do comprimento de onda de seus elétrons mais energéticos. Neste caso, a dimensionalidade da estrutura afeta diretamente o espectro de energias dos elétrons, podendo ocorrer a formação de um *gap* de energia em nanopartículas metálicas ou aumento deste *gap* em nanopartículas isolantes ou semicondutoras.

Quando uma onda eletromagnética incide sobre uma nanopartícula metálica, seus

elétrons tenderão a se mover no sentido contrário ao do campo elétrico, como mostra a figura 1.1. Neste momento surge uma força restauradora proveniente da repulsão coulombiana criada pela inhomogeneidade da distribuição de cargas no interior da partícula. Analogamente a um oscilador harmônico, existirá uma frequência natural de oscilação da nuvem de elétrons no interior da partícula [3].

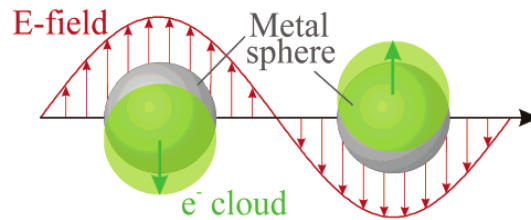


Figura 1.1: Oscilação coletiva dos elétrons em uma nanopartícula metálica provocada pela incidência de uma onda eletromagnética. Figura retirada de [3].

Se a onda eletromagnética incidente possui uma frequência igual à frequência natural de oscilação da nuvem eletrônica, ocorrerá o fenômeno da ressonância de plasmons de superfície. Este fenômeno pode ser observado através da medida do espectro de absorção de luz das nanopartículas, onde será observado um pico de absorção no comprimento de onda relativo à frequência de ressonância.

A absorção por SPR é sensível à vizinhança da nanopartícula, de modo que esta é a base de diversos sensores de adsorção e biológicos. Hiep *et al.* [4] utilizaram nanopartículas de sílica encapadas por ouro para realizar a detecção da proteína caseína no leite através da observação do deslocamento no pico do plasmon. Diversos outros trabalhos relatam a utilização da modificação do espectro de absorção na região do SPR para realizar a detecção de moléculas biológicas [5, 6, 7, 8].

Na área biomédica, a aplicação das nanopartículas como agentes de imageamento *in vivo* tem ganhado grande atenção na última década [9, 10, 11]. Um exemplo é encontrado no trabalho de Hainfeld *et al.* [12], onde nanopartículas de ouro foram injetadas em ratos vivos para que o contraste produzido em imagens de raios X fosse estudado. Na figura 1.2 vemos a comparação do resultado obtido com a utilização das

nanopartículas e de um medicamento iodado comumente utilizado com esta finalidade (Omnipaque®).

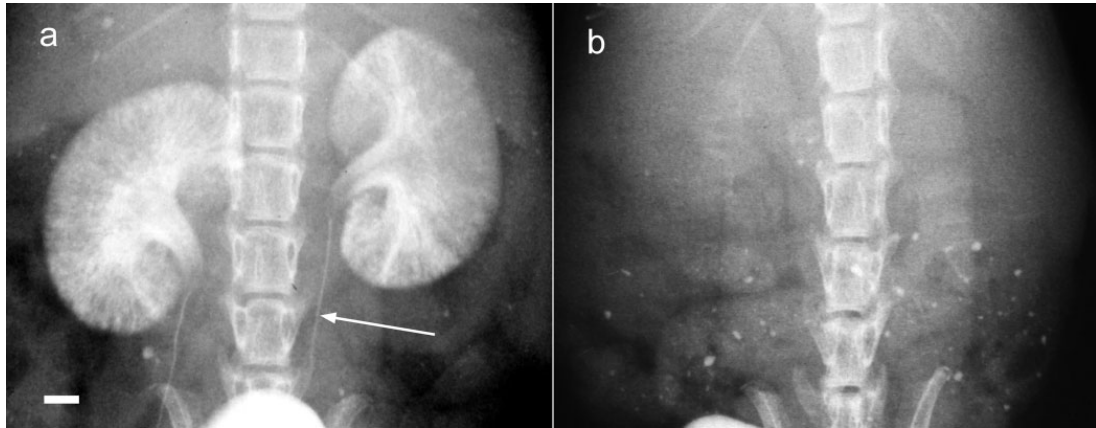


Figura 1.2: Imagem de raios X mostrando os rins de ratos vivos após 60 minutos da injeção de (a) nanopartículas de ouro e (b) medicamento iodado para contraste (Omnipaque®). A seta indica a uretra com $100 \mu\text{m}$ de diâmetro — barra de 1 mm. Figura adaptada de [12].

Podemos ver que as nanopartículas geram um alto contraste, permitindo a observação de diversos detalhes (incluindo a uretra com um diâmetro de apenas $100 \mu\text{m}$ do animal) não perceptíveis com a utilização do medicamento testado.

1.2 Bismuto

O bismuto (Bi) é um semimetal de número atômico 83 com aparência prateada. Apesar de sua baixa condutividade elétrica, ele apresenta propriedades eletrônicas interessantes, como uma baixíssima massa efetiva para seus elétrons [13]. Esta baixa massa efetiva está relacionada à alta anisotropia em sua superfície de Fermi [14] e, somada à baixa densidade de portadores, faz com que o bismuto apresente efeitos de confinamento quântico para dimensões menores do que aproximadamente 55 nm [15, 16, 17].

Além disso, o bismuto apresenta toxicidade relativamente baixa [18], fazendo dele uma boa opção para aplicações na área biomédica. Seu elevado número atômico

possibilita forte interação com raios X, o que indica ainda que este elemento é um bom candidato para aplicação como biomarcador.

Hossain *et al.* estudaram [19] a aplicação de nanopartículas magnéticas (óxido de ferro) e de bismuto (BiNPs) na detecção e erradicação de células tumorais circulantes. As nanopartículas foram modificadas com moléculas capazes de se ligar às células cancerígenas. Desta forma, as nanopartículas acabam sendo conjugadas às células doentes. A detecção, no caso do bismuto, foi feita através da medida da emissão característica de raios X pelas nanopartículas quando excitadas por um feixe colimado de raios X. Com a irradiação, ocorreu também a erradicação das células tumorais devido a efeitos de amplificação local do campo eletromagnético pelas nanopartículas.

No trabalho de Hossain *et al.* é descrita a rota química utilizada na produção das nanopartículas de bismuto: 0,1 mmol de $Bi(NO_3)_3$ e 0,5 mmol de Polivinilpirrolidona (PVP) são dissolvidos em 10 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). A solução é degaseificada com um fluxo de argônio por 15 minutos sob agitação. 0,3 mL de uma solução aquosa de $NaBH_4$ é misturado a 10 mL de DMF e adicionado à primeira solução sob agitação intensa e fluxo de argônio por 5 minutos. As nanopartículas são precipitadas através da adição de acetona, seguida por centrifugação, lavagem com acetona e secagem em vácuo [19].

1.3 Ablação a laser

Os métodos de produção de nanopartículas são divididos em duas categorias fundamentais. Os processos onde átomos são reunidos para dar origem ao nanomaterial são classificados como *bottom-up*, enquanto os processos onde material é retirado de uma estrutura *bulk* são classificados como *top-down* [20].

As rotas químicas são os métodos mais comumente utilizados na produção de nanopartículas, sendo que algumas delas se enquadram como *bottom-up* e outras como

top-down.

Vimos na seção 1.2 que a rota química utilizada na produção de nanopartículas de bismuto envolve a utilização de diversos reagentes e solventes e processos como centrifugação, desgaseificação e secagem em vácuo. Além de todos estes processos encarecerem a produção, os reagentes utilizados deixam resíduos após a secagem. Em situações onde a presença de impurezas é indesejada, como quando se deseja utilizar as nanopartículas em pesquisas aplicadas à medicina e à biologia, as rotas químicas não são a opção mais conveniente. Como alternativa às rotas químicas, existem diversas técnicas como moagem mecânica, deposição física de vapor, implantação iônica, a ablação a laser e várias outras.

Neste trabalho utilizamos a técnica da ablação a laser em meio líquido para produzir as nanopartículas. Esta técnica consiste na focalização de um feixe laser de alta potência na superfície de um alvo sólido imerso em solvente. Normalmente utiliza-se um laser pulsado que provoca a explosão localizada da superfície do sólido que é seguida pela formação de uma pluma de plasma e pela nucleação que resulta na formação das nanopartículas. Maiores detalhes sobre a técnica são discutidos na seção 2.1.1.

As principais vantagens desta técnica são: ela dispensa a utilização de reagentes químicos que deixam resíduos nas nanopartículas e pode ser utilizada para produzir nanopartículas de diferentes materiais em diferentes solventes sem alteração do arranjo experimental. Além disso, ela permite a produção de nanomateriais de forma rápida e com baixo custo.

Segundo Barcikowski *et al.*, em 2009 o número de publicações envolvendo ablação a laser e geração de nanopartículas em líquidos foi aumentado em 15 vezes em relação a 1999 [21].

1.4 Aminoácidos

Os aminoácidos são moléculas orgânicas compostas por um grupo amina, uma carboxila e um radical R que é diferente para cada aminoácido. Este radical é o principal responsável pelas diferentes propriedades apresentadas por cada um destes compostos. Os vinte aminoácidos mais importantes para o corpo humano são: leucina, valina, tirosina, fenilalanina, histidina, glicina, isoleucina, ácido aspártico, metionina, treonina, serina, ácido glutâmico, arginina, asparagina, glutamina, prolina, cisteína, lisina, triptofano e alanina. Por constituírem as proteínas e assumirem diversas funções reguladoras no organismo, são frequentemente utilizados em medicamentos e complementos alimentares de forma que é necessária a existência de mecanismos de detecção de concentração para cada um deles, o que torna importante o desenvolvimento de sensores seletivos para cada um dos aminoácidos.

Neste trabalho testamos a reatividade das nanopartículas produzidas com diferentes aminoácidos para verificar a possibilidade da aplicação das nanopartículas de bismuto como sensor de algum deles.

Na literatura, a produção de nanopartículas através da ablação a laser de um alvo de bismuto em meio líquido é praticamente inexplorada. Lin *et al.* realizaram [22] a ablação de um alvo de óxido de bismuto em etanol utilizando um laser de femtossegundo e obtiveram nanopartículas formadas pela fase α do Bi_2O_3 .

Recentemente, Verma *et al.* [17] produziram nanopartículas de bismuto metálico através da ablação de um alvo de Bi em água. As amostras produzidas por eles apresentaram um pico de absorção em 980 nm. Foi estudado o aquecimento produzido na amostra quando irradiada com um laser de 976 nm com finalidade de estudar a possível aplicação desta geração de calor em medicina.

Não há estudos anteriores sobre a interação de aminoácidos com nanopartículas de bismuto produzidas por qualquer método.

Capítulo 2

Materiais e métodos

2.1 Preparação das amostras

As amostras estudadas neste trabalho são nanopartículas de bismuto (Bi) em dispersão coloidal. Foram utilizados dois solventes: água bidestilada e acetona. O coloide foi produzido através da ablação a laser pulsado de alvos de bismuto produzidos pela Sigma-Aldrich® com pureza de 99,999% submersos no solvente. Esta técnica e os parâmetros utilizados neste trabalho serão discutidos na Seção 2.1.1.

2.1.1 Ablação a laser em meio líquido

Conforme discutido no Capítulo 1, as técnicas de produção de nanopartículas podem ser divididas em duas classes de acordo com o método de formação das estruturas. Técnicas onde átomos são reunidos para dar origem ao nanomaterial são denominadas *bottom-up* enquanto que técnicas onde o material é arrancado de uma estrutura *bulk*, como a ablação a laser, são classificadas como *top-down*.

Neste trabalho utilizamos a ablação a laser de um alvo submerso no meio solvente no qual se deseja obter o coloide. Esta técnica é especialmente vantajosa quando se deseja evitar a contaminação da solução por reagentes químicos já que estes são completamente

dispensados. Outra grande vantagem desta técnica é que, em contraste à realidade das rotas químicas, o mesmo *setup* pode ser utilizado na produção de nanopartículas de uma enorme variedade de materiais em diversos solventes.

A ablação a laser é o processo onde material é arrancado da superfície de um sólido devido à absorção da energia de um feixe laser de alta intensidade. Usualmente, as intensidades necessárias para que ocorra a ablação são da ordem de 10^6 a 10^{14} W/cm^2 com a duração dos pulsos variando de 10^{-13} a 10^{-8} s [23].

Neste trabalho, utilizamos o harmônico fundamental de um laser de Nd:YAG (1064 nm) com pulsos de duração de 200 ns e 1,0 mJ de energia. Foi utilizada uma taxa de repetição de 1,5 kHz, gerando, portanto, um feixe de potência média de 1,5 W. Para a produção de cada amostra, o laser foi focalizado na superfície do alvo de Bi imerso em 4 mL do solvente e a ablação foi realizada durante 2 minutos. A ablação foi feita no Laboratório de Nanoestruturas para Sensores da Universidade Federal do Paraná (LANSEN). O esquema da montagem experimental é exibido na Figura 2.1.

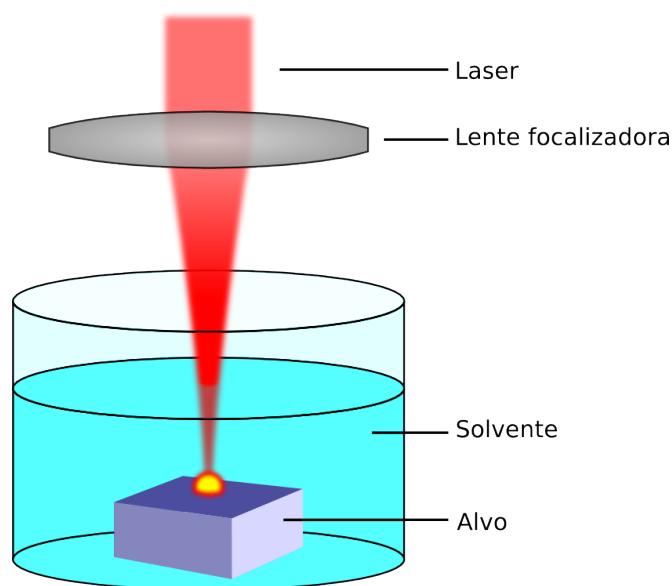


Figura 2.1: Esquema da montagem utilizada para realizar a ablação a laser.

A explosão localizada na superfície da amostra devido à sua interação com o pulso

do laser produz uma pluma de plasma que é seguida pelos processos de nucleação e coalescência, dando origem às nanopartículas [24, 25], conforme ilustrado na Figura 2.2.

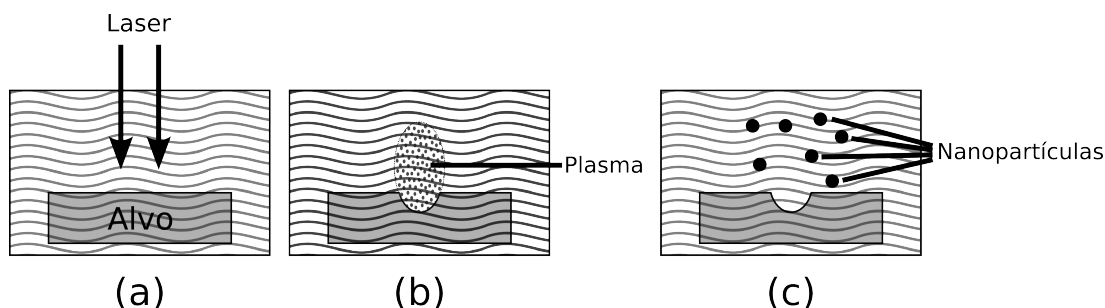


Figura 2.2: (a) Absorção da energia do pulso. (b) Aquecimento, explosão e formação de plasma. (c) Nucleação e coalescência levando à formação de nanopartículas.

Amendola e Meneghetti [26] estudaram os produtos da ablação a laser em diversos solventes e mostraram que, durante o processo de formação, a interação com o solvente pode resultar na formação de nanopartículas constituídas por materiais diferentes daquele do alvo. Nanopartículas produzidas através da ablação de um alvo de ferro em água, por exemplo, apresentaram diferentes fases de óxido e mistos de óxido e hidróxido (Fe_3O_4 , Fe_2O_3 e $Fe(OOH)_2$) enquanto que, em tolueno, se mostra presente apenas uma fase de carbeto de ferro e grafite.

É conhecido ainda que pode haver a criação de uma estrutura casca-núcleo [27], onde existe a tendência de que o núcleo apresente a mesma composição do alvo.

2.2 Caracterização

2.2.1 UV/Vis

O estudo da absorção de luz na região do ultra-violeta, visível e infra-vermelho próximo (UV/Vis/NIR) foi realizado utilizando o espectrômetro *USB2000+* acoplado a uma fonte de luz *USB-ISS-UV/Vis*, que conta com uma lâmpada halógena de deutério, permitindo a obtenção do espectro na faixa de 200 a 1000 nm com uma resolução de

2 nm. O espectrômetro e a fonte de luz utilizados são fabricados pela Ocean-Optics e as medidas foram realizadas no LANSEN – UFPR.

Inicialmente, é medido o espectro da luz transmitida pelo solvente ($I_0(\lambda)$) contido em uma cubeta de quartzo para que este sinal seja utilizado como referência. Então, é medido o espectro da luz transmitida através do coloide sob estudo ($I(\lambda)$).

O cálculo da absorbância, então, é realizado pelo *software* do próprio equipamento utilizando a equação:

$$A(\lambda) = -\log_{10} \left[\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \right], \quad (2.1)$$

onde $A(\lambda)$ é medido em termos da grandeza adimensional chamada Densidade Óptica (OD, *Optical Density*).

2.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz

Através da medida do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) podemos obter informações sobre o tamanho das partículas suspensas em meio líquido. Nesta técnica, um laser incide sobre a amostra e a intensidade do feixe espalhado por um ângulo θ é medida ao longo do tempo, conforme ilustrado na figura 2.3.

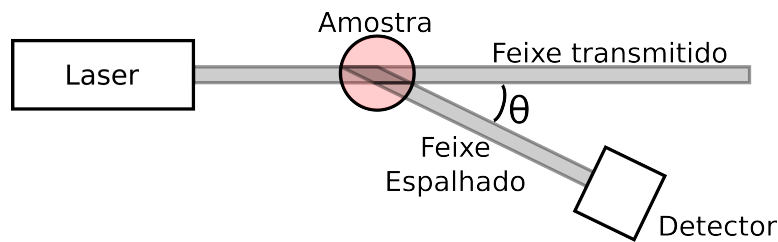


Figura 2.3: Medida da intensidade da luz espalhada por um ângulo θ .

A intensidade da luz espalhada depende do número de partículas presentes no volume definido pela intersecção do feixe incidente e transmitido com o feixe espalhado. Como as partículas em suspensão têm movimento aleatório dentro do fluido, a evolução

temporal da intensidade medida terá a aparência de um ruído branco.

A escala de tempo da flutuação da intensidade medida será tão menor quanto maior for a difusividade das nanopartículas no fluido, que pode ser calculada pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H}, \quad (2.2)$$

onde D é a constante de difusão, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade do fluido e r_H é o raio hidrodinâmico das partículas. Este representa o raio de uma partícula esférica que se difundiria da mesma forma que as partículas sob estudo. Fica claro que para partículas esféricas o raio hidrodinâmico é igual ao raio das partículas.

Através da Equação 2.2 vemos que as partículas menores terão maior difusividade. Portanto, a medida da intensidade de luz espalhada terá uma flutuação mais rápida para partículas menores, conforme ilustrado na Figura 2.4.

Para obter informações sobre o tamanho das partículas através dos dados de espalhamento dinâmico, devemos realizar algumas análises estatísticas nas curvas obtidas. Para tanto, é útil definir neste momento algumas grandezas e funções que serão fundamentais.

A média da intensidade $I(t)$ da luz espalhada adquirida a partir do instante t_0 ao longo de um período de tempo T é o resultado da integração definida neste intervalo ponderada por T .

$$\bar{I}(t_0, T) = \frac{1}{T} \int_{t_0}^{t_0+T} dt I(t). \quad (2.3)$$

Se $I(t)$ flutua aleatoriamente e o intervalo T é muito longo¹, este resultado não dependerá de t_0 ou de T . Podemos, por simplicidade, fazer $t_0 = 0$ e adotar a notação:

¹Muito maior do que o tempo característico da flutuação.

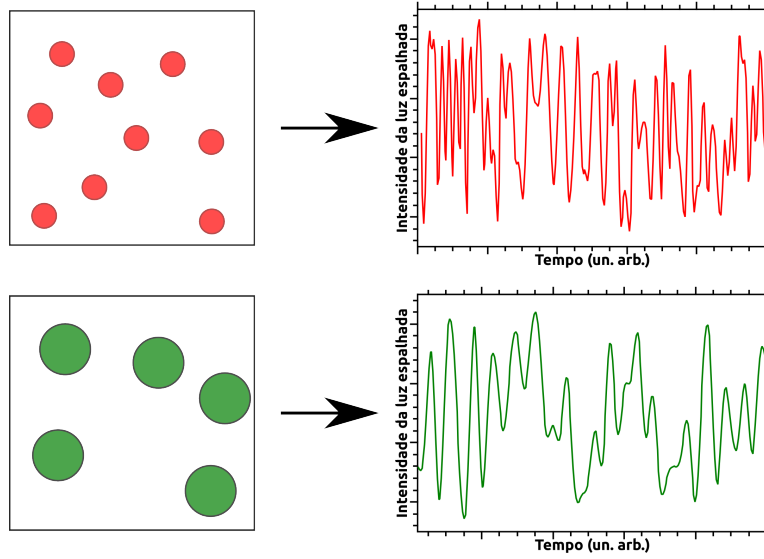


Figura 2.4: Representação de um resultado típico de espalhamento dinâmico de luz para partículas de dois tamanhos. Nota-se que as partículas menores apresentam uma flutuação mais rápida na intensidade de luz espalhada do que as partículas de maior diâmetro.

$$\bar{I}(t_0, T) = \langle I(t) \rangle.$$

Definimos, agora, a função de autocorrelação temporal da função $I(t)$ como a média temporal do produto dela com ela mesma defasada por um intervalo τ , como mostra a Equação 2.4.

$$A(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T dt I(t)I(t + \tau). \quad (2.4)$$

Podemos esperar que a função de autocorrelação temporal de uma função aleatória e não-periódica decaia de seu valor inicial $A(0) = \langle I(t)I(t) \rangle = \langle I^2(t) \rangle$ para um valor mínimo assim que as funções $I(t)$ e $I(t + \tau)$ se tornem totalmente descorrelacionadas. Isto acontecerá quando τ se tornar muito maior do que a escala de tempo típica da flutuação.

Assim que $I(t)$ e $I(t + \tau)$ se tornam totalmente descorrelacionadas, $\langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle = \langle I(t) \rangle^2$. Logo, a função de autocorrelação temporal da intensidade

de luz espalhada decairá de seu valor inicial $\langle I(t)^2 \rangle$ para $\langle I(t) \rangle^2$. Em muitos casos este decaimento é exponencial e pode ser representado, portanto, pela expressão:

$$A(t) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle = [A(0) - A(t \rightarrow \infty)] \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_C}\right)$$

$$A(t) = \left[\langle I(t)^2 \rangle - \langle I(t) \rangle^2 \right] \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_C}\right), \quad (2.5)$$

onde τ_C é o *tempo de correlação* a ser obtido a partir do ajuste da função de autocorrelação dos dados experimentais à equação 2.5. Para irmos adiante na análise desta grandeza, devemos lembrar [28] que o módulo do vetor de espalhamento $|\vec{q}| = q = |\vec{k}_i - \vec{k}_f|$ é dado por:²

$$q = \frac{4\pi n_f}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (2.6)$$

onde n_f é o índice de refração do fluido e λ_0 é o comprimento de onda do laser. Assim, pode-se associar o tempo de correlação da flutuação na intensidade de luz espalhada com as grandezas definidas até aqui por meio da relação [29].

$$\frac{1}{\tau_C} = qD^2. \quad (2.7)$$

De posse do coeficiente de difusividade D , o raio hidrodinâmico das nanopartículas é calculável através da equação de Stokes-Einstein (Equação 2.2) [30].

O equipamento utilizado nas medidas de DLS foi o Microtrac Nanotrak Ultra que utiliza um laser contínuo de diodo emitindo 3 mW em 780 nm. A medida é feita através de um sistema de múltiplas fibras ópticas que conduz o feixe laser até a amostra e coleta a luz retroespalhada ($\theta = 180^\circ$) e foi realizada no LANSEN – UFPR.

O *software* do equipamento utiliza algoritmos que permitem a obtenção de dis-

²Assumindo a hipótese de espalhamento elástico ($k_i = k_f$, onde k_i e k_f são os vetores número de onda da radiação incidente e espalhada).

tribuições complexas de tamanhos através da expansão das funções de autocorrelação em séries de decaimentos exponenciais.

2.2.3 Difração de Raios X

A Difração de Raios X (XRD, *X-Ray Diffraction*) foi utilizada na caracterização estrutural das amostras de nanopartículas por ser uma alternativa mais simples à Difração de Elétrons em Área Seleccionada, que será apresentado na Seção 2.2.4, apresentando ainda a vantagem de que estas amostras não precisam ser secas, uma vez que esta técnica não exige que a amostra seja colocada em vácuo.

No experimento de XRD uma fonte monocromática de raios X ilumina a amostra variando o ângulo de incidência θ enquanto um detector mede a intensidade do feixe refletido formando o mesmo ângulo θ com o plano da amostra e, portanto, um ângulo 2θ com a direção inicial de propagação do feixe, conforme mostrado na Figura 2.5.

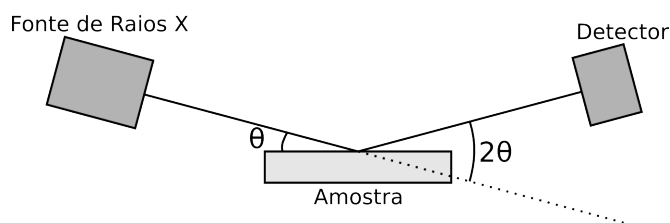


Figura 2.5: Esquema da montagem utilizada na medida de XRD.

Os raios incidentes na amostra serão refletidos pelos diversos planos atômicos representados pelos índices de Miller (hkl). Os raios refletidos por planos paralelos (com índices de Miller iguais) sofrerão interferência devido à diferença de comprimento de caminho óptico existente, como ilustrado na Figura 2.6.

Sendo a diferença de comprimento de caminho óptico dos raios refletidos por dois planos espaçados por uma distância d igual a $2d\sin\theta$, a condição de interferência construtiva é que esta diferença seja igual a um número inteiro de comprimentos de onda da radiação utilizada. Essa é a Lei de Bragg, expressa pela equação:

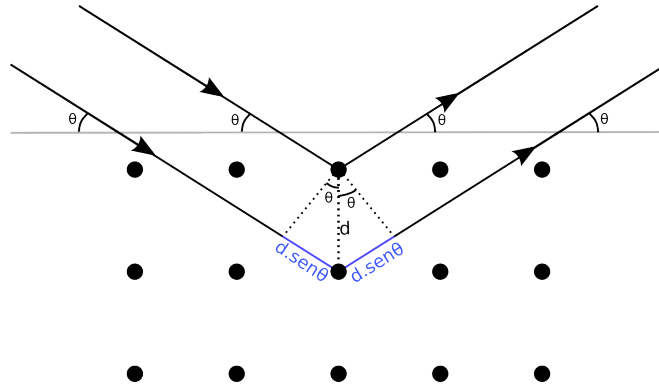


Figura 2.6: Difração de Raios X por um sólido cristalino — A diferença no comprimento do caminho óptico de dois raios refletidos por planos atômicos diferentes implica na existência de ângulos específicos onde há interferência construtiva do feixe espalhado.

$$2d \sin \theta = n\lambda, \quad n = 1, 2, 3 \dots$$

Podemos fazer $n = 1$ sem perda de generalidade da expressão se considerarmos que a difração com diferentes valores de n do plano d_{hkl} é equivalente à difração pelo plano a uma distância $d_{nh, nk, nl}$. Deste modo, podemos reescrever a Lei de Bragg da seguinte forma:

$$2d_{hkl} \sin \theta = \lambda \tag{2.8}$$

Localizando os ângulos nos quais há interferência construtiva, pode-se calcular as distâncias interplanares do sólido estudado, que são comparadas com as bases de dados do ICDD (*The International Centre for Diffraction Data*).

As medidas foram realizadas com o difratômetro Shimadzu XRD-7000, utilizando a linha de emissão K_{α} do cobre, com $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, e geometria Bragg-Brentano ($\theta - 2\theta$). Cada amostra foi preparada através da centrifugação dos coloides em seis *ependorfs* de 1,5 mL a uma rotação de 9000 rpm por 8 minutos e posterior coleta de aproximadamente 20 μL da região com maior concentração de nanopartículas de cada *ependorf*. Este

material foi então espalhado sobre um substrato de vidro e posicionado, ainda úmido, no interior do difratômetro para a imediata realização da medida.

2.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) um feixe de elétrons é acelerado ao longo da coluna do microscópio por meio de uma diferença de potencial elétrico aplicado, que é tipicamente de dezenas ou centenas de kV. Tendo sido acelerados a estas energias, os elétrons possuem um comprimento de onda reduzido o bastante para permitir a obtenção de imagens com resolução subnanométrica.

O feixe, ao ser ejetado do canhão de elétrons, é acelerado em direção ao catodo localizado no fim da coluna, passando por uma série de aberturas e lentes magnéticas condensadoras antes de atingir a amostra. O feixe transmitido é focalizado por um novo conjunto de lentes sobre o componente no qual a imagem é formada (usualmente uma tela fluorescente). A geração do contraste da imagem se deve à uma série de interações possíveis do feixe com o *specimen* — principalmente a absorção, o espalhamento e a difração do feixe pela amostra.

O microscópio utilizado foi um JEOL JEM 1200EX-II, com um canhão de filamento de tungstênio. A tensão de aceleração utilizada em todas as etapas foi de 120 kV. As imagens das amostras produzidas na acetona foram obtidas pelo técnico Deonir Agustini, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, e as imagens e padrões de difração em água com e sem adição de cisteína foram obtidas pelo Prof. Dr. Ney Pereira Mattoso Filho.

As amostras foram preparadas através da deposição de uma gota do coloide produzido (com diluição de 1/10, para reduzir a concentração de nanopartículas e evitar a formação de grandes agregados indesejáveis na obtenção de imagens de TEM) sobre uma grade de cobre coberta com um filme fino de carbono amorfo específica para este fim. Após a secagem do solvente, as grades foram levadas ao microscópio.

Difração de Elétrons em Área Seleccionada

Ainda no microscópio eletrônico de transmissão, é possível realizar o experimento da Difração de Elétrons em Área Seleccionada (SAED, *Selected Area Electron Diffraction*).

Tendo comprimentos de onda da ordem de tamanho do espaçamento interatômico típico da matéria, os elétrons com altas energias, conforme observado em 1927 por Joseph Davisson e Lester Germer e, separadamente, por *Sir* George P. Thomson, sofrem o fenômeno da difração, confirmando a então recém formulada hipótese das ondas de matéria de de Broglie.

Este fenômeno é a base do SAED. Nesta técnica os elétrons acelerados por uma diferença de potencial V_0 adquirem energia cinética $e \cdot V_0$, onde e é a carga elementar. Como as tensões de aceleração chegam a centenas de kV, as energias cinéticas podem chegar a quantidades significativas quando comparadas com a energia de repouso destes elétrons (aproximadamente 511 keV), tornando relevantes as correções relativísticas.

Rearranjando as expressões para energia total da relatividade especial $E^2 = c^2p^2 + m_0^2c^4$ e a relação de de Broglie $\lambda = h/p$, obtemos a equação para o comprimento de onda (λ):

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0eV \left(1 + \frac{eV}{2m_0c^2}\right)}}, \quad (2.9)$$

onde h é a constante de Planck, m_0 é a massa de repouso dos elétrons e c , a velocidade da luz. Utilizando esta equação para a tensão de aceleração utilizada (120 kV), podemos mostrar que $\lambda = 3,35$ pm.

O padrão de difração de um monocristal é caracterizado por *spots* localizados nas regiões onde há a condição de interferência construtiva (ver Seção 2.2.3), definidas pela estrutura cristalina do material. Desta forma, a análise do padrão de difração nos permite obter informações estruturais da amostra analisada.

Uma vez que o SAED foi realizado em uma região contendo várias nanopartículas,

os *spots* não trazem consigo todas as informações da simetria da rede cristalina, por serem na realidade resultado da difração provocada pelos diversos cristalitos (cada nanopartícula pode ser formada por um ou mais domínios cristalinos e está rotacionada aleatoriamente). Desta forma, a orientação dos *spots* não traz nenhuma informação e apenas a sua distância até o centro é medida.

De posse do comprimento de onda λ da radiação utilizada, da distância L da amostra à tela fluorescente e da distância R dos *spots* ao centro da figura, podemos rearranjar a equação 2.8 utilizando a aproximação de baixos ângulos ($\sin\theta \approx \theta$) e obter a expressão:

$$Rd_{hkl} = \lambda L, \quad (2.10)$$

com a qual é possível obter as distâncias interplanares do sólido cristalino.

Na prática, a determinação destas distâncias ocorre através da comparação do padrão de difração da amostra com o de uma amostra padrão (no nosso caso foi utilizado um filme policristalino de ouro) obtido em condições idênticas. A análise é feita utilizando a bases de dados cristalográfica do ICDD. As medidas foram feitas com auxílio do programa *Diffraction Ring Profiler* [31].

2.2.5 Fotoluminescência

As medidas de fotoluminescência (PL, *Photoluminescence*) consistem da medida do espectro de emissão luminosa da amostra quando excitada por uma fonte de luz. Esta emissão pode ocorrer devido a processos de relaxação radiativos que seguem a excitação provocada pela absorção de um fóton da fonte de excitação.

Foi utilizada uma montagem experimental semelhante à ilustrada na Figura 2.7, onde a fonte de excitação foi um laser pulsado de Nitrogênio ($\lambda = 337$ nm) e o espectro foi obtido através de um espectrômetro e CCD Andor Shamrock 303i, no Laboratório de Propriedades Ópticas da Universidade Federal do Paraná.

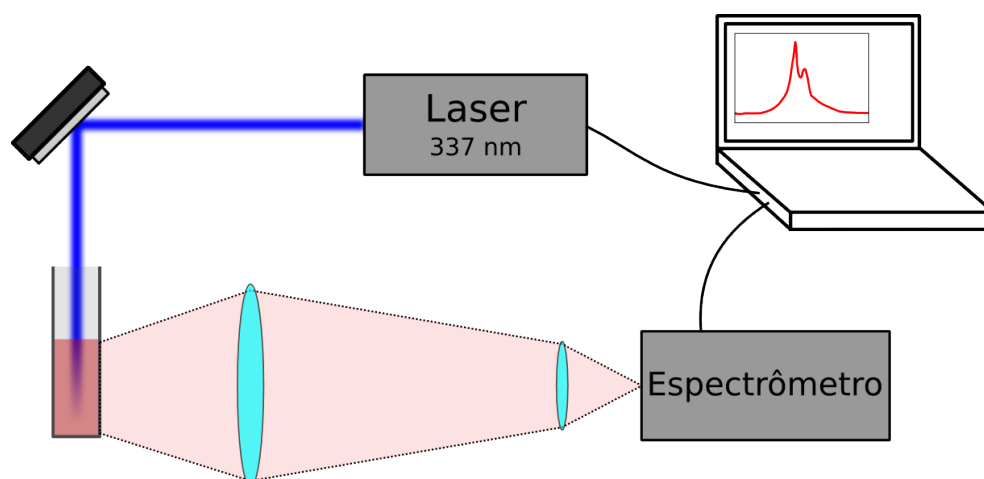


Figura 2.7: Diagrama da montagem utilizada para medida de fotoluminescência.

A fotoluminescência dos solventes também foi medida e comparada com a das amostras estudadas a fim de evitar a atribuição de um sinal proveniente do solvente. As medidas dos solventes foram realizadas utilizando os mesmos parâmetros na aquisição do espectro de forma que suas intensidades podem ser diretamente comparadas.

2.2.6 Ressonância Magnética Nuclear

Quando uma partícula com momento magnético $\vec{\mu}$ diferente de zero é submetida a um campo magnético \vec{B}_0 , o torque criado ($\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0$) provoca a precessão da partícula com uma frequência proporcional ao módulo do campo aplicado [28], chamada frequência de Larmor.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) baseia-se no fato de que alguns núcleos apresentam momento magnético não nulo e, conseqüentemente, sofrerão a precessão descrita quando submetidos a um campo magnético. Cada tipo de núcleo tem uma frequência de Larmor característica que é função do campo magnético aplicado.

Nesta técnica, a amostra é imersa em um campo magnético constante e uniforme \vec{B}_0 e excitada por um intenso pulso eletromagnético transversal a \vec{B}_0 que desalinha os momentos magnéticos dos núcleos dos átomos. Ao fim do pulso, estes núcleos, ainda

sob ação do campo magnético, tendem a realizar a precessão de Larmor. Através da medida da magnetização transversal, é possível obter as frequências de ressonância nuclear presentes na amostra.

O RMN, no entanto, não é utilizado por sua habilidade de distinguir diferentes elementos, mas por sua resolução capaz de detectar pequenas diferenças nas frequências de ressonância entre núcleos de mesmo tipo. Uma vez que os elétrons orbitando o núcleo formam uma blindagem contra o campo magnético aplicado, os núcleos provam campos com intensidades diferentes de acordo com as ligações químicas destes átomos, o que produz deslocamentos na frequência de ressonância. Desta forma, este pequeno *shift* na frequência permite a elucidação das ligações químicas de determinados átomos na amostra.

Uma vez que as frequências de ressonância e os deslocamentos de frequência dependem da intensidade do campo aplicado, define-se uma grandeza adimensional chamada *deslocamento químico*, apresentada com unidade ppm (partes por milhão), que é calculada de forma a remover a dependência com a intensidade do campo magnético [32].

Neste trabalho, o RMN foi utilizado na determinação dos processos que ocorrem com as moléculas de Cisteína após sua adição às nanopartículas. As medidas foram realizadas pelo prof. Dr. Andersson Barison, do Departamento de Química da UFPR, e por sua aluna de doutorado Fernanda Ocampos. Foi utilizado o equipamento Bruker Ascend™600.

2.2.7 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X

Ao ser iluminada por uma radiação com energia maior do que sua função trabalho, uma amostra terá seus átomos ionizados devido à absorção da energia dos fótons incidentes por seus elétrons³. Estes elétrons são ejetados do material com uma energia cinética $E_{el\acute{e}tron}$ que pode ser calculada a partir do balanço de energia:

³Este é o Efeito Fotoelétrico, cuja explicação foi feita por Albert Einstein que recebeu, por isso, o Prêmio Nobel em 1922.

$$h\nu = E_L + E_{\text{el\u00e9tron}} + \phi_{\text{esp}}, \quad (2.11)$$

onde E_L \u00e9 a energia de liga\u00e7\u00e3o do el\u00e9tron e ϕ_{esp} \u00e9 a fun\u00e7\u00e3o trabalho do material do espectr\u00f4metro [33].

Na Espectroscopia de Fotoel\u00e9trons Excitados por Raios X (XPS, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), os el\u00e9trons ejetados do material durante a irradia\u00e7\u00e3o da amostra por um feixe monocrom\u00e1tico de raios X tem sua energia cin\u00e9tica medida. Conhecendo esta energia e a energia dos f\u00f3tons de raios X, pode-se determinar a energia de liga\u00e7\u00e3o dos el\u00e9trons atrav\u00e9s da Equa\u00e7\u00e3o 2.11.

Atrav\u00e9s desta t\u00e9cnica e utilizando os valores conhecidos de energias de liga\u00e7\u00e3o dos el\u00e9trons a mol\u00e9culas, \u00e9 poss\u00edvel determinar a composi\u00e7\u00e3o qu\u00edmica da regi\u00e3o irradiada pelo feixe. No entanto, a profundidade da qual os el\u00e9trons podem escapar do material sem sofrer espalhamento inel\u00e1stico [34] \u00e9, tipicamente, da ordem de 1 nm. Desta forma, o XPS fornece informa\u00e7\u00f5es referentes \u00e0 composi\u00e7\u00e3o da superf\u00edcie da amostra.

As medidas de XPS foram realizadas pelo prof. Dr. Wido Herwig Schreiner no Laborat\u00f3rio de Superf\u00edcies e Interfaces da UFPR.

Capítulo 3

Resultados e discussões

3.1 Caracterização

As nanopartículas produzidas em água e acetona adquiriram uma coloração marrom escura. O tempo máximo de ablação foi definido com base na observação de que, após dois minutos de irradiação, ocorre um acentuado decréscimo da taxa de produção de nanopartículas. Isto se deve ao grande número de partículas que ficam em suspensão no líquido recobrindo o alvo e que absorvem grande parte da energia do pulso.

As amostras em acetona se mostraram estáveis durante os vários meses ao longo dos



Figura 3.1: Nanopartículas produzidas através da ablação a laser de um alvo de bismuto em água (esquerda) e acetona (direita). Os coloides são visualmente indistinguíveis com uma coloração marrom escura.

quais elas foram observadas e, no entanto, os coloides produzidos em água agregaram e precipitaram num período de 1 a 2 dias. Este agregado apresenta uma coloração acinzentada e não pode ser desfeito mesmo através de longos períodos de ultrassonicação.

Com base nestas observações, estudamos amostras produzidas em água com adição do surfactante lauril sulfato de sódio (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*) à solução. Foi utilizada a solução comercial Tergipol, fabricada pela Biodinâmica, que apresenta concentração de 2,0 mg/mL de SDS em água. 2,0 mL de Tergipol foram diluídos em 2,0 mL de água e a ablação foi realizada nessa solução. Essas amostras tornaram-se estáveis.

Inicialmente, foi medido o espectro de absorção óptica das amostras. Os resultados são mostrados nas Figuras 3.2, 3.3 e 3.4.

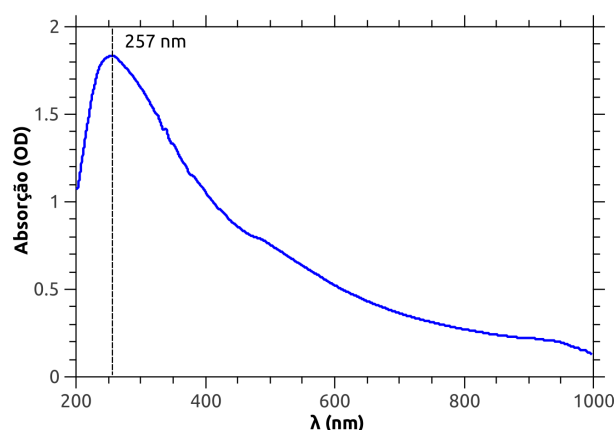


Figura 3.2: Espectro de absorção UV/Vis da amostra de BiNPs em água.

O pico em 257 nm corresponde à absorção relacionada à Ressonância de Plasmons de Superfície das nanopartículas de Bismuto [35], o que indica que as nanopartículas produzidas em água apresentam algum caráter metálico (não são compostas puramente por óxidos).

Já na acetona, observa-se um pico de absorção em maiores comprimentos de onda (~ 330 nm). No entanto, uma análise mais cuidadosa revelou que a queda da absorbância

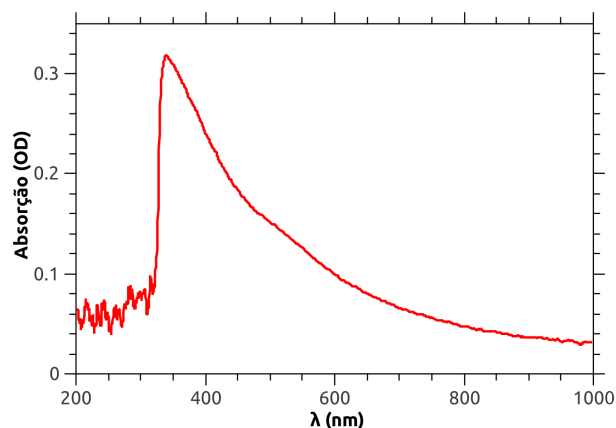


Figura 3.3: Espectro de absorção UV/Vis da amostra de BiNPs em acetona.

abaixo deste comprimento de onda é um artefato devido à intensa absorção da acetona. Uma vez que a intensidade de luz transmitida pelo solvente ($I_0(\lambda)$) para comprimentos de onda abaixo de 330 nm é muito próxima de zero, o cálculo da absorção se torna inválido nessa região do espectro (Equação 2.1) razão pela qual o espectro se torna ruidoso.

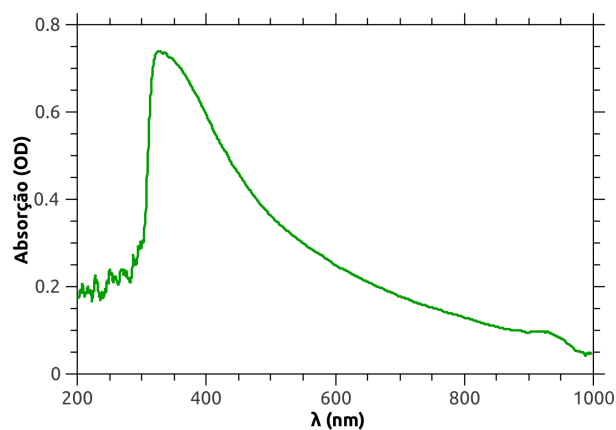


Figura 3.4: Espectro de absorção UV/Vis da amostra de BiNPs em água + SDS.

No espectro UV/Vis da amostra em água com adição do SDS observamos o mesmo artefato relacionado à intensa absorção de luz ultravioleta pelo solvente.

Uma sobreposição dos espectros mostra que as curvas são muito similares (a menos

de uma constante multiplicativa causada pela ligeira diferença na taxa de produção nos diversos solventes) até o ponto onde há o corte de transmissão do solvente. Estes espectros foram medidos também no espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 1050 por este possuir maior resolução e sensibilidade, mas não houve mudança observável nos resultados.

As amostras foram, então, analisadas através do DLS (Figuras 3.5, 3.6 e 3.7), de onde podemos obter a distribuição de tamanhos¹.

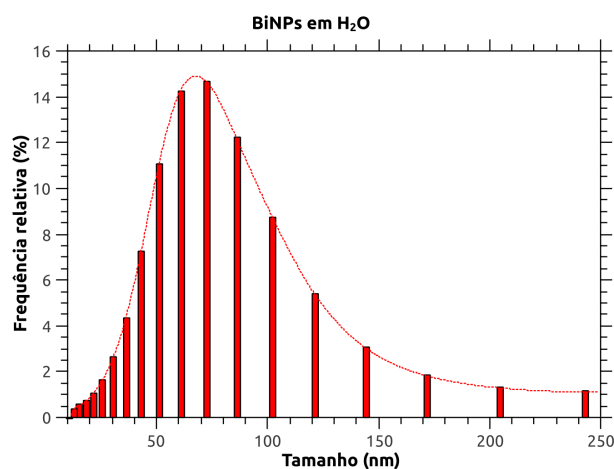


Figura 3.5: Distribuição de tamanhos obtida através da medida do DLS da amostra em água.

As amostras em água apresentam uma larga distribuição de tamanhos, tendo máxima frequência na região dos 70 nm. Pudemos ver na amostra em acetona, nanopartículas principalmente com diâmetros próximos a 60 nm. Já as amostras produzidas utilizando o SDS apresentam resultados que indicam a existência de duas famílias de nanopartículas centradas em 20 nm e em 90 nm.

Uma análise morfológica das nanopartículas produzidas é possível através da microscopia eletrônica de transmissão.

As imagens foram obtidas em épocas distintas e o dispositivo CCD de captura das

¹O termo *tamanho* se refere à dimensão característica da partícula, definido como o dobro do raio hidrodinâmico. Segue que para uma esfera perfeita, a dimensão característica é o diâmetro da partícula.

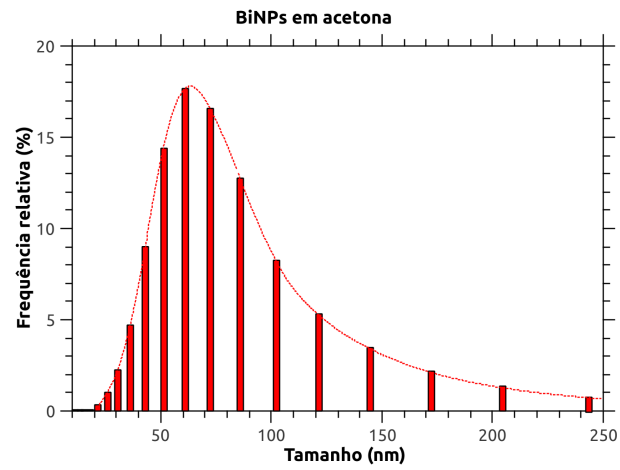


Figura 3.6: Distribuição de tamanhos obtida através da medida do DLS da amostra em acetona.

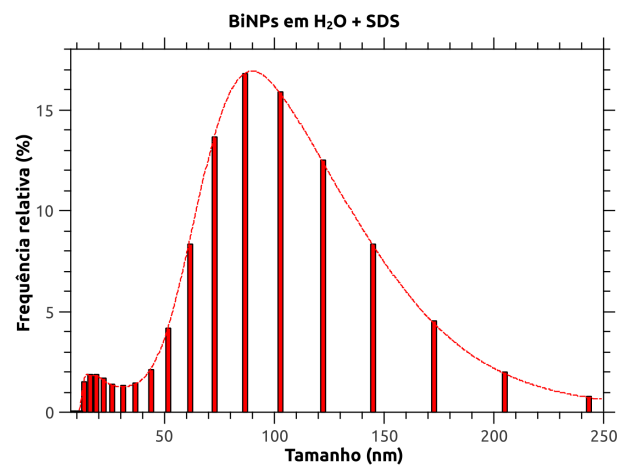


Figura 3.7: Distribuição de tamanhos obtida através da medida do DLS da amostra em água + SDS.

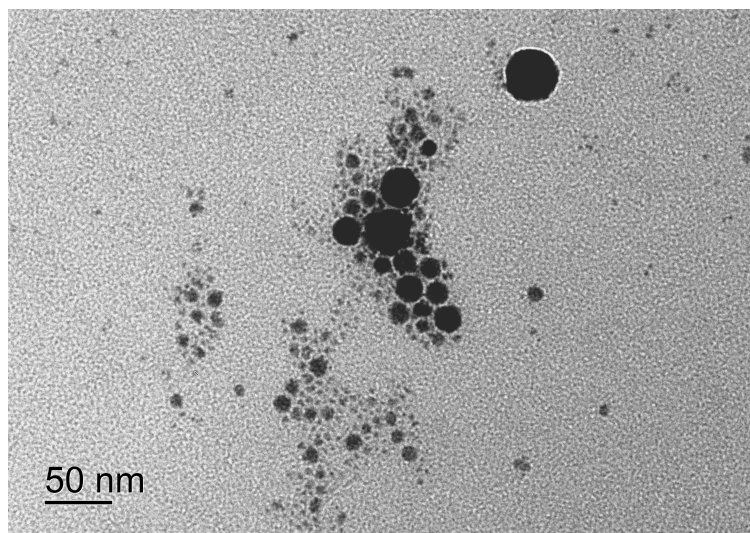


Figura 3.8: Imagem de TEM da amostra de BiNPs em água — Ampliação: 40 kX

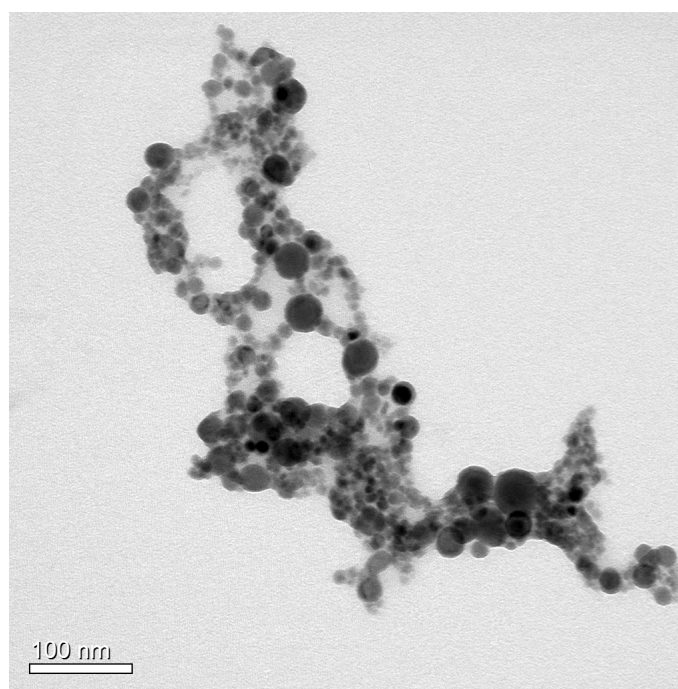


Figura 3.9: Imagem de TEM da amostra de BiNPs em acetona — Ampliação: 200 kX

imagens do microscópio foi substituído, de forma que há uma significativa superioridade na resolução e no contraste da imagem das nanopartículas produzidas em água (figuras 3.8 e 3.9).

Observa-se que, para ambos os solventes, as partículas apresentam formato esférico e que a grande maioria tem diâmetro menor do que 40 nm. A discordância desta observação com o resultado do DLS pode ser causada por dois fatores principais. Conforme mostrado na Seção 2.2.2, o DLS é uma técnica que permite a determinação indireta do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão no fluido. Portanto, caso haja agregados de nanopartículas se difundindo no fluido, estes serão detectados como sendo uma única partícula maior.

Outra possível razão para essa diferença é que a intensidade do espalhamento Rayleigh por uma partícula esférica é proporcional ao seu diâmetro na sexta potência [36]. Assim, o DLS detectará a influência das partículas maiores com uma intensidade mais elevada, revelando uma distribuição onde há uma maior frequência relativa de partículas grandes. É possível concluir que, embora os algoritmos utilizados na análise da função de autocorrelação busquem correções para este efeito, a análise de soluções com largas distribuições de tamanho utilizando o DLS deve ser feita com cuidado.

Conforme discutido no Capítulo 1, espera-se que partículas de Bi com as dimensões observadas (< 50 nm) apresentem propriedades de confinamento. Na tentativa de observar sinais de emissão luminosa com origem na transição de níveis discretizados por este confinamento, prosseguimos para os estudos de fotoluminescência. Abaixo são mostrados os espectros obtidos (detalhes do experimento na Seção 2.2.5).

O espectro de fotoluminescência da água exibe um pico em 381 nm (3,25 eV). Ao calcularmos a diferença nos números de onda desta emissão e da fonte de excitação (337 nm), obtemos:

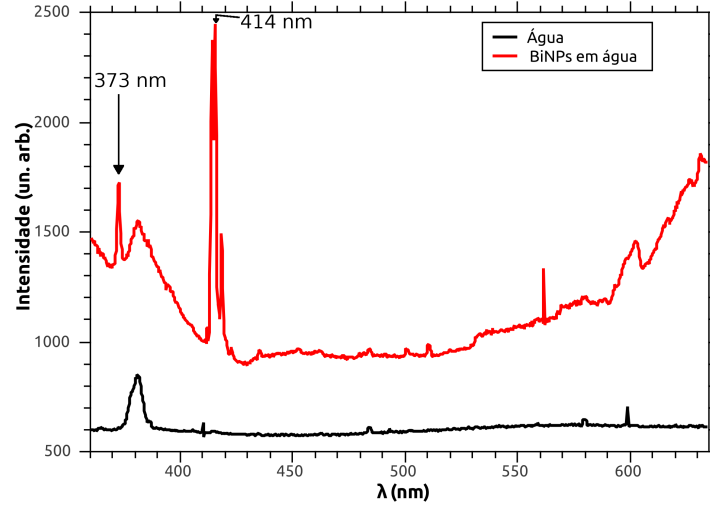


Figura 3.10: Espectro de fotoluminescência da água e das BiNPs em água.

$$\Delta k = k_{laser} - k_{emissão} = \frac{1}{\lambda_{laser}} - \frac{1}{\lambda_{emissão}} = 3427 \text{ cm}^{-1}$$

Notamos que este número de onda está no centro da banda de absorção de infravermelho da água [37] e, portanto, associamos o sinal em 381 nm ao espalhamento inelástico (espalhamento Raman) pelas moléculas de água.

Na medida das nanopartículas em água, conforme esperado, também podemos observar o pico do espalhamento inelástico. Além deste, é perceptível um sinal em 373 nm (3,32 eV) e outro, ainda mais intenso, em 414 nm (2,99 eV).

A emissão luminosa foi, a princípio, atribuída à recombinação entre estados discretos originados pelo confinamento mencionado anteriormente, mas esta explicação foi descartada com base nas larguras dos sinais de luminescência. Caso o efeito fosse provocado pelo confinamento, haveria uma relação direta entre o tamanho das nanopartículas e sua energia de emissão de modo que, para uma distribuição grande de tamanhos, teríamos uma banda de emissão larga.

A origem das emissões em 373 nm e em 414 nm permanece sem nenhuma explicação

até o presente momento.

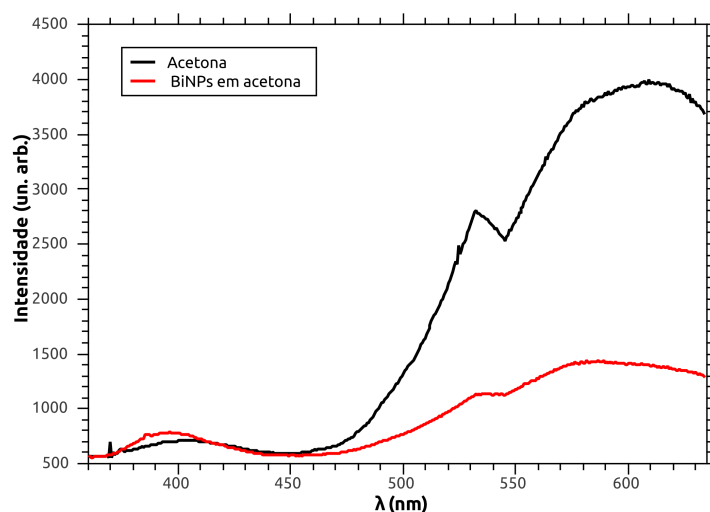


Figura 3.11: Espectro de fotoluminescência da acetona e das BiNPs em acetona.

Na amostra de nanopartículas em acetona não foi possível observar nenhum sinal distinguível do sinal do próprio solvente. Isso se deve parcialmente ao fato de que a acetona apresenta grande fluorescência quando iluminada por UV, de forma que sua intensa emissão encobriria a possível emissão das nanopartículas. Além disso, a intensa absorção da acetona em $\lambda = 337$ nm não permite que o laser penetre com intensidade razoável mais do que poucos milímetros na solução, de forma que apenas um número pequeno de nanopartículas será excitada, o que contribuiria para a baixa intensidade na emissão.

Contudo, a mudança nas intensidades relativas entre as bandas < 450 nm e > 450 nm indica alguma contribuição das nanopartículas na primeira banda de emissão da acetona.

Para obter informações sobre a composição da superfície das nanopartículas produzidas, elas foram submetidas à análise através do XPS. Para isso, foram depositados 4 mL de cada amostra a ser estudada sobre um substrato de silício. A deposição foi feita lentamente: gota a gota, aguardando a evaporação do solvente, de forma a haver

a formação de um filme constituído pelas nanopartículas secas.

No entanto, a baixa estabilidade das nanopartículas em água conduziu a problemas durante a preparação das amostras. Durante a secagem de cada gota, as nanopartículas presentes nesta agregaram, ocorrendo a formação do material acinzentado descrito no início deste capítulo. Esse problema foi contornado através da adição do surfactante SDS após a produção da amostra em água.

Os espectros de XPS das nanopartículas em água + SDS e em acetona são mostrados nas Figuras 3.12 e 3.13.

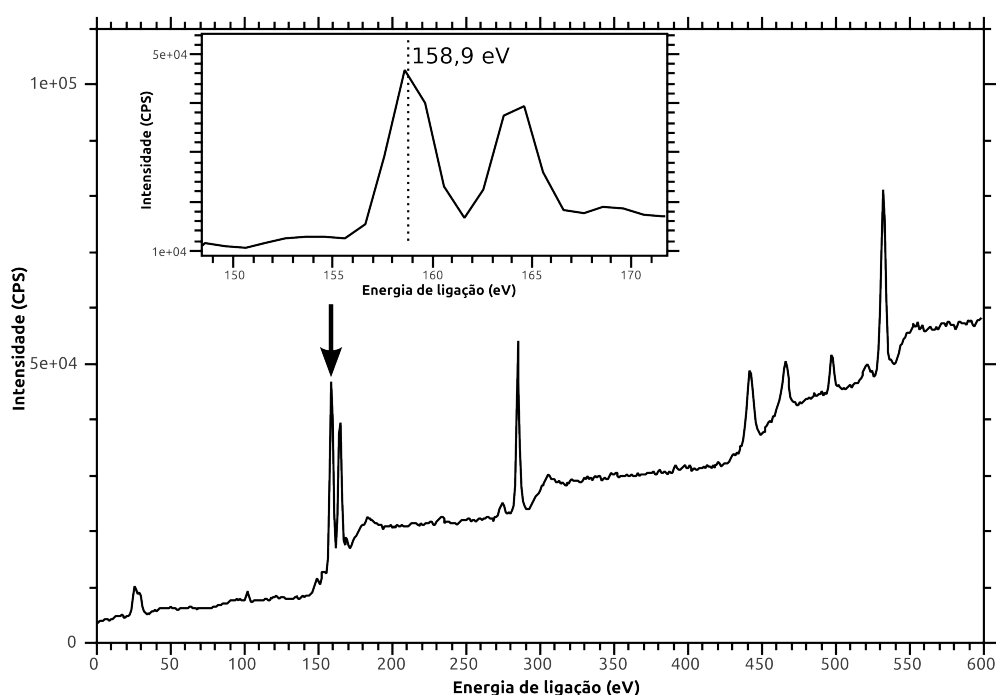


Figura 3.12: Espectro de XPS da amostra de BiNPs produzidas em água + SDS.

Podemos observar a existência de diversos picos, a maioria relacionada à presença do SDS. O pico relacionado ao bismuto apresenta baixa intensidade e está localizado em 158,9 eV.

Na amostra em acetona o sinal das nanopartículas apresenta uma maior intensidade relativa aos demais picos devido à ausência de surfactantes. No entanto, ainda é possível

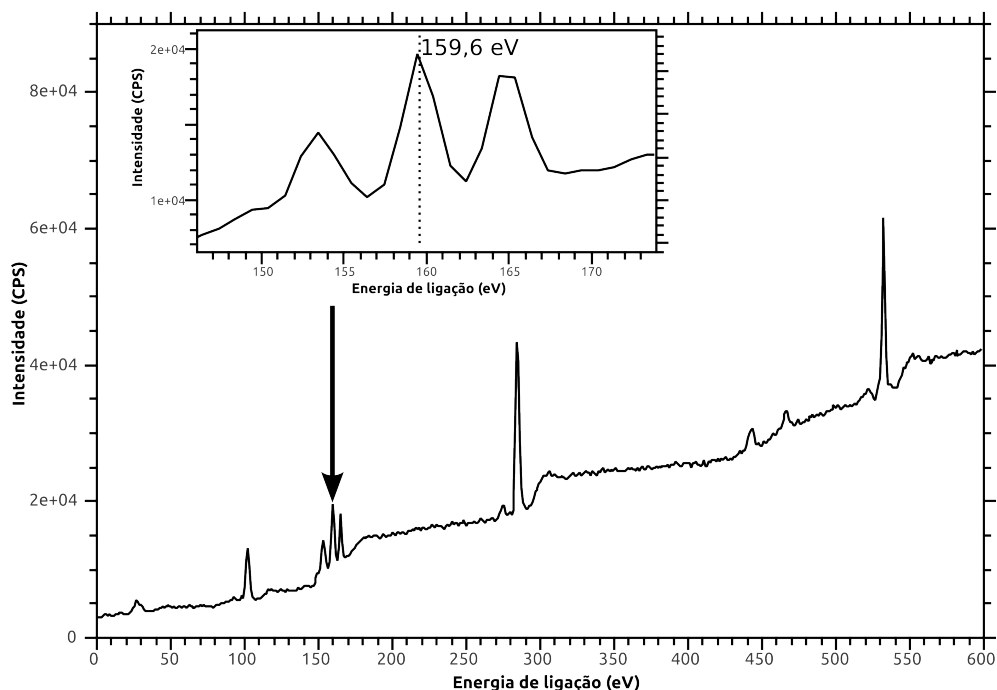


Figura 3.13: Espectro de XPS da amostra de BiNPs produzidas em acetona.

observar os sinais dos resíduos deixados pela acetona após evaporação. Observa-se, aqui, o sinal referente ao bismuto em 159,6 eV. Ainda observamos o pico referente ao orbital $2s$ do silício próximo a 153 eV. Este pico não está presente na medida da amostra em água com SDS devido à cobertura do substrato por este surfactante.

De acordo com as bases de dados disponíveis, as energias de ligação dos elétrons observados pelo XPS do orbital $4f^{7/2}$ do bismuto metálico e do óxido de bismuto (Bi_2O_3) são, respectivamente, de 157,0 eV e de 159,5 eV. Estes resultados mostram que as nanopartículas produzidas em água e em acetona apresentam uma superfície oxidada.

Na água, a oxidação pode ocorrer através da reação com o oxigênio disponível no solvente. No entanto, na acetona, onde não há oxigênio em solução, a existência de um certo grau de oxidação sugere que as moléculas do solvente estão sendo destruídas durante a ablação. No entanto, acreditamos que as nanopartículas tenham oxidado

durante a secagem, na preparação das amostras para a realização do XPS.

3.2 Interação com aminoácidos

Para estudar a possibilidade da utilização das nanopartículas produzidas em água (não foram utilizadas as amostras produzidas em acetona pois este solvente não é compatível com sistemas biológicos) como um sensor de algum tipo de aminoácido, prosseguimos com a mistura destes em busca de modificações facilmente detectáveis de suas propriedades físicas, como formação de agregados visíveis ou mudança da cor do coloide.

Foram estudados os seguintes aminoácidos: Leucina, Valina, Tirosina, Fenilalanina, Histidina, Glicina, Isoleucina, Ácido Aspártico, Metionina, Treonina, Serina, Ácido Glutâmico, Arginina, Asparagina, Glutamina, Prolina e Cisteína. As estruturas moleculares destes aminoácidos são apresentadas no Apêndice A.

Nessa etapa o coloide de BiNPs foi misturado a uma solução com aproximadamente 5 mM (milimolar) de cada aminoácido em uma proporção de 50%. Estas soluções foram então comparadas (visualmente) à amostra de BiNPs diluída na mesma proporção em água. O resultado desta experiência está ilustrado na figura 3.14.

Nenhum dos aminoácidos apresenta qualquer modificação perceptível ao olho exceto pela amostra em que foi adicionada cisteína, que se torna completamente transparente após poucos segundos. É importante ressaltar que não ocorreu a precipitação de nanopartículas. Esse resultado aponta para a possibilidade da utilização das nanopartículas de bismuto como um sensor seletivo de cisteína.

Observamos que a amostra em que foi adicionada cisteína, e somente esta, se torna estável por longos períodos de tempo. A primeira hipótese apresentada é a de que ocorreu a funcionalização da nanopartícula pelo aminoácido, de forma que este impede a formação de agregados, como ilustrado na figura 3.15.



Figura 3.14: BiNPs diluídos em (a) água, (b) leucina, (c) valina, (d) tirosina, (e) fenilalanina, (f) histidina, (g) glicina, (h) isoleucina, (i) ácido aspártico, (j) metionina, (k) treonina, (l) serina, (m) ácido glutâmico, (n) arginina, (o) asparagina, (p) glutamina, (q) prolina e (r) cisteína.

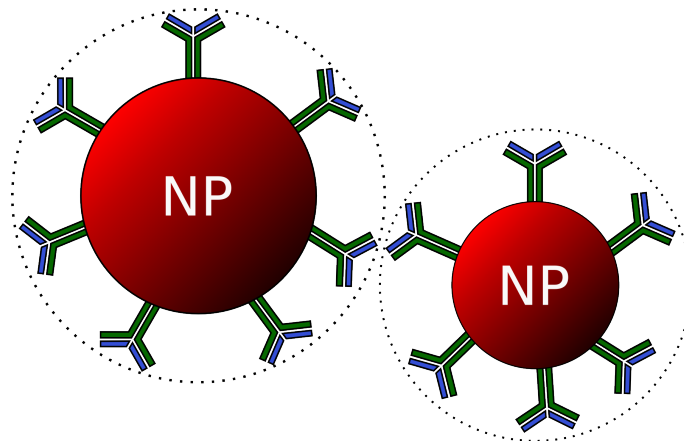


Figura 3.15: Ilustração de moléculas ligadas quimicamente às nanopartículas impedindo a formação de agregados de nanopartículas.

A cisteína é um aminoácido presente em diversas proteínas do corpo humano e, além disso, assume funções reguladoras do metabolismo e de diversos processos como o de oxirredução, síntese de proteínas e desintoxicação. Níveis anormais de cisteína são associados a uma série de problemas indo de lesões na pele a danos no cérebro [38], de forma que seu uso se faz necessário em uma série de medicamentos e complementos alimentares.

A necessidade de realizar a determinação de concentrações deste aminoácido faz com que várias técnicas de detecção sejam empregadas. Usualmente utilizam-se técnicas como a cromatografia de líquidos, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), a espectrometria de massa, entre outras [39]. Para estudar a possibilidade da utilização das nanopartículas produzidas neste trabalho na determinação quantitativa da concentração de cisteína em uma solução aquosa, realizamos um estudo mais aprofundado dos mecanismos de interação das BiNPs com a cisteína.

3.3 Interação das nanopartículas de bismuto com a cisteína

Analisando as estruturas químicas dos aminoácidos estudados, notamos que o radical que difere a cisteína dos demais é o radical sulfanilo (SH). Este radical apresenta alta reatividade — já foram relatadas interações da molécula de cisteína com nanopartículas de óxido de vanádio [40, 8] e de prata [7] através do grupo SH .

Para testar a reatividade das nanopartículas produzidas com radicais contendo enxofre adicionamos uma gota de uma solução aquosa de tiosulfato de sódio às nanopartículas. Em solução aquosa, há a separação do sódio e do ânion tiosulfato, representado na figura 3.16.

Imediatamente após a adição o coloide começou a mudar sua aparência. Após um minuto, a amostra apresentava coloração amarelo-esverdeada, conforme mostrado na

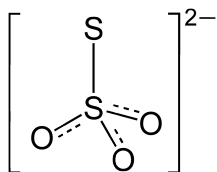


Figura 3.16: Estrutura do ânion tiosulfato.

figura 3.17.



Figura 3.17: BiNPs produzidas em água sem (esquerda) e com (direita) adição de tiosulfato de sódio.

Dessa forma, fica verificada positivamente a alta reatividade das nanopartículas produzidas com radicais contendo enxofre. Somando isto ao fato de que a cisteína foi o único aminoácido reativo, sugerimos que o mecanismo responsável pela modificação da cor das BiNPs envolve reações iniciadas pelo grupo sulfanilo. Investigações mais aprofundadas sobre este mecanismo serão apresentadas.

Focando na aplicabilidade das BiNPs na detecção de cisteína, investigamos a resposta das amostras a diferentes concentrações do aminoácido. Foram preparadas soluções contendo BiNPs e diferentes concentrações de cisteína variando em escala logarítmica de 8,85 nM até 8,85 mM (figura 3.18).

Observa-se que ocorre a transição abrupta de coloração na faixa entre 88,5 μM e 885 μM . Na figura 3.19, podemos ver os espectros de UV/Vis destas amostras.

Vemos que a mudança da coloração marrom para o transparente se deve à queda de absorção logo no início da região visível do espectro (> 400 nm). Na amostra com 885 μM , o pico de absorção localizado na região de ressonância dos plasmons de superfície (257 nm) não se altera e uma banda distinta de absorção se torna evidente.

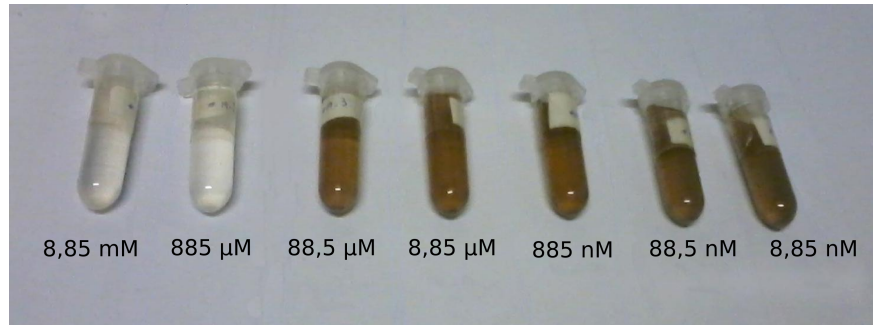


Figura 3.18: BiNPs com adição de diferentes concentrações de cisteína.

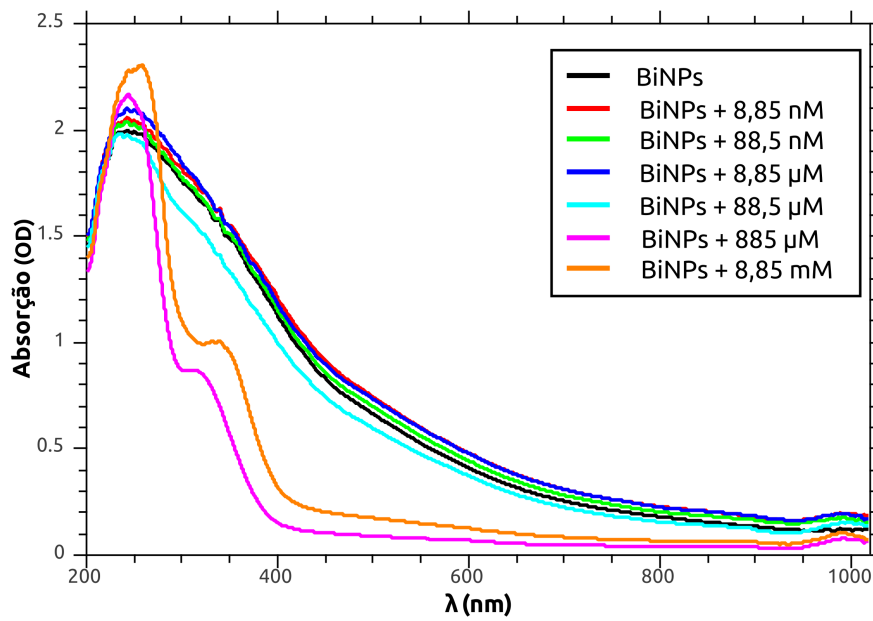


Figura 3.19: UV/Vis das amostras de BiNPs com diferentes concentrações de cisteína.

Através do ajuste de duas funções gaussianas, é possível determinar que a posição do centro desta segunda banda é 322 nm.

Na amostra com 8,85 mM ocorre um ligeiro *redshift* no pico de ressonância dos plasmons de superfície e a segunda banda se torna mais evidente. Utilizando o mesmo procedimento, verificamos que esta segunda banda está centrada em 338 nm.

Para analisar a faixa de transição, refizemos a mesma experiência variando a concentração de cisteína entre 80 e 800 μM . É possível observar o gradiente de coloração das amostras na figura 3.20.

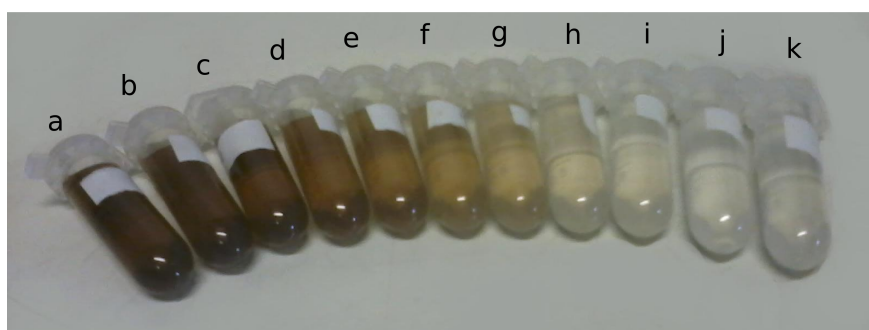


Figura 3.20: BiNPs com adição de (a) 0, (b) 80, (c) 160, (d) 240, (e) 320, (f) 400, (g) 480, (h) 560, (i) 640, (j) 720 e (k) 800 μM de cisteína.

Os espectros de UV/Vis são mostrados na figura 3.21.

Com a adição de 80 μM de cisteína, ocorre um acréscimo na absorbância para quase todo o espectro. A partir daí, o aumento na concentração de cisteína provoca o decréscimo da absorção, sobretudo a partir dos 400 nm. Através desse experimento, foi possível observar a gradual intensificação de uma banda de absorção próxima a 320 nm.

A curva pontilhada na figura 3.21 representa a absorção de uma solução de cisteína com concentração de 1,6 mM (o dobro da concentração na amostra de BiNPs com maior quantidade do aminoácido). A comparação desta curva com os espectros de absorção das amostras de nanopartículas revela que a segunda banda de absorção não é resultado da soma da absorção da cisteína e, portanto, é devida ao produto da interação entre esta com as nanopartículas.

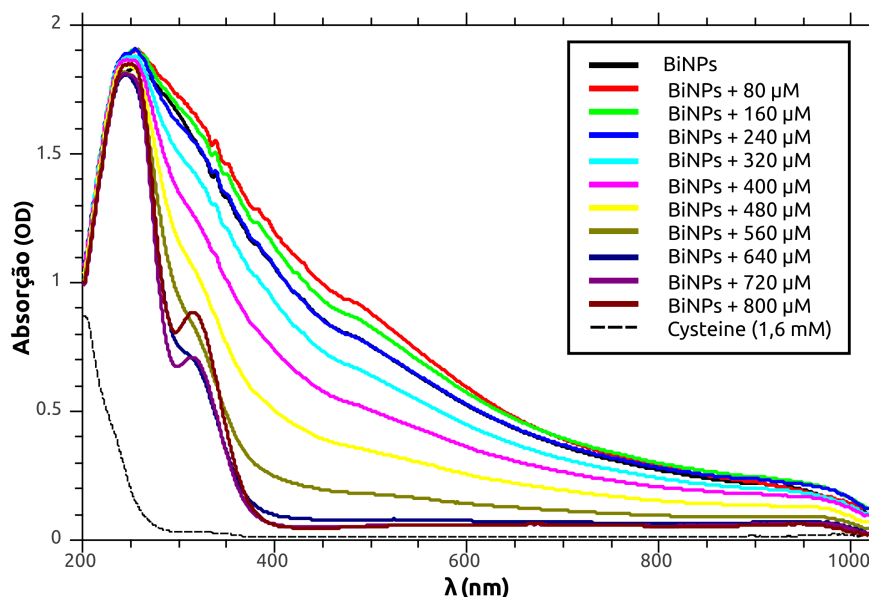


Figura 3.21: UV/Vis das amostras de BiNPs com diferentes concentrações de cisteína e de uma solução aquosa de cisteína.

Uma das hipóteses levantadas para explicar o que leva à modificação do espectro de absorção das nanopartículas é de que as moléculas de cisteína poderiam estar se ligando quimicamente às nanopartículas. Li *et al.* observaram [5] a modificação na posição do pico de absorção por ressonância de plasmões de superfície de nanopartículas de ouro após a ligação das nanopartículas a determinadas moléculas.

Outra hipótese levantada foi de que poderia estar ocorrendo um processo de oxidação/redução entre nanopartículas e moléculas de cisteína. Para determinar se estava ocorrendo o surgimento ou desaparecimento de algum óxido com a adição do aminoácido, realizamos medidas de difração de raios X nas amostras de BiNPs puras e de BiNPs com aproximadamente 10 mM de cisteína. As amostras foram preparadas como descrito na Seção 2.2.3.

As amostras de BiNPs puras se mostraram bastante sensíveis à centrifugação, formando duas fases distintas. As amostras com cisteína (transparentes) aparentaram não sofrer qualquer modificação durante a centrifugação — não foi possível notar a

presença de nanopartículas decantadas, mas a coleta do líquido da região supostamente mais concentrada foi feita da mesma maneira.

Os difratogramas das amostras são apresentados nas figuras 3.22 e 3.23.

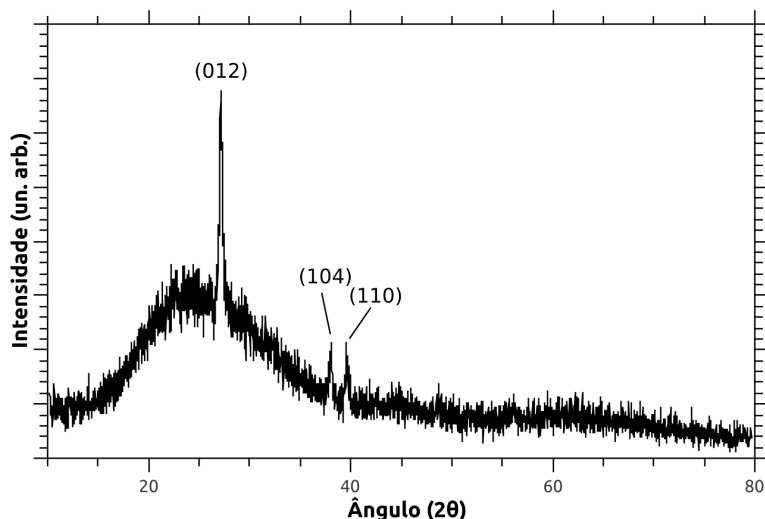


Figura 3.22: Difratograma da amostra de BiNPs sem cisteína. Os picos indexados são pertencentes ao bismuto metálico.

Todos os picos observados na amostra foram identificados como tendo sido produzidos pelos planos (012), (104) e (110) do bismuto metálico através da comparação com a base de dados cristalográfica do ICDD. A banda larga centrada próximo a 25° é referente ao espalhamento produzido pela água e pelo substrato de vidro.

A completa ausência do sinal de difração do Bi_2O_3 indica que, se há óxidos nas nanopartículas, eles ocorrem em pequenas regiões de forma que sua intensidade de difração é imperceptível. Comparando com os resultados do XPS, sugerimos que as nanopartículas produzidas apresentam uma estrutura do tipo *core-shell*, com uma fina camada de óxido na superfície e núcleo metálico, sendo que esta superfície pode estar sendo oxidada durante a secagem das amostras.

A ausência de picos de difração na amostra com cisteína é o resultado de um problema sistemático na preparação das amostras. Durante a centrifugação, as nanopartícu-

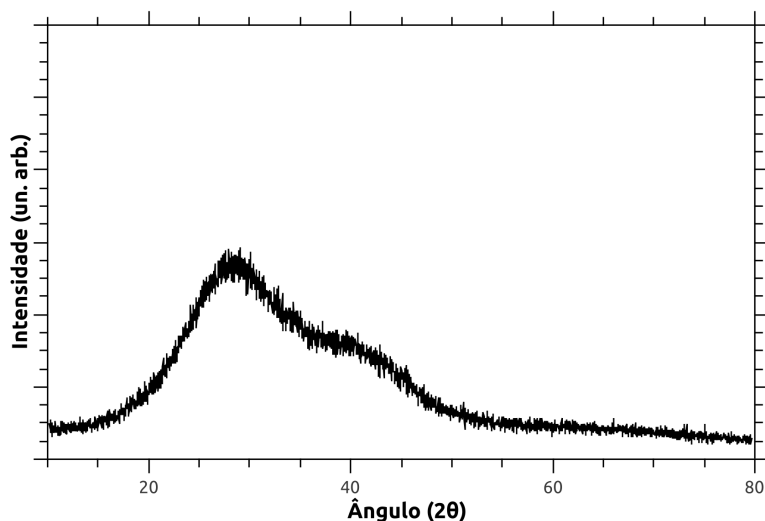


Figura 3.23: Difratograma da amostra de BiNPs com cisteína.

las não se agruparam no fundo do *ependorf*, de modo que a amostra preparada não continha uma concentração grande o suficiente para difratar o feixe com intensidade detectável.

A experiência foi refeita utilizando uma amostra preparada através da centrifugação a uma velocidade de rotação de 14000 rpm. Nesta velocidade, as nanopartículas das amostras sem cisteína decantaram no fundo do recipiente, de onde não foi mais possível removê-las. No entanto, o resultado com a amostra com cisteína permaneceu o mesmo.

Uma vez que a amostra sem cisteína não apresenta grande estabilidade, houve a suspeita de que suas nanopartículas agregassem e que, só então, elas fossem agrupadas no fundo do recipiente. Como as nanopartículas com cisteína se tornam estáveis, o mesmo não aconteceria. Para verificar se a velocidade de centrifugação é adequada, consideramos o potencial associado à força inercial² provada pelas nanopartículas no referencial não-inercial do recipiente que está sendo rotacionado. Por brevidade, chamaremos estas grandezas de *potencial centrífugo* e de *força centrífuga*, respectivamente.

²Forças inerciais não são forças reais, sendo introduzidas como um artifício que permite a escrita das equações de movimento de partículas num referencial não inercial através de equações semelhantes à de Newton: $\vec{F} = m\vec{a}$

Considera-se um grupo de partículas não interagentes de raio r , sendo centrifugadas a uma velocidade angular ω . A centrifugação é feita através da rotação do recipiente com profundidade h localizado a uma distância R do centro de rotação, conforme ilustrado na figura 3.24.

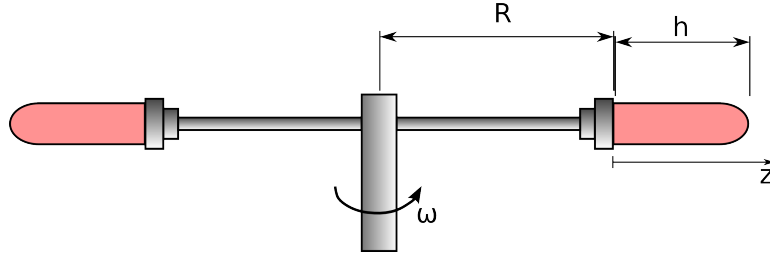


Figura 3.24: Ilustração do processo de centrifugação.

A força centrífuga provada por uma partícula na posição z no referencial não-inercial do recipiente é dada por:

$$\vec{F}_C = \left[(\rho_{Bi} - \rho_{\acute{a}gua}) \frac{4}{3} \pi r^3 \right] \omega^2 (R + z) \hat{z},$$

onde ρ_{Bi} é a densidade de massa da partícula e $\rho_{\acute{a}gua}$ é a densidade de massa da água. O potencial centrífugo U_C associado a esta força obedece à equação $\vec{\nabla} U_C = -\vec{F}_C$. Como estamos interessados apenas nas ordens de grandeza, assumimos que $R \gg h$ (de fato, $h \approx 0,15R$) de forma que $R + z \approx R$. Com esta aproximação, o potencial assume uma forma simples:

$$U_C(z) = -F_C z = - \left(\rho \frac{4}{3} \pi r^3 \right) \omega^2 R z, \quad (3.1)$$

onde definimos $\rho = \rho_{Bi} - \rho_{\acute{a}gua}$.

Se as nanopartículas apresentam uma energia que é função da posição z , podemos calcular a distribuição de nanopartículas para cada posição utilizando a distribuição de Boltzmann [41]:

$$n = \exp\left(-\frac{U_C(z) - U_C(h)}{kT}\right) = \exp\left[\left(\frac{4}{3}\pi r^3\right) \frac{\omega^2 R(z - h)}{kT}\right], \quad (3.2)$$

onde k é a constante de Boltzmann. Substituindo as variáveis por seus valores reais ou aproximados ($\rho = \rho_{Bi} - \rho_{\text{água}} = 8,78 \text{ g/cm}^3$, $R = 10 \text{ cm}$, $\omega = 1466 \text{ rad/s}$, $h = 1,5 \text{ cm}$, $T = 300 \text{ K}$), temos a seguinte distribuição.

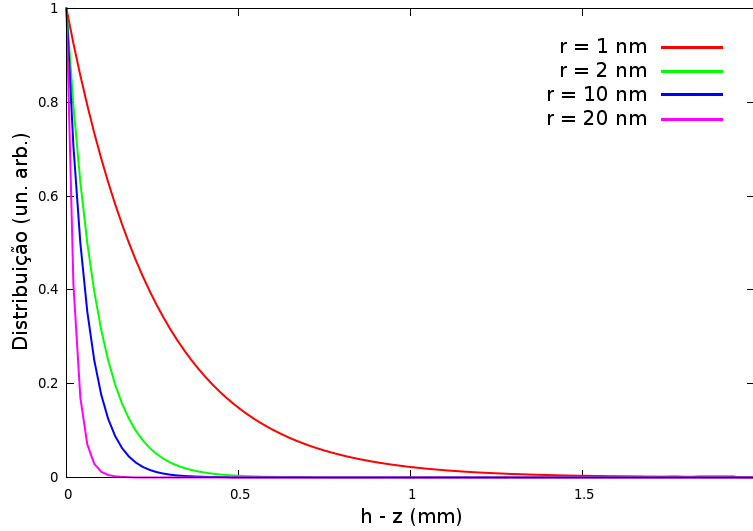


Figura 3.25: Distribuição de Boltzmann em função da posição para nanopartículas com diferentes raios após centrifugação.

Este resultado deixa claro que mesmo as nanopartículas pequenas (com 2 nm de diâmetro) deveriam ter sido agrupadas no fundo do *ependorf* (de fato, a grande maioria deveria ficar contida numa região a menos de 1 mm do fundo). Uma vez que as nanopartículas em cisteína apresentaram resultados diferentes deste, é sugerido que a diferença entre o processo descrito e a amostra estudada encontra-se na consideração inicial de que as nanopartículas são não interagentes.

As amostras de nanopartículas com e sem cisteína foram então levadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

Nestas amostras, as nanopartículas foram encontradas apenas em regiões com acúmulo de cisteína, que ocorreram nas proximidades da parte metálica do porta-amostras,

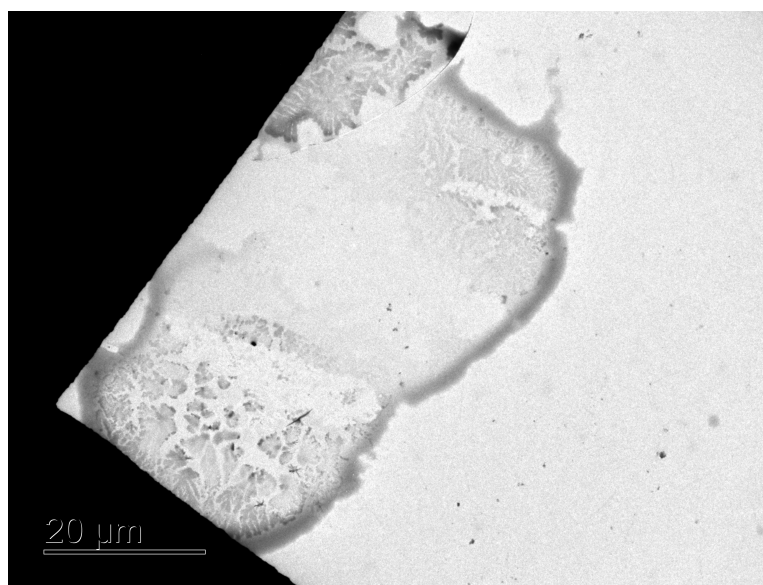


Figura 3.26: Imagem de TEM das amostras com adição de cisteína sob baixa magnificação. Observa-se o acúmulo de cisteína próximo à região metálica do porta-amostra — Ampliação: 250 X

conforme mostrado na figura 3.26. A localização das nanopartículas preferencialmente próximas às grades de cobre é um indício de que as nanopartículas apresentam acúmulo de cargas eletrostáticas.

O acúmulo de cargas eletrostáticas explica também a impossibilidade de agrupar grandes quantidades de nanopartículas através da centrifugação, uma vez que a repulsão eletrostática entre elas fará o papel de mantê-las em suspensão. Essa hipótese ainda explica a estabilidade adquirida pela amostra após adição de cisteína.

A imagem de TEM de alta magnificação das amostras com cisteína é apresentada na figura 3.27.

Observa-se nessa figura a presença de nanopartículas com formatos mais irregulares do que as produzidas em água (figura 3.8). Essa aparente mudança de formato das NPs ainda requer um estudo mais detalhado, mas em algumas delas é possível observar a existência de um contorno mais claro, o que poderia representar um acúmulo de cisteína em torno das nanopartículas. Se este acúmulo existe e se ele já ocorre quando

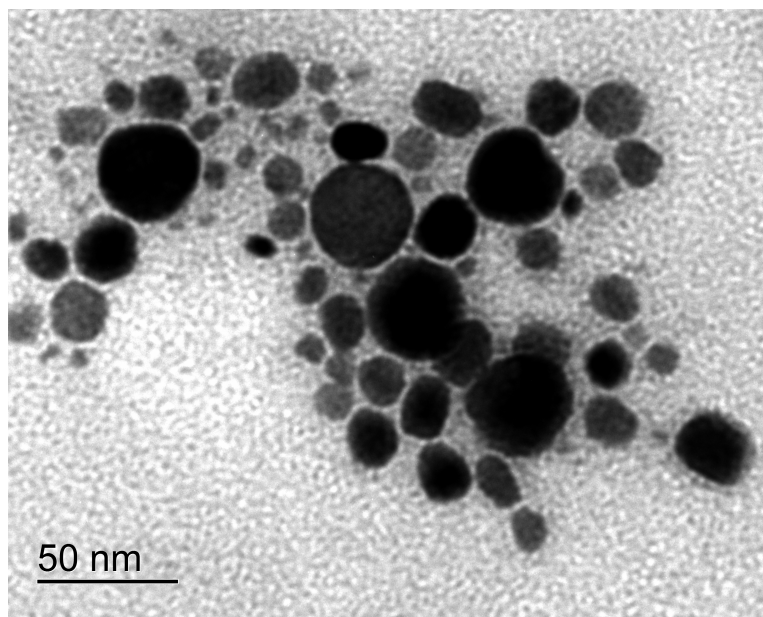


Figura 3.27: Imagem de TEM das nanopartículas com adição de cisteína — Ampliação: 80 kX

as nanopartículas estão em solução, ele explicaria a modificação do espectro de UV/Vis das nanopartículas [5].

As amostras ainda foram analisadas através de SAED. Os resultados são mostrados nas figuras 3.28 e 3.29.

A identificação das estruturas foi feita através da comparação entre as distâncias interplanares calculadas e o banco de dados do ICDD, admitindo desvios relativos máximos entre o valor calculado e o valor tabelado de 3%. Foram considerados apenas os planos que difratam com maior intensidade (no mínimo 10% da intensidade do pico de difração mais intenso para aquele material). Esse resultado é apresentado na tabela 3.1.

A amostra sem cisteína apresenta a fase metálica do Bi e a fase β do Bi_2O_3 . A presença de um óxido já era esperada pelos resultados de XPS. A relação entre os números de *spots* relacionados a cada fase confirmam que a quantidade de óxido é bastante reduzida e, como os resultados das outras técnicas já apresentados sugerem,

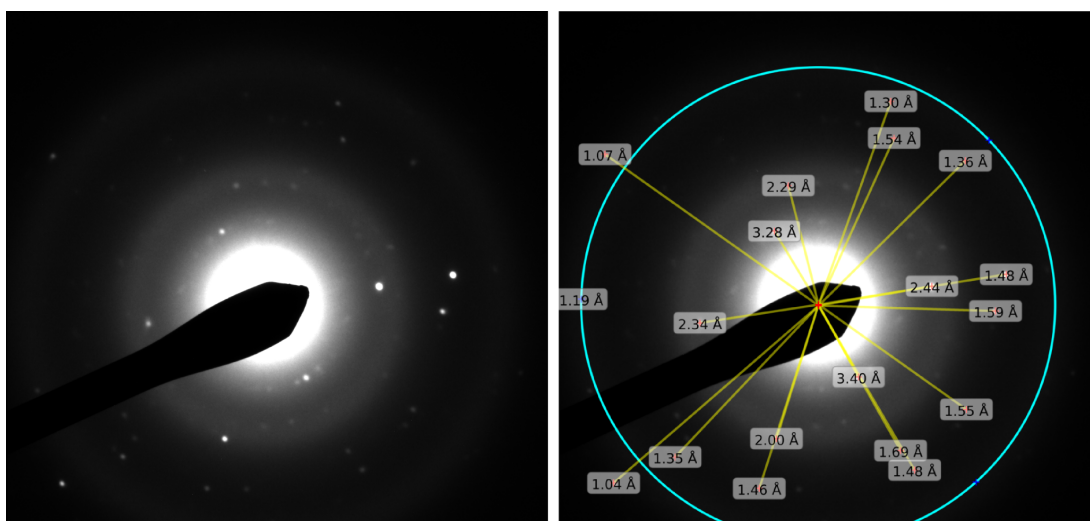


Figura 3.28: Padrão obtido pela difração de elétrons em área selecionada das nanopartículas produzidas em água sem adição de cisteína (esquerda) e o mesmo padrão com inclusão dos valores das distâncias interplanares calculadas para cada *spot* (direita). O círculo azul envolve o padrão de espalhamento produzido pelo filme amorfo de carbono do porta-amostras e foi utilizado para definir o centro do padrão de difração com maior precisão.

Tabela 3.1: Tabela dos valores calculados de distâncias interplanares d , identificados e indexados de acordo com o banco de dados do ICDD — Amostra sem cisteína.

d (Å)	Material	$h k l$	d_{tabelado} (Å)	Desvio (%)
3,40	$\beta - Bi_2O_3$	2 1 0	3,4619	1,8
3,28	Bi	0 1 2	3,2800	0,0
2,44	Bi	1 0 4	2,3700	3,0
2,34	Bi	1 0 4	2,3700	1,3
2,29	Bi	1 1 0	2,2730	0,7
2,00	Bi	1 1 2	1,9700	1,5
1,69	$\beta - Bi_2O_3$	2 0 3	1,6896	0,0
1,59	$\beta - Bi_2O_3$	4 0 2	1,5951	0,3
1,55	Bi	1 0 7	1,5560	0,4
1,54	Bi	1 0 7	1,5560	1,0
1,48	Bi	1 1 6	1,4910	0,7
1,46	Bi	1 2 2	1,4430	1,2
1,36	Bi	2 1 4	1,3300	2,3
1,35	Bi	2 1 4	1,3300	1,5
1,30	Bi	2 1 4	1,3300	2,3
1,07	Bi	3 1 2	1,0738	0,4
1,04	Bi	0 1 11	1,0399	0,0

presente apenas na superfície da amostra.

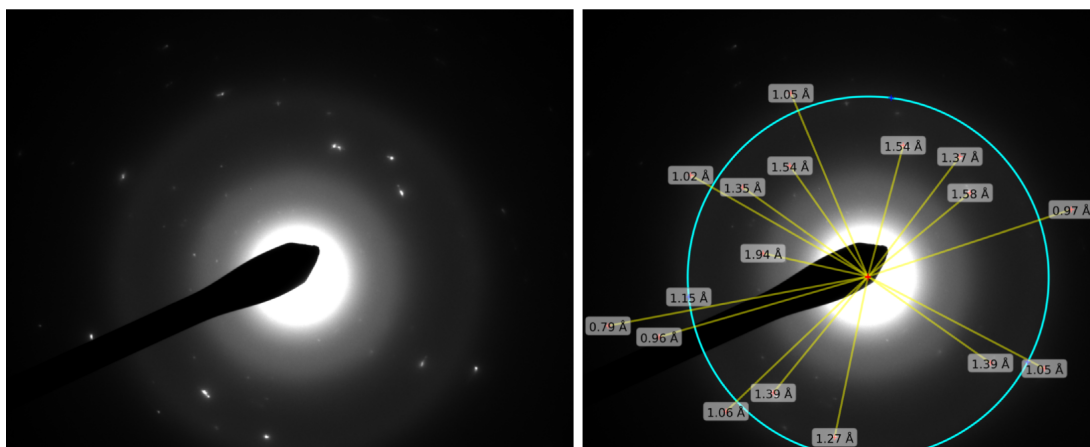


Figura 3.29: Padrão obtido pela difração de elétrons em área selecionada das nanopartículas produzidas em água com adição de cisteína (esquerda) e o mesmo padrão com inclusão dos valores das distâncias interplanares calculadas para cada *spot* (direita). O círculo azul envolve o padrão de espalhamento produzido pelo filme amorfo de carbono do porta-amostras e foi utilizado para definir o centro do padrão de difração com maior precisão.

Vários valores de distâncias interplanares não foram identificados como pertencendo a nenhum dos compostos conhecidos do bismuto. Estes são relacionados, provavelmente, a compostos baseados na cisteína.

Entre os compostos identificados estão o Bi metálico e a fase β do óxido de bismuto, um resultado idêntico ao da nanopartícula sem adição de cisteína. Desta forma, descartamos a ação da cisteína como um agente redutor ou oxidante da nanopartícula.

Como o SAED não apontou modificações estruturais nas nanopartículas, foram realizadas medidas de ressonância magnética nuclear na tentativa de elucidar o mecanismo de interação entre cisteína e BiNPs. Foi medido o deslocamento químico do núcleo 1H para rastrear as reações ocorrendo com a cisteína.

Foi medido o espectro de RMN de uma solução aquosa de cisteína para utilização como referência. Este resultado está apresentado na figura 3.30.

Tabela 3.2: Tabela dos valores calculados de distâncias interplanares d , identificados e indexados de acordo com o banco de dados do ICDD — Amostra com cisteína.

d (Å)	Material	h k l	d_{tabelado} (Å)	Desvio (%)
3,33	-	-	-	-
3,16	$\beta - Bi_2O_3$	2 0 1	3,1902	0,9
2,37	Bi	1 0 4	2,3700	0,0
2,36	Bi	1 0 4	2,3700	0,4
2,34	Bi	1 0 4	2,3700	1,3
2,25	Bi	1 1 0	2,2730	1,0
2,21	-	-	-	-
2,19	-	-	-	-
1,87	Bi	2 0 2	1,8680	0,1
1,84	Bi	2 0 2	1,8680	1,5
1,82	Bi	2 0 2	1,8680	2,6
1,80	-	-	-	-
1,52	Bi	1 1 6	1,4910	1,9
1,48	Bi	1 1 6	1,4910	0,7
1,47	Bi	1 1 6	1,4910	1,4
1,42	Bi	1 2 2	1,4430	1,6
1,40	Bi	1 2 2	1,4430	3,0
1,34	Bi	2 1 4	1,3300	0,8
1,31	Bi	2 1 4	1,3300	1,5
1,30	Bi	2 1 4	1,3300	2,3
1,29	Bi	2 1 4	1,3300	3,0
1,28	-	-	-	-

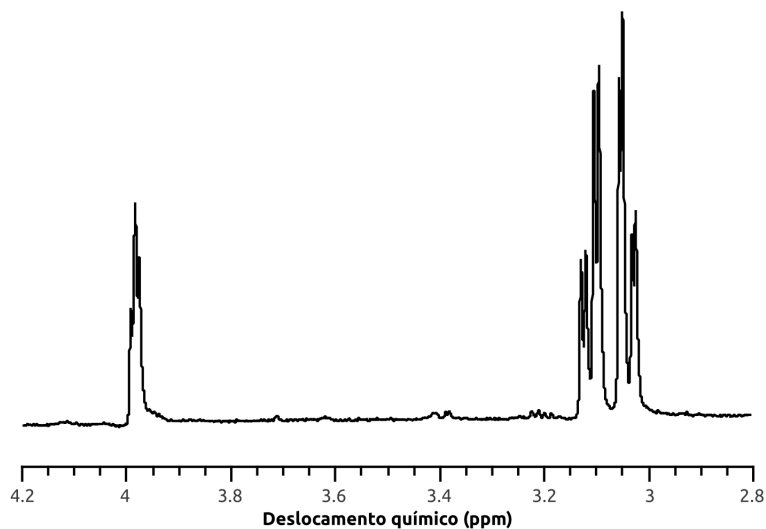


Figura 3.30: Espectro de ressonância magnética nuclear do núcleo 1H para uma amostra de cisteína em solução aquosa.

Observa-se os picos de ressonância conhecidos da cisteína, localizados em 3,992 ppm, 3,984 ppm, 3,976 ppm, 3,130 ppm, 3,121 ppm, 3,105 ppm, 3,096 ppm, 3,057 ppm, 3,051 ppm, 3,032 ppm e 3,026 ppm. Além desses, há a presença de sinais fracos em torno de 3,2 ppm e 3,4 ppm. Esses sinais são conhecidos e pertencem à cistina. Essa molécula é formada a partir da dimerização da cisteína através do radical SH , o que acontece naturalmente em solução aquosa.

Essa solução foi medida aproximadamente uma hora após sua preparação. Com base na baixa intensidade do sinal da cistina, verificamos que a formação de cistina (4,177 ppm, 4,168 ppm, 4,157 ppm, 4,147 ppm, 3,456 ppm, 3,447 ppm, 3,419 ppm, 3,409 ppm, 3,268 ppm, 3,248 ppm, 3,231 ppm e 3,210 ppm) em solução aquosa é relativamente lenta.

Uma amostra com aproximadamente 0,5 mL de BiNPs em água foi medida com adição de diferentes quantidades de cisteína em solução aquosa com concentração de 3,5 mM. As medidas foram realizadas logo após a adição da cisteína e duraram em média 5 minutos. Os espectros são mostrados na figura 3.31.

Observou-se o desaparecimento completo dos sinais da cisteína e a sua substituição

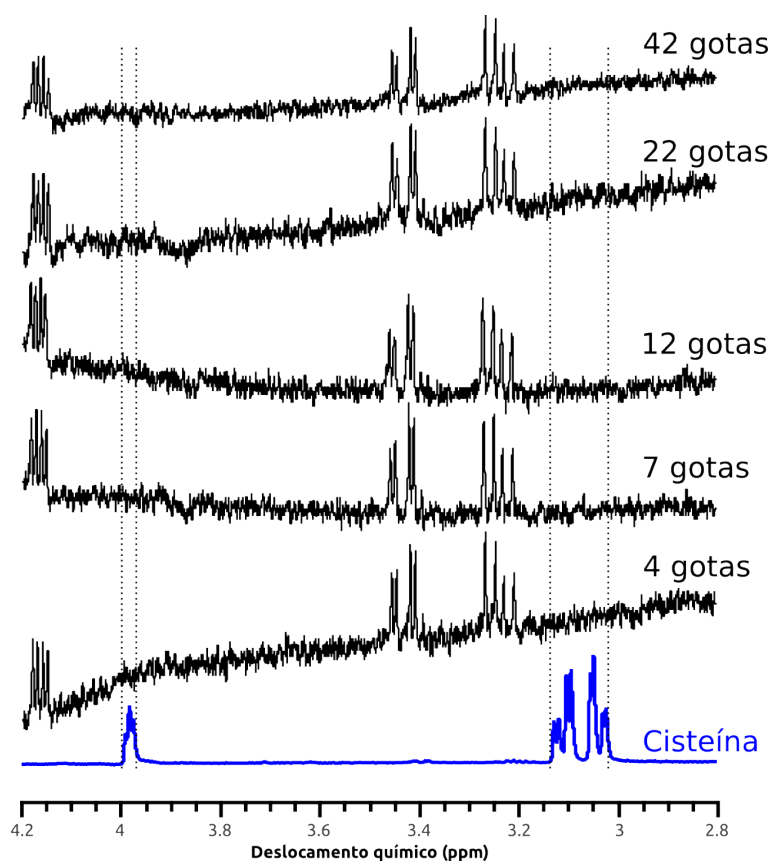


Figura 3.31: Espectros de ressonância magnética nuclear do núcleo ^1H para uma amostra de aproximadamente 0,5 mL de BiNPs em água com adição de diferentes quantidades de uma solução aquosa com concentração de 3,5 mM de cisteína (em preto). Em azul, o espectro desta solução pura.

pelos picos relacionados à cistina. Conclui-se que as nanopartículas aceleraram o processo de formação da cistina, fazendo com que o sinal da molécula precursora desapareça completamente.

Conforme explicado anteriormente, a cistina é um aminoácido formado pela dimerização da cisteína. A estrutura da cistina é mostrada na figura 3.32.

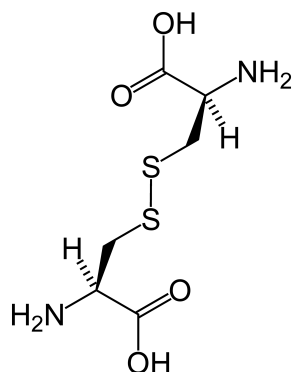


Figura 3.32: Estrutura da molécula de cistina.

Na conversão da cisteína em cistina, ocorre a liberação de dois íons H^+ e de dois elétrons (figura 3.33). Uma vez que a reação de dimerização do aminoácido é fortemente acelerada pela presença de BiNPs, é esperado que essa reação ocorra nas proximidades da superfície das nanopartículas. Dessa forma, sugerimos que os elétrons liberados na oxidação da cisteína sejam capturados pelas nanopartículas que adquirem carga eletrostática.

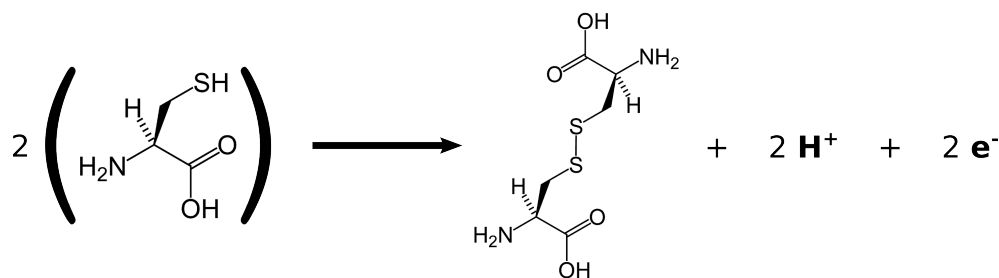


Figura 3.33: Reação de dimerização da molécula de cisteína em cistina. Ocorre a oxidação da molécula e liberação de íons H^+

Com as nanopartículas carregadas é possível que as moléculas de cistina sejam a elas complexadas devido a interações eletrostáticas, dando origem à modificação do espectro de absorção.

Para estudar o efeito de altas concentrações de cisteína na amostra de BiNPs, a experiência foi refeita acrescentando-se grandes quantidades de cisteína sólida aos 0,5 mL de nanopartículas em água. Os resultados são apresentados na figura 3.34.

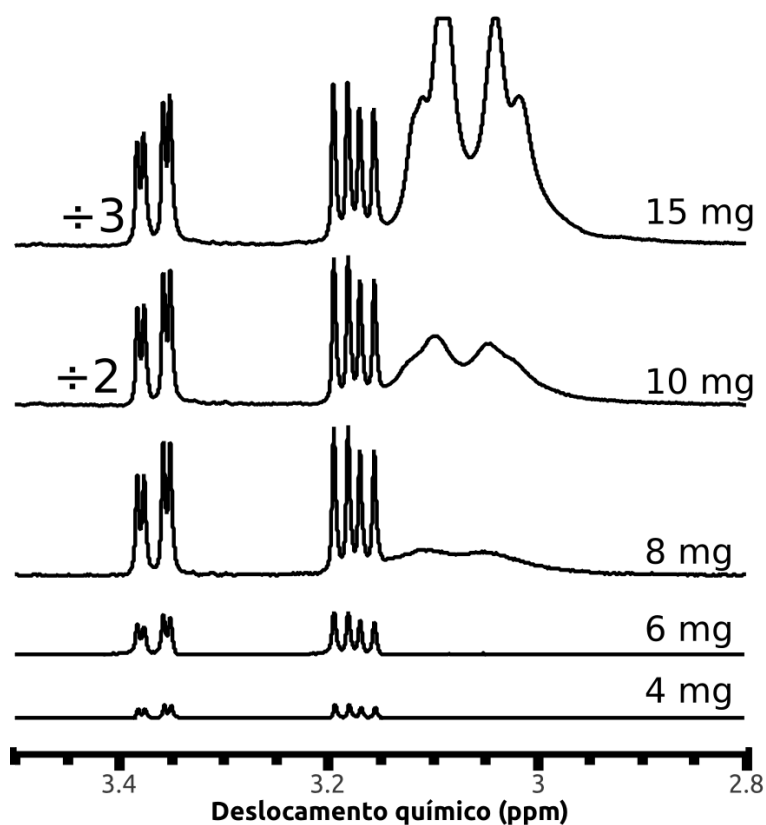


Figura 3.34: Espectro de ressonância magnética nuclear do núcleo 1H para uma amostra de aproximadamente 0,5 mL de BiNPs em água com adição de diferentes quantidades de cisteína em pó — o espectro é apresentado em outra faixa, excluindo o pico próximo aos 4 ppm da cisteína que satura o detector.

Na amostra com adição de 8 mg de cisteína ocorre o aparecimento de bandas de ressonância próximas a 3,05 ppm e 3,12 ppm. Com o aumento da quantidade para 10 mg e para 15 mg torna-se perceptível que esse é o sinal da cisteína, porém com uma

maior largura de linha. Note que esse último espectro apresenta um faixa de varredura diferente dos resultados apresentados anteriormente para excluir os picos da cisteína próximos a 4 ppm que adquirem valores extremamente altos, saturando o detector.

Concluimos que existe uma concentração de saturação em que a cisteína deixa de ser totalmente convertida em cistina, ocorrendo o aparecimento da molécula original no espectro e, no entanto, o sinal da cistina ainda é intensificado.

As razões do alargamento dos picos no espectro de RMN são, normalmente, flutuações na intensidade do campo magnético no interior da amostra causado por inhomogeneidades na mesma, falha do equipamento ou por impurezas paramagnéticas [42]. Nenhuma dessas explicações parece adequada à nossa observação, uma vez que apenas o sinal da cisteína aparece alargado.

3.4 Determinação da concentração de cisteína utilizando as BiNPs

Uma das formas mais simples para determinação da concentração de cisteína é através da medida da intensidade de absorção da luz. Para isto, os espectros apresentados na figura 3.21 foram analisados em diversos comprimentos de onda como função da concentração de cisteína. O resultado é mostrado na figura 3.35.

Para a maioria das curvas podemos notar que a intensidade da absorção sofre um aumento quando é adicionado 80 μM de cisteína. A partir deste ponto ocorre o decréscimo da absorbância até a saturação que, para comprimentos de onda acima dos 400 nm, é próxima de zero.

Vemos que a curva de absorção para determinados comprimentos de onda é adequada para a determinação da concentração de cisteína em determinadas faixas. A absorção em 450 nm, por exemplo, pode ser utilizada na determinação da concentração de cisteína numa faixa variando de 80 μM a 720 μM e ainda apontamos para a possibilidade de

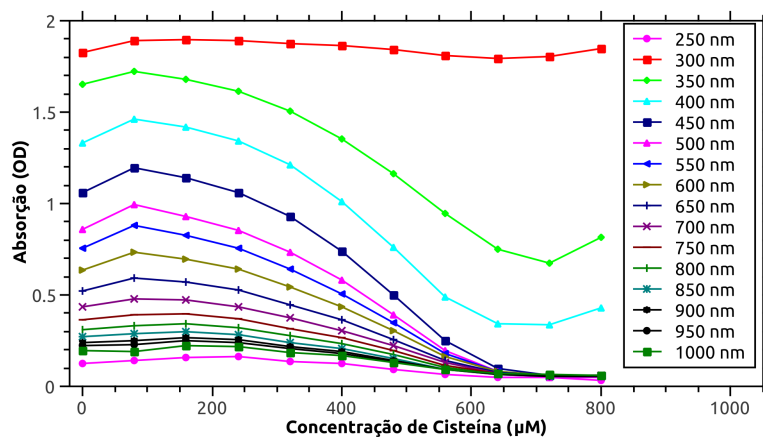


Figura 3.35: Intensidade da absorção em diversos comprimentos de onda em função da concentração de cisteína

poder variar os limites de detecção da cisteína através da dissolução do coloide de nanopartículas, uma vez que o fator a ser mantido na mesma faixa é a concentração relativa entre nanopartículas e moléculas de cisteína. Estes resultados indicam que as nanopartículas apresentam grande potencial para aplicação na detecção quantitativa e seletiva de cisteína.

Capítulo 4

Conclusões e considerações finais

Produzimos nanopartículas através da ablação de um alvo de bismuto imerso em água e em acetona. Os coloides foram caracterizados por meio de diversas técnicas que permitiram a obtenção de informações morfológicas, ópticas e estruturais das nanopartículas. Durante a produção, foi observada uma elevada taxa de produção, sendo possível a saturação da quantidade de nanopartículas em 4 mL de solvente após 2 min. Na amostra em água, identificamos o pico de absorção relacionado à ressonância dos plasmons de superfície em 257 nm. Esse resultado concorda com a caracterização estrutural que indica a existência predominante de bismuto metálico na nanopartícula. Foi mostrado que na superfície dessas nanopartículas ocorre a formação da fase tetragonal β do Bi_2O_3 .

As amostras apresentaram grande distribuição de tamanhos mas, preferencialmente, diâmetros menores do que 50 nm. As NPs em água exibiram uma intensa emissão em 414 nm quando excitadas por uma fonte com 337 nm. Embora não tenhamos compreendido a origem desta emissão, a existência de um sinal de luminescência por nanopartículas é um resultado de grande importância sobretudo visando sua aplicação como marcador biológico.

Investigamos as interações de diversos aminoácidos com as nanopartículas produzi-

das e descobrimos o potencial para aplicação destas como um sensor seletivo da cisteína. Visualmente, a adição desta molécula provoca a mudança de cor do coloide, que vai de marrom escuro para transparente em poucos segundos. Ainda foi observado que estas amostras se tornam estáveis por longos períodos de tempo.

Diferentemente das nanopartículas de bismuto em água sem adição de cisteína, a centrifugação destas amostras não resultou na separação de fases do coloide. Ainda foi observado na microscopia eletrônica de transmissão que as nanopartículas tendem a se agrupar nas regiões em torno da grade metálica utilizada como porta-amostras. De acordo com estes resultados, concluímos que as nanopartículas adquirem uma carga eletrostática devido à sua interação com a cisteína.

Um estudo das curvas de absorção das BiNPs em função da concentração de cisteína mostrou que ocorre uma modificação gradual do espectro, que inclui a criação de uma segunda banda de absorção próxima a 320 nm e o decréscimo da absorção na região visível, o que efetivamente produz a transparência do coloide. O estudo destes espectros em função da concentração indicou a possibilidade de realizar a determinação da quantidade de cisteína adicionada à solução. Desta forma, as BiNPs podem ser empregadas como um sensor quantitativo deste aminoácido.

O mecanismo físico de interação da cisteína com as nanopartículas foi compreendido através da técnica de ressonância magnética nuclear que revelou que ocorre a imediata dimerização da cisteína em cistina. Com base nos resultados apresentados, sugerimos que os elétrons liberados na reação de oxidação do radical *SH* são responsáveis pela suposta carga adquirida pelas nanopartículas.

As amostras produzidas neste trabalho apresentam grande aplicabilidade em sistemas biológicos devido à conhecida baixa toxicidade do bismuto, podendo atuar principalmente como marcadores biológicos devido à sua luminescência. Além disso, as nanopartículas podem ser utilizadas como um sensor quantitativo de cisteína de fácil produção e detecção, baixo custo e boa sensibilidade.

Capítulo 5

Trabalhos futuros

É sugerida uma investigação sobre a origem do sinal de luminescência nas amostras produzidas em água. Além disso, novas experiências da interação das amostras com a cisteína variando a concentração de nanopartículas poderiam confirmar a possibilidade de modificar a faixa de concentrações detectáveis deste aminoácido.

Ainda é necessário compreender a causa da aparente modificação das características morfológicas observadas através da microscopia eletrônica de transmissão nas amostras em que foi adicionada cisteína e do alargamento do sinal no espectro de ressonância magnética nuclear apresentado na figura [3.34](#).

Referências Bibliográficas

- [1] Robert Taylor, Sylvain Coulombe, Todd Otanicar, Patrick Phelan, Andrey Gunawan, Wei Lv, Gary Rosengarten, Ravi Prasher, and Himanshu Tyagi. Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids. *Journal of Applied Physics*, 113(1):–, 2013.
- [2] Sattler and Klaus D. *Handbook of Nanophysics: Nanoparticles and Quantum Dots*. CRC Press, 2012.
- [3] K. Lance Kelly, Eduardo Coronado, Lin Lin Zhao, and George C. Schatz. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(3):668–677, 2003.
- [4] Ha Minh Hiep, Tatsuro Endo, Kagan Kerman, Miyuki Chikae, Do-Kyun Kim, Shohei Yamamura, Yuzuru Takamura, and Eiichi Tamiya. A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk. *Science and Technology of Advanced Materials*, 8(4):331, 2007.
- [5] Xin Li, Li Jiang, Qiuqiang Zhan, Jun Qian, and Sailing He. Localized surface plasmon resonance (lspr) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 332(2-3):172 – 179, 2009.
- [6] Aswathy Ravindran, Sindhu Priya Dhas, N. Chandrasekaran, and Amitava Mukher-

- jee. Differential interaction of silver nanoparticles with cysteine. *Journal of Experimental Nanoscience*, 8(4):589–595, May 2013.
- [7] Jeyaraman Athilakshmi, Manikkavalli Mohan, and Dillip Kumar Chand. Selective detection of cysteine/cystine using silver nanoparticles. *Tetrahedron Letters*, 54(5):427–430, Jan 2013.
- [8] Vinicius Silva de Oliveira. Propriedades ópticas de nanopartículas de vanádio produzidas por ablação a laser. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2013.
- [9] Nathaniel L. Rosi and Chad A. Mirkin. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*, 105(4):1547–1562, Apr 2005.
- [10] Mauro Ferrari. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5(3):161–171, Mar 2005.
- [11] Ketan B. Ghaghada, Cristian T. Badea, Lohitash Karumbaiah, Nicole Fettig, Ravi V. Bellamkonda, G.A. Johnson, and Ananth Annapragada. Evaluation of tumor microenvironment in an animal model using a nanoparticle contrast agent in computed tomography imaging. *Academic Radiology*, 18(1):20–30, Jan 2011.
- [12] J F Hainfeld. Gold nanoparticles: a new x-ray contrast agent. *British Journal of Radiology*, 79(939):248–253, Mar 2006.
- [13] Otfried Madelung. *Semiconductors: Data Handbook*. Springer, 2003.
- [14] V.S. Édel'man. Electrons in bismuth. *Advances in Physics*, 25(6):555–613, 1976.
- [15] L. Konopko, T. E. Huber, and A. Nikolaeva. Quantum interference in bismuth nanowires: Evidence for surface charges. *Journal of Low Temperature Physics*, 162(5-6):524–528, Mar 2011.

- [16] Ye Tian, Chuan Fei Guo, Shengming Guo, Yongsheng Wang, Junjie Miao, Qi Wang, and Qian Liu. Bismuth nanowire growth under low deposition rate and its ohmic contact free of interface damage. *AIP Advances*, 2(1):012112, 2012.
- [17] R.K. Verma, K. Kumar, and S.B. Rai. Near infrared induced optical heating in laser ablated bi quantum dots. *Journal of Colloid and Interface Science*, 390(1):11 – 16, 2013.
- [18] Oded Rabin, J. Manuel Perez, Jan Grimm, Gregory Wojtkiewicz, and Ralph Weissleder. An x-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. *Nature Materials*, 5(2):118–122, Jan 2006.
- [19] Mainul Hossain, Yang Luo, Zhaoyong Sun, Chaoming Wang, Minghui Zhang, Hanyu Fu, Yong Qiao, and Ming Su. X-ray enabled detection and eradication of circulating tumor cells with nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 38(1):348–354, Oct 2012.
- [20] Jennifer A. Dahl, Bettye L. S. Maddux, and James E. Hutchison. Toward greener nanosynthesis. *Chemical Reviews*, 107(6):2228–2269, 2007.
- [21] Stephan Barcikowski, Francisco Devesa, and Kirsten Moldenhauer. Impact and structure of literature on nanoparticle generation by laser ablation in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(8):1883–1893, 2009.
- [22] Geng Lin, Dezhi Tan, Fangfang Luo, Danping Chen, Quanzhong Zhao, Jianrong Qiu, and Zhizhan Xu. Fabrication and photocatalytic property of alpha-bi2o3 nanoparticles by femtosecond laser ablation in liquid. *Journal of Alloys and Compounds*, 507(2):L43 – L46, 2010.
- [23] Zijie Yan and Douglas B. Chrisey. Pulsed laser ablation in liquid for micro-

- /nanostructure generation. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13(3):204 – 223, 2012.
- [24] Vincenzo Amendola and Moreno Meneghetti. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11:3805–3821, 2009.
- [25] Haibo Zeng, Xi-Wen Du, Subhash C. Singh, Sergei A. Kulinich, Shikuan Yang, Jianping He, and Weiping Cai. Nanomaterials via laser ablation/irradiation in liquid: A review. *Advanced Functional Materials*, 22(7):1333–1353, 2012.
- [26] Vincenzo Amendola and Moreno Meneghetti. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:3027–3046, 2013.
- [27] William T. Nichols, Takeshi Sasaki, and Naoto Koshizaki. Laser ablation of a platinum target in water. i. ablation mechanisms. *Journal of Applied Physics*, 100(11):–, 2006.
- [28] John R. Reitz, Frederick J. Milford, and Robert W. Christy. *Foundations of Electromagnetic Theory (4th Edition)*. Addison-Wesley, 2008.
- [29] Barbara J. Frisken. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics*, 40(24):4087–4091, Aug 2001.
- [30] Bruce J. Berne and Robert Pecora. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Krieger Pub Co, 1990.
- [31] Li Zhang, Chris M. B. Holt, Erik J. Lubner, Brian C. Olsen, Huatao Wang, Mohsen Danaie, Xinwei Cui, XueHai Tan, Vicki W. Lui, W. Peter Kalisvaart, and David Mitlin. High rate electrochemical capacitors from three-dimensional arrays of vana-

- dium nitride functionalized carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(49):24381–24393, 2011.
- [32] Harald Günther. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry, 2nd Edition*. Wiley, 1995.
- [33] V. I. Nefedov. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy of Solid Surfaces*. CRC Press, 1988.
- [34] Stefan Hüfner. *Photoelectron Spectroscopy: Principles and Applications*. Springer-Verlag, 1996.
- [35] Y. W. Wang, Byung Hee Hong, and Kwang S. Kim. Size control of semimetal bismuth nanoparticles and the uv–visible and ir absorption spectra. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(15):7067–7072, 2005.
- [36] Milton Kerker. *The scattering of light and other electromagnetic radiation*. Academic Press, 1969.
- [37] Y. Maréchal. The molecular structure of liquid water delivered by absorption spectroscopy in the whole IR region completed with thermodynamics data. *Journal of Molecular Structure*, 1004:146–155, October 2011.
- [38] V. Gazit, R. Ben-Abraham, R. Coleman, A. Weizman, and Y. Katz. Cysteine-induced hypoglycemic brain damage: an alternative mechanism to excitotoxicity. *Amino Acids*, 26(2):163–168, 2004.
- [39] Haichao Su, Fengmin Qiao, Ruihuan Duan, Lijian Chen, and Shiyun Ai. A novel label-free optical cysteine sensor based on the competitive oxidation reaction catalyzed by g-quadruplex halves. *Biosensors and Bioelectronics*, 43(0):268 – 273, 2013.

- [40] Wellington Celestino dos Santos. Produção, caracterização e aplicação de nanopartículas por ablação a laser em meio líquido. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2010.
- [41] Franz Mandl. *Statistical Physics, 2nd Edition*. Wiley, 1988.
- [42] A Samoson, T Tuhem, and Z Gan. High-field high-speed mas resolution enhancement in ^1H nmr spectroscopy of solids. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 20(3–4):130 – 136, 2001.

Apêndice A

Estrutura química dos aminoácidos utilizados

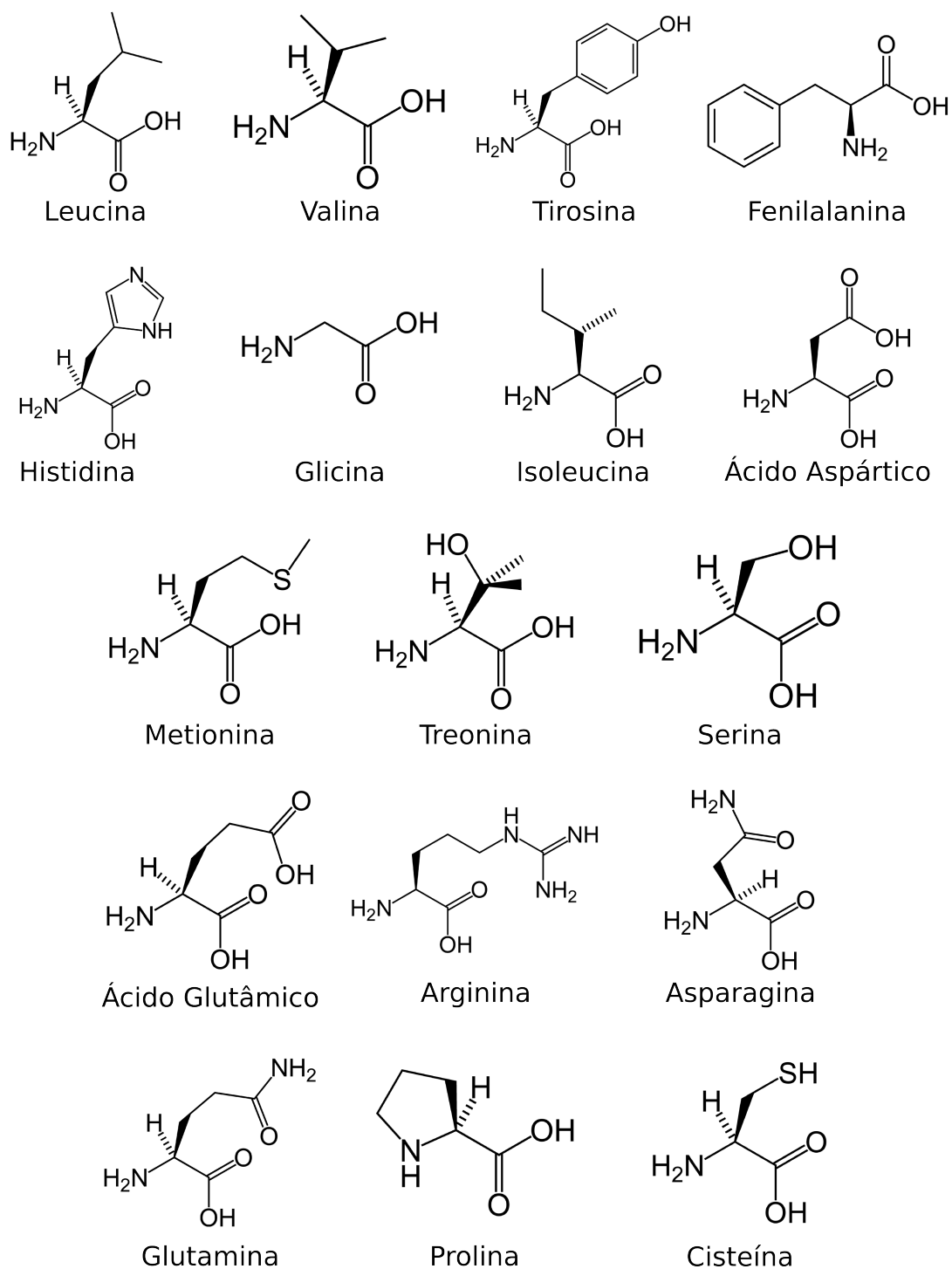


Figura A.1: Estrutura química dos aminoácidos utilizados no teste de reatividade das nanopartículas de Bi.