

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Dissertação

INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS DE SÍNTESE E DE POTENCIALIDADES
DOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EMPREGANDO
PLURONIC F127 E PLURONIC F127 TIOLADO COMO
REDUTOR/ESTABILIZADOR

Douglas Costa Santos

Orientadora: Prof^a Dr^a Zaine Teixeira Camargo

São Cristóvão - SE

Março de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Douglas Costa Santos

INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS DE SÍNTESE E DE
POTENCIALIDADES DOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
EMPREGANDO PLURONIC F127 E PLURONIC F127 TIOLADO COMO
REDUTOR/ESTABILIZADOR

Orientadora: Prof^a Dr^a Zaine Teixeira Camargo

São Cristóvão - SE

Março de 2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237i

Santos, Douglas Costa

Investigação de parâmetros de síntese e de potencialidades dos sistemas de nanopartículas de ouro empregando pluronic F127 e pluronic F127 tiolado como redutor/estabilizador / Douglas Costa Santos ; orientador Zaine Teixeira Camargo. – São Cristóvão, 2015.

76 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Sergipe, 2015.

1. Nanopartículas - Ouro. 2. Poloxâmero. 3. Baicaleína. I. Camargo, Zaine Teixeira, orient. II. Título.

CDU 546.59-022.532

Não sabendo ele que era impossível foi lá e fez.

(Jean Cocteau)

A José Francisco dos Santos (in memoriam)

Agradecimentos

Não poderia iniciar esse momento sem agradecer a Aquele que é dono de todas as coisas, obrigado Meu Deus por todas as experiências e vitórias que alcancei nos últimos dois anos, se não fosse o Senhor o que seria de mim.

Agradeço a minha família pelo apoio dado em todos os momentos, porque acredito que o pensamento positivo se traduz em fé, e a fé nos leva longe.

Agradeço a minha esposa Claudia Silva Santos que me aturou durante meus momentos de loucura, noites em claro e inquietude no sono, só amando alguém para ter tanta paciência.

Quero registrar também a minha gratidão a minha orientadora Dra. Zaine Teixeira Camargo, que recebeu como aluno esse “ilustre desconhecido” nos últimos dias de matrículas, e teve a paciência de discutir e elucidar todas as dúvidas, me permitindo dizer que fui realmente orientado, obrigado por todo conhecimento compartilhado, tem coisas na vida que não tem preço.

Agradeço a todos os Professores do P²CEM, tanto pelo aprendizado que obtive cursando as disciplinas, quanto pelas contribuições dadas durante os seminários de pesquisa, pois foram de grande valia para a evolução dessa dissertação.

Agradeço também aos companheiros de laboratório porque é importante poder contar com pessoas como vocês Ricardo, Mirna, Lane, Genilma, Diego, Cristiane, José Carlos, Charlene, Vivi (minha fiel escudeira), Yane, Cristiano, Jamily, Danilo, Ivory pois vocês ensinam como fazer e como não fazer.

Obrigado aos amigos externos a universidade que são tantos que eu não me atreveria a citar, eu sei que permanecem torcendo e pedindo a Deus pelo progresso do grupo, o futuro nos reservará histórias e risadas colhidas em todo esse caminho.

E por fim agradeço a CAPES, CNPq e UFS pelo aporte financeiro e estrutural para realização do meu mestrado.

Lista de símbolos

AuNCLs - Nanoclusters de ouro
AuNPs – Nanopartículas de ouro
DLS – Espalhamento dinâmico de Luz
DNTB - 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
FDA – Food and Drug Administration
 μ – Potencial químico
 μ_0 – Potencial químico padrão
 μ_{sat} – Potencial químico de Saturação
PEO – Poli(óxido de etileno)
PPO – Poli(óxido de propileno)
PF -127-Tiol – Pluronic F127 funcionalizado
PF-127 – Pluronic F-127
PPO – Poli(óxido de propileno)
 r_c – Raio crítico
R – Constantes dos gases ideais
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SPR – Ressonância plasmônica de superfície
T – Temperatura
TEM – Microscopia eletrônica de Transmissão
TGA – Ácido tioglicólico
UV- Ultravioleta
UV-Vis – Ultravioleta-Visível
 $\Delta\dot{H}$ – Entalpia molar
 $\Delta\dot{S}$ – Variação de entropia Molar
 $\Delta\dot{G}$ – Energia molar de Gibbs

Lista de Tabelas

Tabela 1 - . Reagentes e solventes utilizados.	28
Tabela 2- Sequência experimental para obtenção das Nanopartículas	31
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos estimados a partir dos modelos de 1ª ordem, 2ª ordem e Avrami.....	53
Tabela 4 - Dados da cinética de obtenção das nanopartículas separados em etapas. 56	
Tabela 5 – Dados da eficiência de encapsulamento da baicaleína nos sistemas em que foi utilizado o PF127 e o PF127-Tiol.....	66

Lista de Figuras

Figura 1- Representação ilustrativa do mecanismo de estabilização das nanopartículas de ouro com citrato de sódio (adaptado de Zhao e col.) [23].	16
Figura 2 - (a) Nanopartícula estabilizada por alcanotíóis. (b) Dipersão de nanopartículas estabilizada por alcanotíóis.	20
Figura 3- Estrutura química do Pluronic F127	22
Figura 4- Estrutura química da bacaleína	26
Figura 5- Espectro de absorção no UV-Vis de amostra do ensaio de Elman	36
Figura 6 - Espectro de ^1H RMN do PF127-Tiol.	38
Figura 7 - Análise de UV-vis das soluções obtidas por Turkevich	39
Figura 8 - Mecanismo de obtenção das AuNPs a partir do PF127 [23].	40
Figura 9 - Análise de UV-Vs das amostras reduzidas com Pluronic F127 não funcionalizado	41
Figura 10 - Espectros de UV-Vis do método Turkevich e concentrações do PF127 em que não se observa banda referente a fração de ouro não reduzido.	42
Figura 11 - Microscopia eletrônica de Transmissão das Nanopartículas obtidas por Turkevich	43
Figura 12 - Análise de UV-vis das amostras reduzidas por Turkevich e associadas ao Pluronic F127 não funcionalizado.	44
Figura 13 - Imagens TEM das AuNPs (A)reduzida por citrato de sódio ; (B) com posterior adição de PF127.	45
Figura 14 - Espectrocopia no UV-Vis das AuNPs obtidas por PF127 a (a) $0,1\text{mmol L}^{-1}$, (b) $0,5\text{ mmolL}^{-1}$, (c) 1 mmol L^{-1} , (d) $1,5\text{ mmol L}^{-1}$ e (e) 2 mmol L^{-1}	46
Figura 15 - Nanopartículas de ouro obtidas a (a) 25°C ; (b) $25^\circ\text{C} + \text{UV}$; (c) 60°C e (d) $60^\circ\text{C} + \text{UV}$.	47
Figura 16 – (A) Imagens obtidas por TEM das nanopartículas obtidas por (a) PF127 + 25°C (b) PF 127 + $25^\circ\text{C} + \text{UV}$ (c) PF127+ 60°C (d) PF127+ $60^\circ\text{C} + \text{UV}$. (B) Histogramas respectivos dos tamanhos médios a partir das imagens.	50
Figura 17 - Espectroscopia de UV-Vis das AuNPs obtidas com 1 mmol L^{-1} de PF127 e radiação UV ao longo do tempo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 18 - Variação de intensidade da banda plasmônica das AuNPs obtidas com 1mmol L^{-1} de PF127 e radiação UV ao longo do tempo.	52
Figura 19 - Derivada da curva de Absorbância em relação ao tempo para a amostra obtida a 1 mmol L^{-1} e irradiação UV.	55
Figura 20 - Espectro da redução do p-Nitrofenol catalisada por nanopartículas de ouro reduzidos por (A) PF127 (B) citrato de sódio.	58
Figura 21 - Gráfico comparativo da presença de p-Nitrofenol após 7 horas de reação.	59
Figura 22 - - Espectroscopia de absorção no UV dos clusters de ouro obtidos pela ação do PF127-Tiol.	60
Figura 23 – Imagens de TEM dos AuNCLs formados com 1 mmol L^{-1} de PF127-tiol	62
Figura 24 - Espectroscopia de absorção no UV/Vis das AuNPs obtidas por Turkevich com adição posterior de PF127-tiol.	63
Figura 25 - Imagens por TEM das AUNPs obtidas por (a) redução com citrato de sódio (e) redução por citrato de sódio e posterior acrescimento de PF127-Tiol.	63

Figura 26 - Estabilidade dos Clusters obtidos pela ação do PF127-Tiol 0,5mmol	64
Figura 27 - Espectros de absorção no UV-Vis dos filtrados obtidos a partir do encapsulamento AuNPs-PF127-Tiol e (b) AuNPs-PF127	65
Figura 28 - Espectros de absorção no UV-Vis dos filtrados obtidos a partir do encapsulamento AuNPs-PF127-Tiol e AuNPs-PF127	Erro! Indicador não definido.

Resumo da Tese apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (M.Sc.)

INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS DE SÍNTESE E DE POTENCIALIDADES DOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EMPREGANDO PLURONIC F127 E PLURONIC F127 TIOLADO COMO REDUTOR/ESTABILIZADOR

DOUGLAS COSTA SANTOS

Março/2015

Orientadora: Zaine Teixeira Camargo

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Neste trabalho, nanopartículas e nanoclusters de ouro (AuNPs e AuNCLs, respectivamente) foram obtidos pelo método de redução em solução diluída, empregando o polímero anfifílico Pluronic F 127 não funcionalizado (PF127) e funcionalizado (PF 127-Tiol) como agente redutor/estabilizador, respectivamente. A funcionalização do polímero foi realizada por reação de esterificação com ácido tioglicólico (TGA), inserindo-se grupos tióis terminais. A concentração de PF127 e temperatura de obtenção foram parâmetros variados nos processos, além da incidência ou não de radiação UV. A caracterização dos nanosistemas foi realizada por espectroscopia de absorção no UV-Vis e por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os sistemas foram testados quanto à atividade catalítica, na redução do p-nitrofenol em borohidreto de sódio e na incorporação de uma molécula modelo, a baicaleína. As diferentes condições de síntese influíram sobre a morfologia, tamanho, quantidade, polidispersão e cinética de formação das nanopartículas. O rendimento da reação de funcionalização, estimado por ¹H RMN, foi de 90%. O produto obtido (PF127-Tiol) foi empregado na redução do Au³⁺ e, nanopartículas menores que 3 nm foram obtidas, nesse caso, AuNCLs, evidenciados pelo desaparecimento da banda SPR e surgimento de uma forte absorção no UV, além da observação por MET. Os sistemas a partir do PF127 foram investigados quanto a aplicação em catálise, na qual as AuNPs preparados utilizando Pluronic foi mais eficiente do que as obtidas por redução por citrato. Na investigação da incorporação de uma molécula modelo, as eficiências de encapsulamento foram superiores a 90%. Dessa forma, esses sistemas mostraram-se promissores para uma diversa gama de aplicações de nanopartículas ou clusters de ouro, tais como na catálise de reações químicas e encapsulamento de bioativos. A síntese por PF127 mostrou-se uma rota ambientalmente amigável e capaz de modulação nos tamanhos e formas das AuNPs. Os sistemas ainda são promissores para uso em sistemas biológicos, tendo em vista a biocompatibilidade do PF127.

Palavras Chave: Nanopartículas de ouro, Clusters de Ouro, Pluronic F127, baicaleína.

Abstract of Thesis presented to P²CEM / UFS as part of the requirements for the degree of Master of Materials Science and Engineering (M.Sc.)

INVESTIGATION OF SOME PARAMETERS OF SYNTHESIS AND
POTENTIALITIES OF GOLD NANOPARTICLES PREPARED BY PLURONIC F127
AND THIOLATED PLURONIC F127

DOUGLAS COSTA SANTOS

March/2015

Advisor: Zaine Teixeira Camargo

Postgraduate Program in Materials Science and Engineering

In this work, gold nanoparticles (AuNPs) and nanoclusters (AuNCLs) were prepared by the reduction in diluted solution method, using the amphiphilic copolymer Pluronic F127(PF127) and thiolated Pluronic F127 (PF127-thiol), respectively. The copolymer was functionalized by sterification reaction using thioglycolic acid (TGA). The investigated parameters of synthesis were concentration of the PF127 solution, temperature, as well as, the UV irradiation. The nanosystems were characterized by UV/Vis absorption spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM). Further, the system potentialities were investigated by a catalized reaction and incorporation of a model molecule (baicalein). Morphologies, sizes, polydispersity, amount of reduced ion as well as kinetics parameters were dependent on the parameters of synthesis. The yield of the functionalization reaction was 90%, calculated by ¹H NMR. Using the PF127-thiol, the surface plasmonic resonance band (SPR) was undetected and a strong absorption in the UV region observed, which indicated that nanoparticles smaller than 3 nm were obtained (AuNCLs). Catalitic property of the AuNPs were investigated by reduction of p-nitrophenol, in which the AuNPs synthesised by PF127 were more efficient than the systems obtained by citrate reduction. The encapsulation efficiency of the baicalein were around 90%. In conclusion, the synthesis of AuNPs by PF127 is not only adequate to modulate sizes and morphology but also to provide environmental advantage in comparison to some traditional methods. In addition, these are promising systems to biologic applications because of the biocompatibility of PF127.

Key words: Gold nanoparticles, Gold clusters, Pluronic F127, baicalein

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Fundamentação teórica.....	14
2.1. Nanopartículas de ouro	14
2.2. Cinética de Nucleação e crescimento.....	17
2.3. Clusters de Ouro.....	19
2.4. Pluronic	22
2.5. Encapsulamento de Fármacos.....	25
2.6. Baicaleína	26
2.7. Catálise por Nanopartículas de ouro.....	27
3. Objetivos	28
4. Parte experimental	28
4.1. Metodologia	29
4.1.1. Funcionalização do pluronic	29
4.1.2. Obtenção das nanopartículas de ouro	29
4.1.2.1. Redução por meio de Citrato de sódio.....	29
4.1.2.2. Redução por meio de Pluronic F127	30
4.1.2.3. Redução por meio de Citrato e Pluronic F127.....	32
4.1.2.4. Cinética de formação das Nanopartículas.....	32
4.1.2.5. Avaliação da atividade catalítica das nanopartículas	32
4.1.2.6. Avaliação da eficiência Encapsulamento	33
4.2. Caracterização das amostras.....	33
4.2.1. Espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis.....	33
4.2.2. Determinação de grupos Tiois pelo método de Ellman's.....	34
4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	34
4.2.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	35

5. Resultados e Discussão	35
5.1. Funcionalização do Pluronic F127	35
5.2. Preparação das Nanopartículas de ouro	38
5.2.1. Redução por citrato de sódio	38
5.2.2. Redução por Pluronic F127	39
5.2.3. Comparativo entre método Turkevich e redução por PF127	42
5.3. Efeito do Pluronic sobre as partículas pré-formadas	43
5.4. Estabilidade dos sistemas	46
5.5. Análise de diferentes condições de síntese sobre a formação das nanopartículas 47	
5.6. Estudo da cinética de formação das nanopartículas	51
5.7. Avaliação da atividade catalítica das nanopartículas de ouro	57
5.8. Obtenção de clusters de ouro	60
5.9. Incorporação da Baicaleína	65
6. Conclusões	67
7. Bibliografia	68

1.Introdução

A tecnologia tem avançando no sentido do domínio de materiais em escala nanométrica ou subnanométrica, pelo fato desses materiais adquirem propriedades novas e muitas vezes seletivas [1]. A nanotecnologia é um dos ramos mais recentes da ciência e, no entanto, está entre as áreas mais exploradas no que diz respeito à pesquisa e desenvolvimento nos últimos anos. A aplicação de nanomateriais está presente nas mais diversas áreas de atividade, abrangendo um campo que vai dos estudos em aplicações cosméticas [2], passando pela catálise [3] e diagnósticos por imagem [4], chegando ao transporte de fármacos e biomoléculas no organismo [5]. Neste último campo a nanotecnologia tem se mostrado muito promissora, visto que o uso de nanomateriais tem permitido o alcance de resultados surpreendentes em aspectos de administração e combate a infecções e doenças a exemplo do câncer [6].

Entre os sistemas nanoestruturados explorados nos estudos de transporte e liberação de fármacos as nanopartículas de ouro têm se destacado por apresentarem propriedades únicas em suas características físico-químicas, além da facilidade de síntese, funcionalização, e sua grande biocompatibilidade podendo se ligar por conjugação covalente e não-covalente aos fármacos. [7].

Para a aplicação das Nanopartículas nos mais diversos campos, existe a necessidade de métodos de preparação cada vez menos agressivos ao meio-ambiente, frente aos usuais que aplicam borohidreto de sódio por exemplo, além da manutenção da estabilidade coloidal dos sistemas. Para esses fins encontram-se na literatura vários métodos, os quais também devem ser adequados à aplicação final das Nanopartículas [8].

Na área de transporte e liberação de bioativos, uma opção viável e que tem alcançado bons resultados é o uso de polímeros na estabilização das nanopartículas de ouro, tendo o bioativo incorporado à monocamada de estabilizador polimérico [9] [10].

Os polaxamers (Pluronic) são polímeros tribloco de poli(óxido de etileno) (PEO) e poli(óxido de propileno) (PPO) que tem suas propriedades dependentes da proporção existente entre os dois compostos, o que garante ao pluronic um caráter anfifílico, podendo ter maior ou menor hidrofobicidade. Esses polímeros podem ser empregados na síntese de nanopartículas de ouro [11], principalmente o Pluronic F127 (PEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀) [11] [12]. Devido a sua biocompatibilidade, são também viáveis para aplicações no transporte e liberação de fármacos no organismo. Tal aplicabilidade se deve ao fato de que os polaxamers são capazes de formar arranjos

micelares a uma dada concentração, o que torna a associação dos dois sistemas uma opção interessante para aplicação na área da saúde [13].

Em observância a essas possibilidades, a Dissertação tem como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro pela redução com Pluronic F127 com e sem funcionalização e verificar sua aplicabilidade como agente catalítico e na incorporação de uma molécula modelo, a baicaleína.

2. Fundamentação teórica

2.1. Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro, por possuírem propriedades químicas e físicas diferenciadas, vêm sendo empregadas para as mais diversas aplicações. Podemos encontrar nanopartículas aplicadas em áreas como a catálise [14], ótica [15] e biologia [16]. Novas propriedades para o ouro surgem a partir da redução de tamanhos, a exemplo da atividade catalítica e de luminescência, sendo estas mudanças consideráveis em relação ao ouro macroscópico já que neste último elas não são observadas [1].

A medicina é uma das áreas que mais explora as possibilidades das nanopartículas de ouro, pois estas são aplicadas na construção de nanotubos [17], biosensores [18], e carreadores de genes e fármacos [19]. As nanopartículas de ouro são atóxicas e biocompatíveis, pontos indispensáveis a sistemas de entrega de fármacos e proteínas.

O estudo realizado por Farkas e colaboradores 2010 sobre nanoecotoxicidade de nanopartículas de ouro e de prata mostra que as nanopartículas de ouro, mesmo em concentrações altas no organismo em teste, não apresentam resposta de citotoxicidade, o que pode ser explicado pela observação do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por ação catalítica das nanopartículas de ouro, os quais não são suficientemente altos para ultrapassar os mecanismos de defesa antioxidante das células [20].

Outra característica favorável para a aplicação de nanopartículas de ouro está relacionada com a facilidade de síntese pelos mais diversos métodos com diferentes faixas de dimensões (médias de diâmetros entre 5 e 150 nm) e baixa polidispersividade [21].

As nanopartículas de ouro possuem área superficial alta em relação a seu volume o que possibilita a incorporação de moléculas alvo e biomoléculas com maior facilidade uma vez que o aumento de carga proporciona maior interação entre o transportador e a espécie transportada [21]. A incorporação de bioativos também é favorecida nas nanopartículas de ouro pela sua versatilidade em fazer ligações covalente ou não covalente, fato que pode ser atribuído à superfície estrutural das partículas que são altamente mutáveis e multivalente [22].

O método mais comum de obtenção das nanopartículas de ouro é o de redução química ou biológica do ouro em solução. Tais processos podem ser divididos em duas etapas específicas, a nucleação e o crescimento [14]. Nesses processos, utilizam-se um agente redutor, responsável pela formação de núcleos pela redução do íon Au^{3+} a Au^0 , e um estabilizador que limita o crescimento dos núcleos mantendo-os em dimensão nanométrica. A redução química pode ser efetuada pelo uso de agentes diversos a exemplo do borohidreto de sódio e a estabilidade coloidal é assegurada por agentes como o citrato trissódico dihidratado que promove estabilização pela formação de uma dupla camada elétrica sobre os núcleos [23].

A necessidade da utilização de estabilizantes nesse processo de síntese deve-se ao fato que, com a redução de tamanho das partículas ocorre um aumento de sua área superficial e como consequência da energia de Gibbs devido à tensão superficial, que por sua vez tende a levar as partículas ao coalescimento. Para evitar esse fenômeno e promover uma maior estabilidade física das partículas formadas, são utilizados estabilizadores de diversas naturezas [24].

O citrato pode agir na obtenção de nanopartículas de ouro pelo processo de redução em solução diluída, realizando os dois papéis necessários à síntese, agente redutor e estabilizante, sendo um dos caminhos mais utilizados para tal processo desde a sua publicação em 1951 por Turkevich [25] e assim sendo, é bastante utilizado como método de referência na obtenção de Nanopartículas de ouro. A Figura 1 ilustra a obtenção de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich.

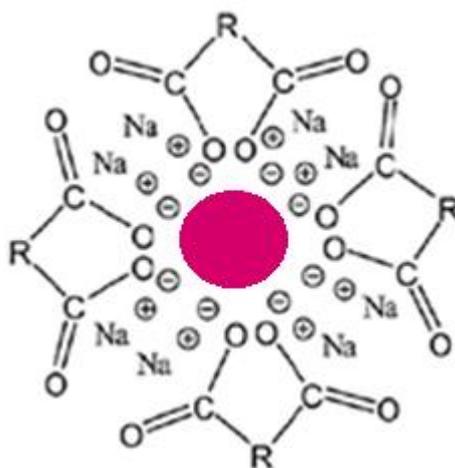


Figura 1- Representação ilustrativa do mecanismo de estabilização das nanopartículas de ouro com citrato de sódio (adaptado de Zhao e col.) [23].

Um método que tem despertado bastante interesse da comunidade científica é a obtenção de nanopartículas metálicas pela redução e estabilização por micelas de polímeros como o Pluronic [23].

Nanopartículas de ouro foram obtidas a partir do HAuCl_4 através do Pluronic F127 por reação redox em uma única etapa, as quais foram incorporadas em um novo biossensor de hemoglobina. Os resultados apontaram a eficiência do sistema que apresentou manutenção da atividade do biossensor com potencial formal de -339 mV [25].

YAHYAEI e AZIZIAN (2013) utilizaram radiação UV para sintetizar nanopartículas de prata em associação com Pluronic F127 a partir AgNO_3 , fazendo o estudo cinético do processo. O tamanho das nanopartículas aumentou com o aumento da concentração de Pluronic e nitrato de prata, e teve forte dependência com o tempo de exposição à radiação UV, sendo um método para a produção das nanopartículas [26].

As vantagens da utilização do Pluronic na obtenção de Nanopartículas frente a outras rotas estão na velocidade da preparação, estabilidade das Nanopartículas obtidas, uso de solventes ambientalmente amigáveis, resultando em um produto que pode ser facilmente aplicado em meio aquoso [27].

A sugestão do mecanismo de redução por Pluronic são descritas em três fases, sendo a primeira a redução inicial dos íons metálicos na coroa de PEO, seguida da adsorção do copolímero sobre os núcleos formados inicialmente que tem forte

influência do núcleo hidrofóbico e por último o crescimento das nanopartículas, que tem tamanho e forma relacionados com massa molecular do copolímero. Essas etapas determinam a dimensão e forma das partículas e influenciam fortemente a cinética de formação das mesmas [26].

2.2. Cinética de Nucleação e crescimento

A cristalização em fase líquida é um processo que consiste na transferência de um dado composto da fase líquida para a fase sólida cristalina, sendo que a fase sólida é constituída por um elevado número de cristais [29].

A transferência de massa entre as fases líquida e sólida só é possível se o potencial químico do soluto na fase líquida, μ , for superior ao potencial químico da solução saturada, μ_{sat} , como descreve a Equação 1, ou seja, a variação da energia de Gibbs molar, ΔG , tem valor negativo [29].

$$\Delta G = (\mu_{sat} - \mu) \quad (1)$$

O potencial químico de um soluto numa solução pode ser expresso pela Equação 2 e depende da temperatura e afinidade de todas as espécies presentes, assim sendo, tanto uma variação de temperatura quanto um aumento na concentração dos solutos podem ocasionar a cristalização. Nesta equação (μ_0) representa o potencial químico padrão do sistema e (α) a atividade do soluto na solução [28].

$$\mu = \mu_0 + RT \ln(\alpha) \quad (2)$$

A temperatura em que o soluto se torna saturado no solvente (T_{sat}) também tem efeito sobre a energia de Gibbs molar e afeta o fenômeno de cristalização, e pode ser expressa pela Equação 3, em que S representa a entropia molar do sistema. [28].

$$\Delta G = - \int_{T_{sat}}^T S dT \quad (3)$$

O fenômeno de cristalização é definido por duas fases distintas sendo elas a nucleação, a supersaturação e o crescimento de cristais. A nucleação pode ser primária, quando os cristais novos aparecem sem a influência de outros, ou

secundária atribuída à presença de outros cristais que colidem e dão origem a novos cristais, não existindo teorias definitivas para como o núcleo surge, sabe-se que é necessário que se atinja uma determinada concentração de supersaturação (acima da solubilidade), o que reflete também a superação da barreira de energia descrita na Equação 4. Além disso, para que o núcleo se desenvolva, ele deve atingir um raio crítico, pois abaixo de tal raio a tendência é que ele se redissolva [29].

$$\Delta G^* = \frac{16\pi\gamma}{(3\Delta G_v)^2} \quad (4)$$

O estabelecimento do raio crítico recebe contribuição da diferença da energia de Gibbs entre as duas fases por unidade de volume (G_v) e a energia interfacial por unidade de área (γ), onde antes do raio crítico ser atingido a predominância da energia de superfície que aumenta a energia de Gibbs impedindo a formação dos núcleos, porém ao atingir o raio crítico a contribuição volumétrica predomina diminuindo a energia de Gibbs favorecendo a formação dos núcleos. Equacionando-se essas duas energias chega-se a Equação 4 que após manipulações algébricas dá origem a Equação 5 que expressa a dependência do raio crítico (r_c) das energias já citadas [29].

$$\Delta G = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma \quad (4)$$

$$r_c = -2 \left(\frac{\gamma}{\Delta G_v} \right) \quad (5)$$

A cinética de crescimento de cristais pode ser decomposta em oito etapas, porém dentre elas três têm destaque, a saber: o transporte de massa do soluto, sua integração na rede cristalina e o transporte de calor. A primeira e segunda etapa citadas ocorrem em sequência e a etapa mais lenta dentre elas se torna a determinante da velocidade de crescimento do cristal. A Equação 6 expressa a variação de massa no cristal (M_c) em função do tempo, onde (c) é a concentração do soluto na solução, (c_{sat}) a concentração de saturação, (A) expressa a área e K_G representa o coeficiente global de crescimento do cristal [28].

$$\frac{dM_c}{dt} = K_G A (c - c_{sat})^n \quad (6)$$

No caso específico da formação de Nanopartículas a teoria supracitada, conhecida como “Teoria Clássica da nucleação e crescimento”, não é inteiramente confiável visto que as propriedades dos materiais mudam em escala nanométrica, o que afeta diretamente parâmetros de cristalização a exemplo da variação da energia de Gibbs molar, que por sua vez tem dependência com temperatura. Com base nessa observação estudos realizados estabeleceram a faixa de 280-350K como confiável para aplicação da teoria clássica a sistemas nanométricos [29].

A alteração dos parâmetros leva a uma superestimação da taxa de nucleação quando usada a teoria clássica, para solucionar tal erro, outros modelos podem ser aplicados [29].

A cinética de obtenção de nanopartículas de ouro foi estudada por BASTÚS et al. (2011), sendo que os autores controlaram a temperatura e a concentração das espécies redutoras e da reduzida, obtendo para o mesmo tempo de reação, partículas com dimensões distintas [30].

A maneira como as variáveis de processo influencia a cinética de formação dos cristais de ouro é bastante expressiva, de maneira que é possível limitar o tamanho a dimensões sub-nanométricas (<2nm) dando origem a clusters [31].

2.3. Clusters de Ouro

A palavra inglesa “cluster” que traduzindo significa aglomerado de objetos materiais (partículas, por exemplo) e imateriais (pensamento e idéias) tem origem na palavra germânica “klustro” e encontrou grande aplicação na nanotecnologia, já que para esta cluster pode ser considerado um arranjo limitado de átomos, que possuem propriedades distintas ao elemento químico em escala macroscópica [32].

As propriedades físico-químicas dos clusters de ouro são extremamente dependentes do tamanho do arranjo formado, onde a remoção de um simples átomo ou elétron pode levar a comportamentos completamente diferentes [33].

Para obtenção de clusters existem duas estratégias básicas, a primeira é a redução de sais metálicos em soluções aquosas e a segunda ocorre pela agregação controlada de metais zerovalentes em solventes orgânicos [34].

A redução de sais metálicos em solução depende da presença de agentes redutores e da presença de estabilizadores que controlem o crescimento das

partículas. Na estabilização os mais diversos compostos são utilizados, a exemplo do citrato trissódico di-hidratado, compostos de fósforo, ligantes à base de nitrogênio (incluindo heterociclos), ligantes à base de oxigênio, dendrímeros, polímeros e surfactante (comumente o brometo de cetiltrimetilamônio abreviado CTAB) e compostos de enxofre (em particular tiolatos) [23].

A obtenção de clusters de ouro por ação de agentes redutores a exemplo do borohidreto de sódio (NaBH_4) utilizando compostos tiolados como agentes estabilizantes dão origem a aglomerados que possuem núcleos entre 1 a 2nm que apresentam boa estabilidade. [35]

A eficiência dos compostos tiolados na estabilização de clusters de ouro esta associado a forte afinidade existente entre o ouro e o enxofre, uma vez que os tióis formam uma monocamada sobre a superfície dos clusters de ouro deixando o grupo ligado ao tiol livre, sendo que esse grupo livre protege estericamente o aglomerado da aproximação de novos átomos (figura 2), se a cadeia ligada ao grupo tiol for longa, essa estabilização se dará de maneira mais eficiente, pois quanto mais volumoso o grupo ligado, maior o impedimento estérico promovido. [36].

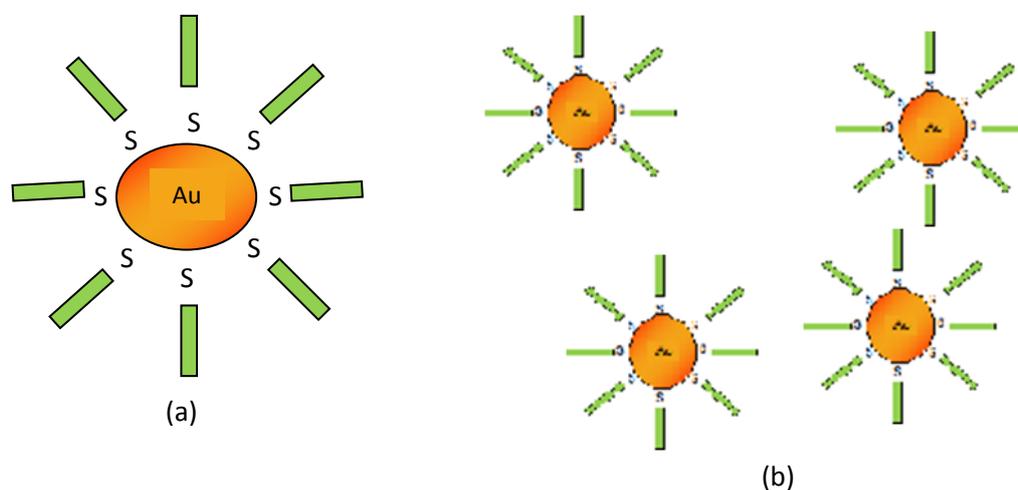


Figura 2 - (a) Nanopartícula estabilizada por alceno-tióis. (b) Dispersão de nanopartículas estabilizada por alcanotióis.

Um processo que tem despertado bastante interesse da comunidade científica é a obtenção de nanopartículas metálicas pela redução e estabilização das nanopartículas por micelas de polímeros diversos entre eles o Pluronic F127 [23],

sendo que a funcionalização do polímero com tios pode promover por si a redução dos ions Au^{3+} a ouro metálico com dimensão na faixa de clusters.

A caracterização dos clusters de ouro pode ocorrer por vários caminhos distintos, fornecendo informação sobre a distribuição de tamanhos, forma, modo de organização, entre outras.

A análise por espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) é uma das técnicas mais utilizadas na caracterização de sistemas que possuem partículas de ouro em escala nanométrica e de clusters, uma vez que a depender do tamanho da partícula, bandas características são observadas, a exemplo da banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR), que ocorre entre 515 e 560 nm, sendo ocasionada pela interação do feixe incidente sobre as partículas, o que promove a excitação dos elétrons livres presentes nas partículas, levando estes a se deslocarem coletivamente. O deslocamento coletivo dos elétrons e a força de restauração desse deslocamento provocam a formação do comprimento de onda ressonante [37].

No caso específico dos clusters a depender do tamanho destes (<2nm) não é possível observar a banda plasmônica, isso porque a dimensão das partículas é tal que os elétrons destas atingem níveis discretos de energia, sendo mais comumente observado no espectro que envolve partículas nesta dimensão a ocorrência de uma banda larga abaixo de 500 nm [38].

Outra técnica muito útil na caracterização de clusters de ouro é a microscopia eletrônica de transmissão (MET), pois nela é possível fazer não só estimativas da dimensão dos aglomerados de clusters como também obter informações de sua forma e da maneira como estão distribuídos guardados alguns cuidados com relação a morfologia observada na imagem e a representatividade da alíquota em relação a sistema total e possíveis interações do feixe com as amostras de menor tamanho [39].

A espectroscopia de fotoelétrons de raio-x (XPS) também é uma técnica que pode ser explorada na caracterização destes sistemas, uma vez que a interação do feixe com a superfície do material fornece informações das características físico-químicas do mesmo através da medida da velocidade cinética dos fótons emitidos pela amostras após a varredura do feixe de raio-x. [40]. A utilidade desta técnica na caracterização de clusters de ouro é a possibilidade de obter informação dos os estados de oxidação dos elementos químicos nas amostras e como estão dispostos seus vizinhos uma vez que no XPS a interação do feixe ocorre com as camadas mais internas do átomo.

Para a caracterização dos clusters a espectrometria de massa é também uma técnica útil, pois permite a determinação da distribuição de partículas nos clusters, possibilitando assim determinar o efeito do número de átomos sobre o comportamento destes [41] [42].

Por se tratar de uma avaliação de amostras sensíveis aos métodos convencionais de ionização, a espectrometria de massa dos clusters é realizada com ionização por dessorção a laser e análise do tempo de voo (Maldi-Tof), o que permite que a análise seja feita sem que ocorra a fragmentação do analíto no momento da ionização [43].

2.4. Pluronic

O Pluronic é um copolímero anfifílico com estrutura polimérica “ABA” (PEO-PPO-PEO) composto por segmento hidrofílicos de poli-(óxido de etileno) (PEO) e segmentos hidrofóbicos de poli-(óxido de propileno) (PPO) como representado na Figura 3.

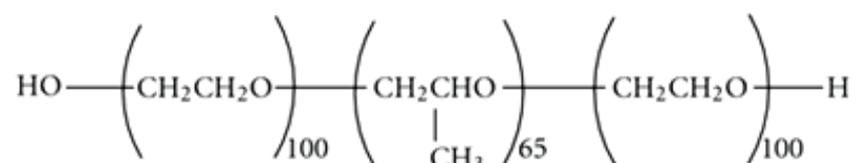


Figura 3- Estrutura química do Pluronic F127

A denominação dos Pluronic leva em conta o estado físico a temperatura ambiente (pasta (P), líquido (L) e Floco (F)), a massa molecular de seus componentes e o percentual dos monômeros constituintes, por exemplo, para o pluronic P105, basta multiplicar os dois primeiros dígitos da numeração por 300 para determinar a massa molar média do hidrófobo (PPO), que no caso é de 3000 g mol⁻¹ e multiplicar o último dígito da numeração por 10 para identificar que percentual de poli(óxido de etileno) no exemplo em questão 50% em massa [44].

O Pluronic P127 têm sido considerado um dos sistemas de transportes biológicos mais promissores, devido ao fato de sua auto-organização em fase aquosa

variar a depender da concentração e da temperatura, podendo ser líquido abaixo de $\sim 15^{\circ}\text{C}$ e semissólido em temperaturas maiores. Assim, é capaz de transportar substâncias pouco solúveis nos líquidos fisiológicos e controlar sua liberação no organismo [45].

Em um trabalho recente LI, et al.(2013), desenvolveram nanocarreadores a partir do pluronic F127 funcionalizado com sequências do aminoácido peptídico PV7 em suas extremidades, e utilizaram o sistema para o encapsulamento e entrega direcionada do anti-cancerígeno Doxorubicina. Os resultados apontaram uma eficiência de encapsulamento de 72,68% e que as nanomicelas funcionalizadas não só apresentaram maior absorção celular como se mostram mais potentes na liberação da Doxorubicina, em comparação com o mesmo sistema de entrega não funcionalizado [46].

A mesofase polimérica depende do tamanho da cadeia hidrofóbica. Se essa é menor que as cadeias hidrofílicas o formato das micelas é predominantemente esférico, porém se o grupo hidrofóbico for maior que o grupo hidrofílico as micelas assumem diferentes estruturas não esféricas [47]. A principal vantagem do uso de micelas poliméricas consiste no fato de serem grandes suficientemente para evitar a excreção renal com massa acima de 50 kDa, mas possuírem dimensão pequena o suficiente para contornar as células endoteliais do baço, o que aumenta muito a biodisponibilidade do fármaco no organismo [48].

Em seu trabalho ALAKHOV et al. (2010), estudaram diversas formulações de Pluronic, entre eles o F127, para o encapsulamento e administração oral do acetato de magestrol, um fármaco hidrofóbico utilizado no combate ao câncer de mama e endométrio que tem também aplicações no combate de doenças associadas ao HIV. Os resultados com Pluronic F127, avaliados pelo método área sob a curva, apontaram um aumento de 1,5 a 2 vezes na biodisponibilidade do fármaco nos ratos modelos em comparação ao sistema de controle, o que denota a eficiência dos sistemas nanoencapsulados formados pelo Pluronic [49].

O controle na estabilidade das micelas poliméricas resulta diretamente no controle da liberação dos fármacos nela solubilizados, por isso a resposta a estímulos ambientais são exploradas quando acontecem dentro do intervalo de condições biológicas acessíveis, podendo assim alterar a estrutura física e química das cápsulas [50]. No caso do Pluronic, as coroas das micelas são formadas pelo PEO que autorizado pela FDA, é um dos blocos mais utilizados em copolímeros para formação de coroa com fins de transporte em meio biológico, devido o fato de apresentar alta

hidratação e mobilidade em meio aquoso, o que dificulta a interação desses com proteínas do sistema endotelial que ocasionariam a excreção das micelas [51]. O núcleo das moléculas de Pluronic é hidrofóbico e torna-se o principal sítio para o transporte de fármacos que possuem baixa solubilidade em água, formando com tais fármacos um sistema por conjugação não covalente.

Butt et.al. (2012), prepararam micelas utilizando Pluronic F127 e D-tocoferol polietilenoglicol 1000 succinado (TPGS) em diferentes razões molares, visando obter nanocápsulas para entrega direcionada de drogas anti-câncer e incorporaram Doxorubicina como molécula modelo. As razões molares 7:3 e 5:5 entre Pluronic e TPGS apresentaram os resultados mais satisfatórios no que diz respeito ao raio hidrodinâmico, quantidade de fármaco e eficiência de retenção quando comparados ao sistema de entrega formado apenas pelo Pluronic, o que possibilita uma maior eficiência no tratamento de tumores permeáveis [52].

A funcionalização do Pluronic com diferentes grupos tem apresentado um aumento na estabilidade de micelas desse tipo de polímero, uma vez que estas são diluídas na corrente, sendo removidas mais facilmente do organismo após solubilização [53].

Pluronic F127 e P123 foram funcionalizados com tocoferil succinado formando um sistema que foi utilizado para incorporação do Paclitaxel, uma droga anti-câncer. A caracterização do sistema demonstrou que as micelas de Pluronic funcionalizado apresentaram eficiência de encapsulamento 20% superior quando comparado aos sistemas não funcionalizados, além de serem mais estáveis [54].

O Pluronic F127 funcionalizado com terminações tióis foi utilizado na estabilização de um sistema de entrega de droga composto por óxido de grafeno reduzido para incorporação da Doxorubicina. Os resultados apontaram ligações dissulfeto formadas entre o sistema de grafeno e a matriz do Pluronic funcionalizada, além de aumento da eficiência de encapsulamento da Doxorubicina [55].

Outra possibilidade do uso do pluronic para transportar de fármaco é sua associação com Nanopartículas de ouro, que também atuam como transportador de fármaco devido a suas características de superfície. A associação das nanopartículas de ouro com o Pluronic F127 funcionalizado mostra-se um caminho promissor no transporte biológico de fármacos por permitir a construção de carreadores nanoestruturados termoresponsíveis, que possibilitem administração parenteral ou oral do medicamento, além de uma permanência prolongada do fármaco no organismo

[56]. SIMON, BOCA e ASTILEAN (2012), sintetizaram nanopartículas de ouro com Pluronic F127 acima de sua concentração micelar crítica tendo este atuado como agente redutor e estabilizante, o nanossistema obtido foi utilizado na incorporação do azul de metileno (molécula modelo). Os resultados obtidos apontaram a dupla funcionalidade do sistema que pode ser usado para transporte biológico de fármacos e como sondas óticas sensíveis denotando a potencialidade do sistema [57].

2.5. Encapsulamento de Fármacos

A liberação controlada de fármacos bem como o controle de sua ação vem sendo objeto de estudo de diversos institutos. Uma das principais vantagens em relação aos sistemas convencionais de liberação é o aumento da biodisponibilidade e com isto menores dosagens e toxicidade. Cerca de 50% das drogas aprovadas para uso farmacológico não tem boa solubilidade nas soluções aquosas fisiológicas, o que promove uma baixa absorção gastrointestinal e por consequência baixa biodisponibilidade do fármaco no organismo [58].

O encapsulamento é um dos métodos mais difundidos para a liberação de drogas com maior biodisponibilidade. Nesse contexto, o sistema pioneiro com esse objetivo são os lipossomas, os quais são vesículas formadas por bicamada de fosfolipídeos, que apesar de possuir características semelhantes às de vesículas naturais, não conseguem ser eficientes no transporte de todos os tipos de fármacos, além de possuírem diversas limitações para tal finalidade [59].

Diversas pesquisas visam o desenvolvimento de polímeros capazes de realizar a entrega controlada de fármacos e em alguns casos mais específicos busca-se sua entrega localizada diminuindo as interações medicamentosas e aumentando a biodisponibilidade dos fármacos, sendo uma ferramenta muito útil na administração de fármacos de janela terapêutica estreita [60].

A nanotecnologia tem papel preponderante no desenvolvimento de tais sistemas, pois, arranjos micelares de polímeros associados a nanopartículas metálicas tem demonstrado eficiência no transporte de fármacos, sendo um campo de estudo promissor não somente para entrega direcionada, mas também para a aplicação de gatilhos que respondam a estímulos [11], [61].

2.6. Baicaleína

Muito difundida na China e no Japão a baicaleína é um flavonoide extraído da erva *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huangqin), sua estrutura química está apresentada na Figura 4 e sua maior aplicabilidade na Ásia está no combate a doenças hepáticas e cardiovasculares.

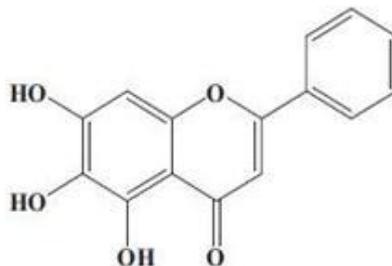


Figura 4- Estrutura química da baicaleína

A *Scutellaria baicalensis* fornece quatro tipos de flavonas com potencial medicinal sendo elas a wogonina, wogonosideo, baicaleína e baicalin, nas proporções de aproximadamente 1,3%, 3,55%, 5,41% e 10,11% para o material seco respectivamente [62].

A baicaleína tem sido ultimamente explorada devido as suas surpreendentes propriedades, ela tem se mostrado um poderoso anti-inflamatório utilizado para combater doenças pulmonares [63] [62], combate a ploriferação de células cancerígenas por induzir a apoptose de uma variedade desse tipo de célula [64]. Outra característica da baicaleína são suas propriedades anti-oxidantes, pois estudos apontam sua habilidade de impedir o desenvolvimento de oxidases, enzimas responsáveis pela oxidação das células [65] e mais recentemente estudos têm explorado a baicaleína como um anti-viral no combate aos vírus do H5N1 e H1N1 [66] [67].

Zhang et.al (2013) estudaram a aplicabilidade da baicaleína no combate a ocorrência de tumores osseos por indução a apoptose de células cancerígenas, e observando que a mesma tem efeito significativo no combate as células

osteossarcoma com utilização de 75 nmol L^{-1} da baicaleína e que sua eficiência melhorava com maior tempo de exposição [68].

2.7. Catálise por Nanopartículas de ouro

O uso de Nanopartículas de ouro como agente catalítico de reações já é bem difundido no meio científico, uma vez que o ouro em escala nanométrica apresenta atividade catalítica acelerando a reação de purificação de hidrogênio para células de combustível, obtenção de produtos de química fina, e algumas reações orgânicas [69].

O grande apelo do ouro frente a outros metais está no fato deste ser muito mais estável em estado puro, já que outros metais quando expostos a atmosfera são recobertos por um filme passivante ou mesmo sofrem oxidação de modo rápido tornando-os inadequados para aplicações nanométricas [70].

As observações a respeito das propriedades catalíticas do ouro ganharam grande repercussão depois que se observou que à medida que o ouro tem sua dimensão reduzida ocorre um aumento em sua atividade, fato que motivou muitas pesquisas para desmistificar se o ouro possuía boa atividade catalítica ou se os efeitos observados eram devido a presença de impurezas, o que ocasionou a descoberta que o ouro não somente era um bom catalisador, mas figurava como o melhor para determinadas reações [70].

MAJOUGA, *et.al.* (2015), realizaram a síntese de um compósito de Nanopartículas de ouro e um suporte orgânico, avaliando posteriormente a sua atividade catalítica na redução do 4-nitrofenol, chegando a conclusão de que os compósitos com Nanopartículas de ouro menores (15 nm) apresentavam melhor atividade catalítica frente as de dimensão maior (20 nm), com constantes de velocidade de $1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $7,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ respectivamente, denotando assim a eficiência do ouro na catalise da reação e a dependência da atividade catalítica com a dimensão da partícula [71].

Outro aspecto que motiva estudos das Nanopartículas de ouro como agente catalítico em reações é o fato que o ouro permite a formação de partículas nanométricas com uma grande variedade de morfologias, o que por sua vez promove uma maior seletividade para determinadas reações.

3. Objetivos

O objetivo geral dessa Dissertação é preparar e caracterizar nanopartículas e nanoclusters de ouro estabilizadas com Pluronic F127 funcionalizado ou não com ácido tioglicólico (TGA), sistemas a serem empregados para incorporação de uma molécula modelo (baicaleína) e avaliação da atividade catalítica.

Os objetivos específicos são:

- Funcionalizar o Pluronic F127 com o TGA através de reação de esterificação
- Caracterizar os polímeros funcionalizados por $^1\text{HNMR}$.
- Preparar Nanopartículas de ouro utilizando o Pluronic F-127 como agente redutor/estabilizante.
- Sintetizar as nanopartículas de ouro estabilizadas com os polímeros funcionalizados.
- Caracterizar as nanopartículas de ouro por espectroscopia de absorção molecular no UV/VIS (banda plasmônica) e microscopia eletrônica de transmissão.
- Investigar a cinética de formação das partículas.
- Avaliar a atividade catalítica dos sistemas.
- Solubilizar uma molécula modelo (baicaleína) no sistema Nanopartículas de ouro/pluronic F127.

4. Parte experimental

A Tabela 1 apresenta os reagentes e solventes utilizados e suas procedências, os quais foram utilizados sem purificação adicional. A água utilizada foi deionizada por sistema Millipore®.

Tabela 1 - . Reagentes e solventes utilizados.

Reagentes	Fornecedores	Massa molar (g mol ⁻¹)
Acido Tioglicólico– 98%	Sigma-Aldrich	92,11
Cloreto de ouro (III) trihidratado – 99,9%	Sigma-Aldrich	339,79
Pluronic F127	Sigma-Aldrich	12600
Citrato de Sódio – 99%	Synth	258,06
Tolueno – 99,5%	Dinâmica	92,14
Etér etílico-99%	ChromoLine	74,12
Clorofórmio- 99,8	Nuclear	119,38

4.1. Metodologia

4.1.1. Funcionalização do pluronic

O método utilizado para a funcionalização do Pluronic F127 foi uma adaptação do método empregado para tiolação do PEO descrito por BOURGEAT-LAMI e GUYOT (1997) [72]. Em um balão volumétrico de 50 mL foram pesados 3,00 gramas (0,24 mmol) de Pluronic F127, sendo posteriormente solubilizados em 50 mL de tolueno a temperatura ambiente. Este balão foi conectado a um sistema de destilação azeotrópica para remoção da umidade do PF-127, realizando a destilação a 105°C por 3h. Após a destilação azeotrópica foram adicionados 168 µL (2,4 mmol) de ácido tioglicólico (TGA) no balão contendo a solução de Pluronic F127/tolueno, o que se traduziu em um excesso molar de 10 vezes do funcionalizante em relação ao polímero. Um sistema de refluxo foi conectado o balão contendo a solução, sendo então aquecido a temperatura de 110°C em um banho de silicone e mantido sob refluxo durante 24 h. Após este período, a solução foi rotaevaporada, até a secagem sendo o produto obtido redissolvido em clorofórmio (5 mL) e precipitado em éter etílico a 4°C (20 mL), formando então um precipitado branco. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta graduada e o corpo de fundo foi seco em dessecador sob vácuo a temperatura ambiente.

4.1.2. Obtenção das nanopartículas de ouro

4.1.2.1. Redução por meio de Citrato de sódio

As nanopartículas de ouro (AUNPs) foram preparadas pela metodologia descrita por TURKEVICH et al. (1951) [24]. Uma solução $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido tetra cloroáurico (HAuCl_4) foi preparada dissolvendo-se 0,5859 g do sal em 1 L de água deionizada, para ser usada nos ensaios subseqüentes. Em um balão volumétrico de 100 mL foi adicionado 66 mL da solução $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de HAuCl_4 , tendo seu volume completado até o menisco com água deionizada, formando uma solução de concentração final de $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Uma alíquota de 95 mL da solução $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi e transferida para um balão de fundo redondo que foi submetido a aquecimento em um banho de silicone. Após atingir a temperatura de 100°C, 5 mL de

citrato de sódio a 1% foi adicionado ao balão contendo a solução de HAuCl_4 , mantendo-se o sistema a 100°C por 5 minutos. Após resfriamento, produto obtido foi transferido para um frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração.

4.1.2.2. Redução por Pluronic F127

Alternativamente, as AuNP's foram preparadas pelo método de redução pelo Pluronic F127 não funcionalizado (PF127), conforme sugerido ALEXANDRIDIS e TSIANOU (2011) e com o Pluronic F127 funcionalizado neste Projeto (PF127-Tiol) [27].

Foram definidas três concentrações de PF127-Tiol para que servissem de base para o estudo. Foram pesados em cinco balões de fundo redondo de 50 mL 0,0136 g ($0,1 \times 10^{-3}$ mol), 0,0627 g ($0,5 \times 10^{-3}$ mol), 0,1273 g (1×10^{-3} mol), 0,1901g ($1,5 \times 10^{-3}$ mmol), 0,2546 (2×10^{-3} mmol) de PF127, nos quais foram adicionado 8,7 mL de água deionizada e 1,3 mL da solução $1,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de HAuCl_4 , obtendo-se uma concentração final $0,2 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de HAuCl_4 . Os balões foram imersos em banho de silicone, sob temperaturas definidas na tabela 1, e mantidos sob agitação magnética por 2 h. O produto obtido de cada balão foi transferido para frascos de vidro âmbar e armazenados sob refrigeração. O mesmo procedimento foi utilizado para o PF127 (não funcionalizado), avaliando-se os efeitos da concentração de PF127, temperatura e incidência de luz UV (365 nm) sobre a formação das AUNPs, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2- Sequência experimental para obtenção das Nanopartículas

Amostras	Pluronic F127 quantidade / mmol L ⁻¹	Temperatura / °C	incidência UV (365 nm)
PL 0.1mM-25-UV	0.1	25	Sim
PL 0.5mM-25-UV	0.5		
PL 1mM-25-UV	1.0		
PL 1,5mM-25-UV	1,5		
PL 2mM-25-UV	2,0		
PL 0.1mM-25	0.1	25	Não
PL0.5mM-25	0.5		
PL1mM-25	1.0		
PL 1,5mM-25	1,5		
PL 2mM-25	2,0		
PL0.1mM-60-UV	0.1	60	Sim
PL0.5mM-60-UV	0.5		
PL1mM-60-UV	1.0		
PL 1,5mM-60-UV	1,5		
PL 2mM-60-UV	2,0		
PL0.1mM-60	0.1	60	Não
PL0.5mM-60	0.5		
PL1mM-60	1.0		
PL 1,5mM-60	1,5		
PL 2mM-60	2,0		

4.1.2.3. Redução por meio de Citrato e Pluronic F127

Alíquotas de 10mL da suspensão de Aunps preparada anteriormente foram adicionadas a balões de 50ml contendo PF127-Tíol gerando soluções com concentrações finais de 0,1; 0,5 e 1 mmol L⁻¹ do polímero. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 2 horas a temperatura ambiente, sendo o produto obtido transferido para frasco de vidro âmbar e armazenado no refrigerador. O mesmo procedimento foi realizado para o PF127.

4.1.2.4. Cinética de formação das Nanopartículas

O efeito da concentração do PF127 sobre a cinética de formação das Aunps também foi investigado na presença e ausência da incidência de luz UV. As sínteses das AuNPs foram monitoradas pela técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis e os resultados foram utilizados para construção de curvas que correlacionavam o aumento na intensidade da absorbância da banda de ressonância plasmônica com o tempo. As curvas foram ajustadas a modelos cinéticos para determinação das constantes cinéticas e o mecanismo de cristalização de cada amostra.

4.1.2.5. Avaliação da atividade catalítica das nanopartículas

Para avaliar a atividade catalítica das AuNPs foi utilizado o sistema modelo de redução do p-nitrofenol na presença de borohidreto de sódio. Para tal adaptou-se o procedimento descrito por GAO et al.(2014), que faz a redução do -nitrofenol utilizando o ouro como catalisador da reação [73].

Em tubos de ensaios, foram adicionados 3 mL de uma solução de borohidreto de sódio a 10 mmol L⁻¹, e posteriormente 500 µL da solução de Aunps obtidas por redução por PF127 a 1 mmol L⁻¹. Comparativamente, adicionou-se o mesmo volume de solução de AUNPs obtidas pelo método Turkevich a um segundo tubo. As amostras foram agitadas e tiveram seus espectros monitorados ao longo do tempo, observando-se a redução da banda existente a 400 nm, característica da presença do p-nitrofenol não reduzido.

4.1.2.6. Avaliação da eficiência Encapsulamento

A avaliação da eficiência dos sistemas no encapsulamento de bioativos foi realizada utilizando o flavonoide baicaleína como molécula modelo, seguindo o procedimento já padronizado pelo grupo de pesquisa. Para a avaliação foi adicionada 0,0010 g da baicaleína aos sistemas de AuNPs preparadas e estabilizadas com PF127-Tiol e PF127. A determinação de baicaleína não incorporada no sistema foi realizada nos filtrados após centrifugação/filtração em filtros Millipore Microcon 100 kDA a 10000 r.p.m. por 5 min., a partir da construção de curva de calibração por espectroscopia de absorção molecular no UV/Vis.

A eficiência de encapsulamento (E.E.), referente ao percentual de baicaleína associada às nanopartículas ou aos sistemas micelares, foi determinada pela Equação 7:

$$E.E. = \frac{C_{total} - C_{filtrado}}{C_{total}} \times 100 \quad (7)$$

O conteúdo total nas formulações foi confirmado pela solubilização de 100 µL do sistema micelar contendo baicaleína em 9,9 mL de metanol por espectroscopia no UV-Vis

4.2. Caracterização das amostras

4.2.1. Espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis

As amostras foram analisadas por espectroscopia de absorção no UV-Vis em um equipamento de marca Perkin-Elmer modelo LS-50, em cubetas de quarto de 1 mL com caminho ótico de 1 cm. As cubetas foram posicionadas no equipamento de maneira que uma continha uma alíquota do analito e a outra uma alíquota do solvente, ocorrendo então à varredura do espectro de 700 a 200nm.

4.2.2. Determinação de grupos Tiois pelo método de Ellman's

A presença de grupos tióis associados às cadeias poliméricas foi avaliada pelo método de Ellman [74], que utiliza espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis.

Para realização do teste de Ellman preparou-se inicialmente 50 mL de uma solução contendo 2 mmol do reagente 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e 50 mmol de acetato de sódio em água deionizada, mantendo-se essa solução sob refrigeração. Em seguida foi realizada uma curva de calibração partindo de uma solução estoque a 10 mmol de N-acetil-L-cisteína dissolvida no tampão Tris pH 8,0, da qual foram obtidas posteriormente soluções de concentrações menores, por diluição utilizando-se a mesma solução tampão.

As medidas foram feitas preparando-se diretamente em uma cubeta de 1 mL o reagente de Ellman, para tal foi adicionado a cubeta 50 µL da solução de DTNB preparada anteriormente, 100 µL do tampão Tris pH 8 e 840 µL de água deionizada, sendo então essa solução utilizada na cubeta de referência e na que receberia a alíquota a ser analisada.

Ao reagente de Ellman foi adicionada a cada análise uma alíquota de 10 µL da amostra de concentração conhecida, a solução contendo a amostra permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 5 minutos, sendo depois analisada por espectroscopia de absorção no UV-Vis em observação a banda formada a 412 nm.

O mesmo procedimento adotado para a construção da curva de calibração foi utilizado para medir o grau de funcionalização das amostras, sendo que para tal, foi preparada uma amostras 0,5 mmol do polímero funcionalizado.

4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As amostras também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para que pudesse ser observada a distribuição de tamanho de partícula e sua organização. Diluiu-se as amostras em água na proporção de 1:10, sendo que uma gota de 2µL foi depositada sobre um grid de cobre recoberto por formvar/carbono. As análises foram realizadas em um equipamento de marca Jeol modelo JEM-1400 Plus de 120 kV, localizado no centro multiusuário de nanotecnologia da UFS (CMNano-UFS).

4.2.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As medidas de ¹H RMN foram realizadas do PF127-Tiol foram realizadas no Departamento de Química na Universidade Federal de São Carlos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, em um equipamento de Bruker AVANCE DRX400, operando a 9,4 T no qual o ¹H é observado a 400,13 MHz. Os espectros foram adquiridos utilizando uma sonda de detecção multinuclear de 5 mm. Uma amostra de 15 mg de Pluronic F127 foi solubilizada em 600 µL de CDCl₃ e transferida para o tubo de 5 mm. Utilizou-se TMS como padrão interno (δ=0 ppm) para os deslocamentos químicos do ¹H. A largura espectral utilizada foi de 6443,3 Hz (~16ppm) e 64 K (resolução digital de 0,1 Hz) para 6018,9 Hz. Os espectros foram processados usando transformada de Fourier e multiplicação exponencial por um fator de 0,3 a 0,1 Hz.

5. Resultados e Discussão

5.1. Funcionalização do Pluronic F127

A funcionalização do PF127 se deu pela inserção de grupos tióis nas extremidades de cada cadeia polimérica por reação de esterificação (entre a hidroxila terminal do grupo PEO e o ácido carboxílico do funcionalizante:



onde R= CH₂

A destilação azeotrópica realizada antes da funcionalização teve como objetivo eliminar a água presente no PF127. O processo de rotaevaporação teve como finalidade eliminar o solvente da amostra sem degradar o polímero e deu origem a um produto incolor de aspecto gelatinoso a sólido. Por sua vez, a dissolução com

clorofórmio e precipitação com éter teve como objetivo eliminar as frações não reagidas do funcionalizante, o qual foi utilizado em excesso.

A avaliação do teor molar de tióis na cadeia do polímero foi realizado pelo método de Ellman [74]. As amostras funcionalizadas foram diluídas no reagente de Ellman e a mudança de tonalidade da solução de incolor para o amarelo foi observada, o que já foi sugestivo da liberação de grupos tióis na solução. No método de Ellman o DNTB atua na quebra da ligação entre o tiol e seu radical, no caso em questão o PF127, formando uma espécie S-H-TNB e outra equivalente TNB-2 solubilizadas em um tampão pH 8. A análise por absorção molecular no UV-Vis forneceu um espectro com um pico bem definido em 412 nm (Figura 5), o que esta em concordância com o descrito pelo método.

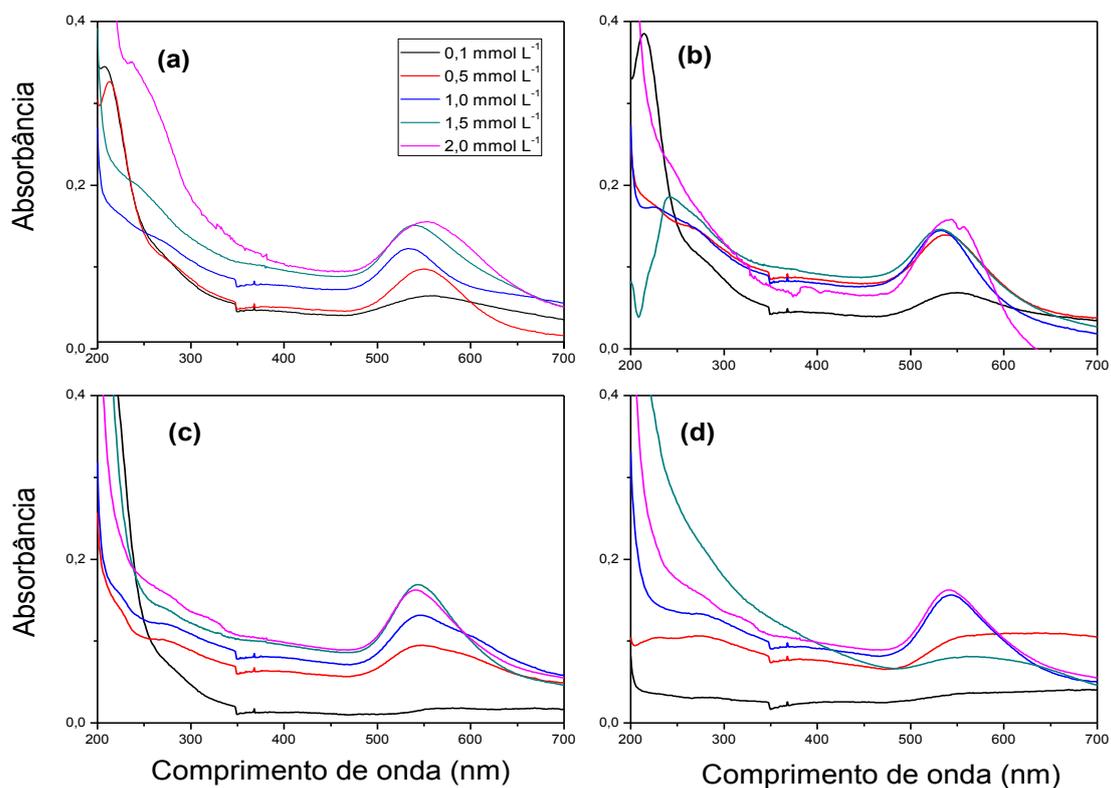


Figura 5- Espectro de absorção no UV-Vis de amostra do ensaio de Ellman

Os valores de absorbância da curva de calibração para a acetilcisteína foram ajustados com correlação linear de 0.94 e a equação obtida foi utilizada na determinação do teor molar de tióis em cada amostra de polímero funcionalizado. O

percentual de funcionalização por esse método foi de 77% considerando as duas extremidades da cadeia.

A Figura 6 apresenta o espectro de ^1H RMN da amostra funcionalizada. De acordo com o espectro obtido por BOURGEAT-LAMI e GUYOT (1997), o deslocamento químico do ^1H para o grupo tiol de PEO funcionalizado com o TGA é em $\sim 2,02$ ppm [72]. O valor encontrado na literatura para o deslocamento químico do ^1H da hidroxila terminal do PF127 é em $\sim 2,04$ ppm (valores estimados pelas figuras dos espectros). No caso do PF127, tem-se a terminação $-\text{[O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$. Com a funcionalização, a terminação da cadeia é $-\text{[O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-CH}_2\text{-SH}$. Apesar do enxofre ser menos eletronegativo que o oxigênio, o que justificaria valores de deslocamento em campos mais altos (próton mais protegido), está mais próximo de uma carbonila (grupo retirador de densidade eletrônica). O ^1H do grupo SH do TGA apresenta deslocamento químico em 2,082 ppm [75]. No produto funcionalizado, espera-se que esse valor seja um pouco menor, pois não se tem mais um ácido carboxílico, mas uma carbonila de éster. Assim, os picos observados no espectro (Figura 6) em 2,087 ppm e 2,062 ppm foram atribuídos aos deslocamentos químicos do ^1H dos grupos OH e SH, respectivamente. A estimativa do rendimento da funcionalização, neste caso, foi de 91%. Cabe destacar, que a proporção de hidrogênio terminal foi confirmada pela comparação com o multipletto em 3,423 ppm (soma das alturas), atribuído ao CH do PPO (proporção de 65:2, referentes ao número de monômeros de PPO e terminações, respectivamente). Avaliou-se o espectro ainda quanto a presença de possíveis contaminantes, como solventes (água, tolueno, éter dietílico) [76] e o ácido tioglicólico [75] (pelo deslocamento químico referente ao grupo carboxílico, já que os demais poderiam ter sobreposição), de maneira que não foram encontrados picos detectáveis. Na Figura 6, foi mostrada apenas a região de interesse ampliada.

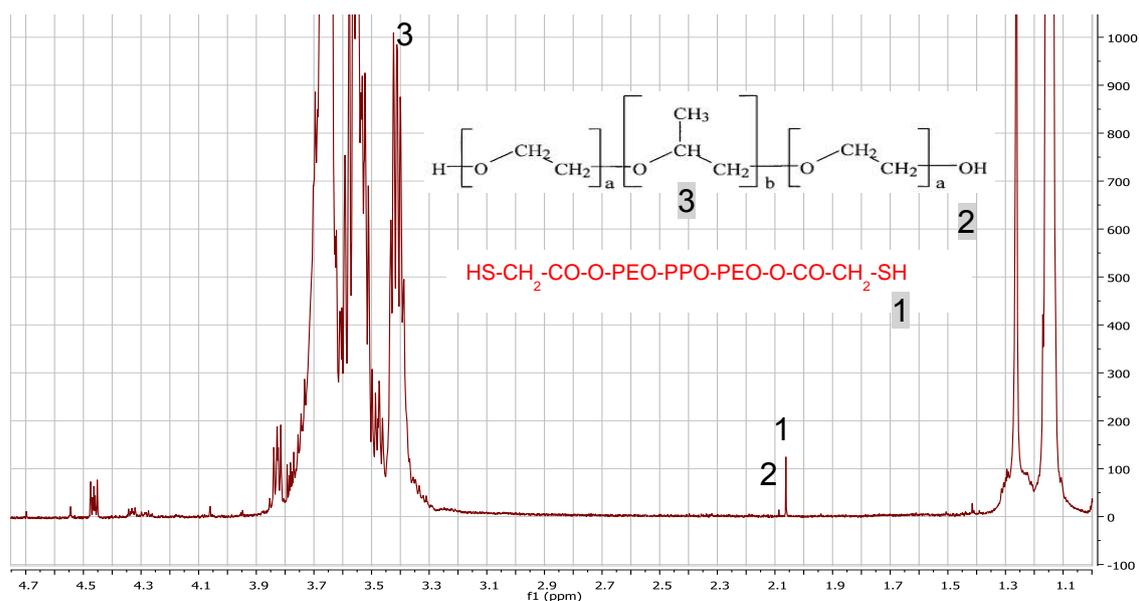


Figura 6 - Espectro de ¹H RMN do PF127-Tiol.

A avaliação pela técnica de RMN, neste caso, é mais precisa que o método de Elmann, uma vez que, possivelmente, a reação colorimétrica não é 100%, fato corroborado pelo valor baixo de correlação linear da curva analítica ($R=0.96$).

5.2. Preparação das Nanopartículas de ouro

A obtenção das AuNPs se deu pelo método de redução em solução diluída, no qual supersaturação, nucleação e o crescimento ocorrem em uma única etapa, sendo regido por dois fenômenos distintos. O primeiro fenômeno é a redução química que pode ser efetuada com uso de agentes diversos, a exemplo do borohidreto de sódio. Já o segundo fenômeno consiste na estabilização da reação por agentes como o citrato trissódico dihidratado [23].

5.2.1. Redução por citrato de sódio

Para efeito de comparação, as AuNPs foram obtidas inicialmente por redução e estabilização realizada pelo citrato de sódio, seguindo o método de Turkevich [24], no qual o citrato desempenha ambas as funções, reduzindo o Au^{3+} a Au^0 e posteriormente estabilizando as nanopartículas.

Neste método, não se observou mudança imediata após a adição da solução de citrato a solução de Au^{3+} , porém após 5 minutos a solução tornou-se vermelho tinto, evidenciando a formação de AuNPs [24].

As amostras obtidas foram submetidas à análise no UV-Vis, fornecendo o espectro apresentado na Figura 7, onde se pode verificar em 530 nm a banda SPR peculiar à presença de AuNPs com dimensão aproximada de 30 nm [77] e com forma esférica [37] [78].

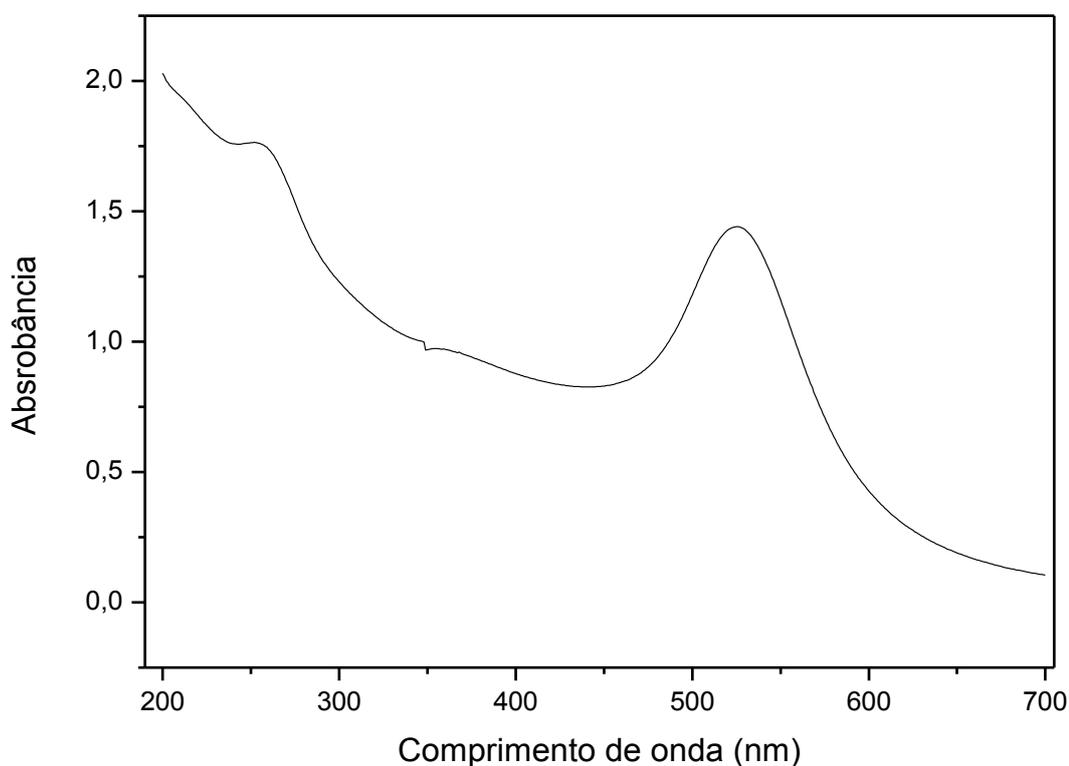


Figura 7 - Análise de UV-vis das soluções obtidas por Turkevich

A banda ainda existente em 260 nm pode ser atribuída a frações de ouro não reduzidas completamente podendo ser Au^{1+} ou Au^{2+} [79].

5.2.2. Redução por Pluronic F127

As AuNPs também foram obtidas por reação do PF127 com o ácido tetracloroáurico, já que o PF127 é capaz de reduzir e estabilizar as AuNPs [80] [27].

No mecanismo de obtenção das AuNPs, como ilustrada na Figura 8, as pseudo-coroas do polímero em solução, abrigam as partículas formadas na nucleação, limitando seu crescimento por ação de estabilização estérica vinculado ao tamanho da cadeia [23].

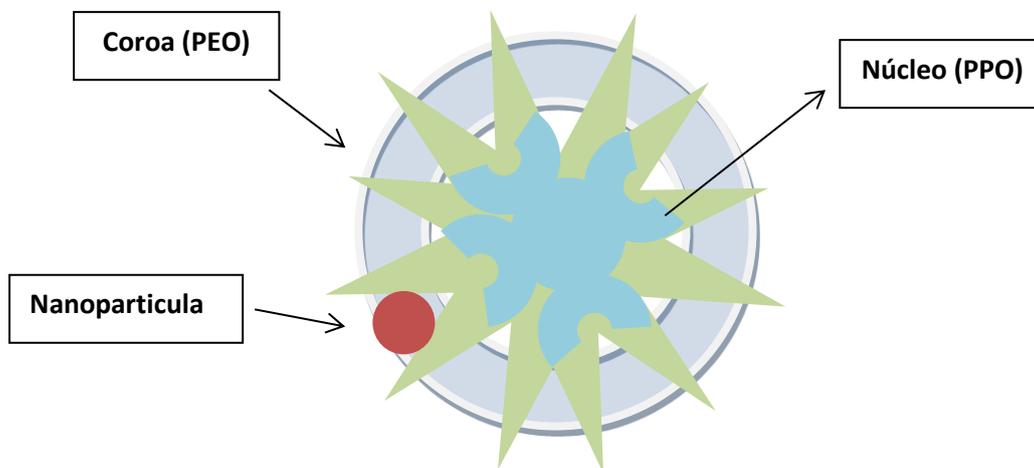


Figura 8 - Mecanismo de obtenção das AuNPs a partir do PF127 [23].

Para a obtenção das nanopartículas adotou-se como referência o trabalho de Sakai *et al.*[81], no qual a concentração de ouro no meio reacional foi de $0,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, porém o Pluronic utilizado no presente Projeto foi o F127, o tempo foi fixado em duas horas e a temperatura do meio reacional foi de 25°C para que fosse analisado o efeito da concentração do copolímero sobre a redução das nanopartículas.

A Figura 9 mostra o espectro de UV-Vis obtido das amostras submetidas à redução/estabilização por Pluronic F127, onde se pode observar que à medida que a concentração do Pluronic F127 aumenta, ocorre o aumento e a redução das bandas em 530 nm e 220 nm, respectivamente.

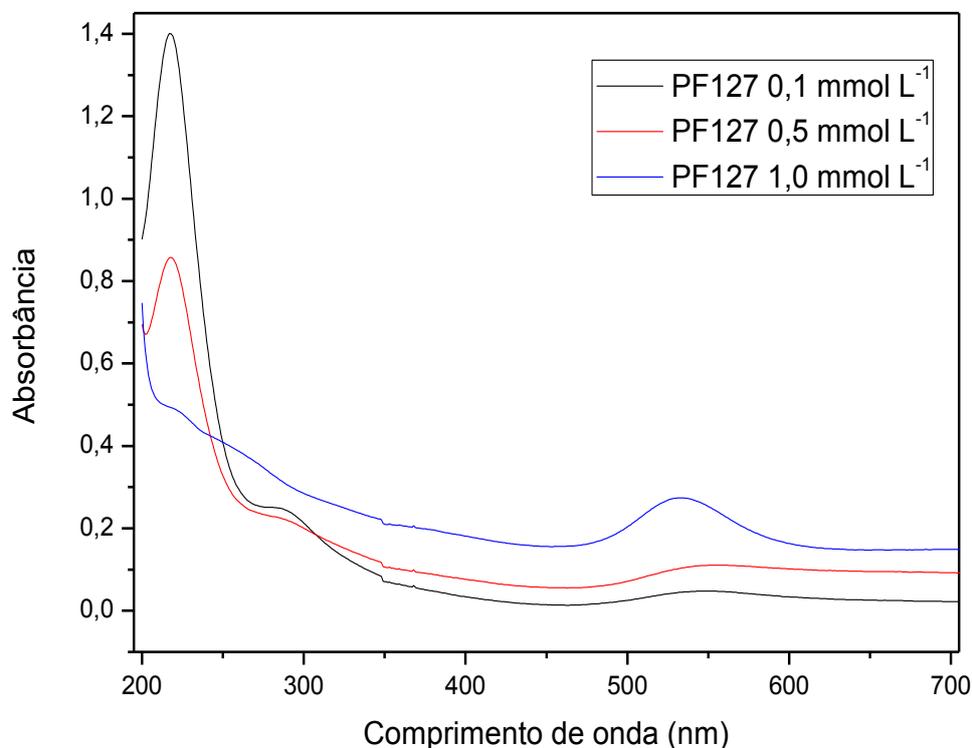


Figura 9 - Análise de UV-Vs das amostras reduzidas com Pluronic F127 não funcionalizado

Para as amostras com concentração mais baixa é observada a formação da banda SPR discreta a 530 nm, porém na amostra reduzida com 1 mmol L^{-1} de PF127, se observa uma formação de banda SPR bem pronunciada e que ocorre deslocamento para 520 nm ('blue-shift'). O aumento da intensidade da banda SPR com o aumento da concentração de Pluronic F127 pode ser explicado pela formação de um maior número de núcleos, originando uma maior quantidade de partículas com dimensão similar, como a banda SPR, associada ao deslocamento dos elétrons de maneira ordenada com o feixe incidente, o maior número de partículas implica numa maior intensidade banda de ressonância por efeito de aproximação das partículas [82]. Além disso, o aumento da concentração do PF127, possivelmente, leva a formação de partículas com dimensão menor, o que é evidenciado pelo deslocamento da banda para comprimentos de onda menores [83], [84]. Nos sistemas que utilizaram o polímero em menor quantidade, pode ser observada uma pequena redução da banda em 220 nm, como também a presença discreta da banda SPR, indicando a diminuição

da concentração de Au^{3+} da solução, bem como a formação de AuNPs, sendo estas maiores em relação às partículas obtidas com maiores concentrações de Pluronic, pelo baixo número de núcleos formados [85].

5.2.3. Comparativo entre método Turkevich e redução por PF127

Como o método de redução por citrato de sódio, também conhecido como método Turkevich é um dos mais difundidos para a preparação de AuNPs, foi realizado um comparativo, deste método e das AUNPs obtidas por redução pelo PF127 pela técnica de espectroscopia de absorção no UV/Vis (Figura 10).

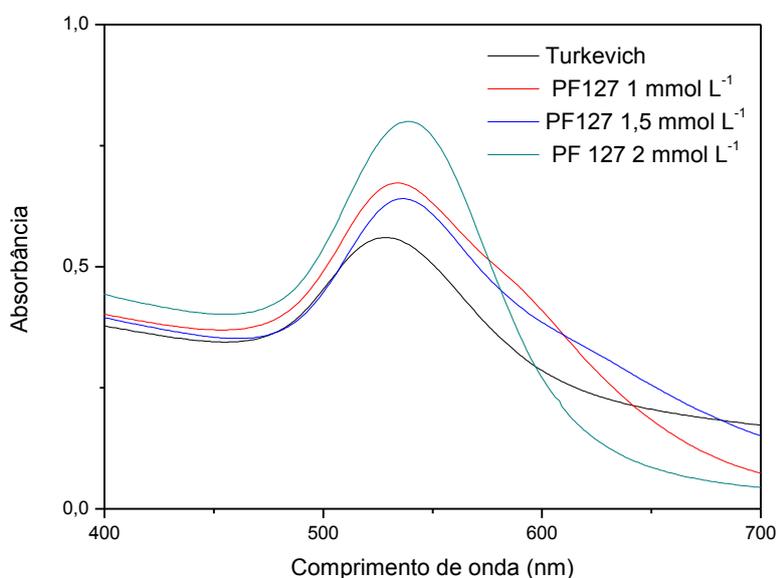


Figura 10 - Espectros de UV-Vis do método Turkevich e concentrações do PF127 em que não se observa banda referente a fração de ouro não reduzido.

A banda SPR referente as nanopartículas geradas por redução e estabilização pelo citrato de sódio apresenta largura a meia altura maior e banda menos intensa quando comparada a banda SPR referente as nanopartículas obtidas por ação do PF127, o que nos leva a acreditar que a polidispersão das nanopartículas obtidas pela ação do PL127 é menor e a sua população é maior, o que já se apresenta como uma vantagem do PF127 em relação ao método Turkevich. Vale a pena mencionar que as

amostras por Turkevich são obtidas a 100°C, enquanto na rota de síntese por PF127, utiliza-se 25°C.

As microscopias de transmissão realizadas nas amostras (Figura 11) deixa essa diferença de dimensão bem evidente

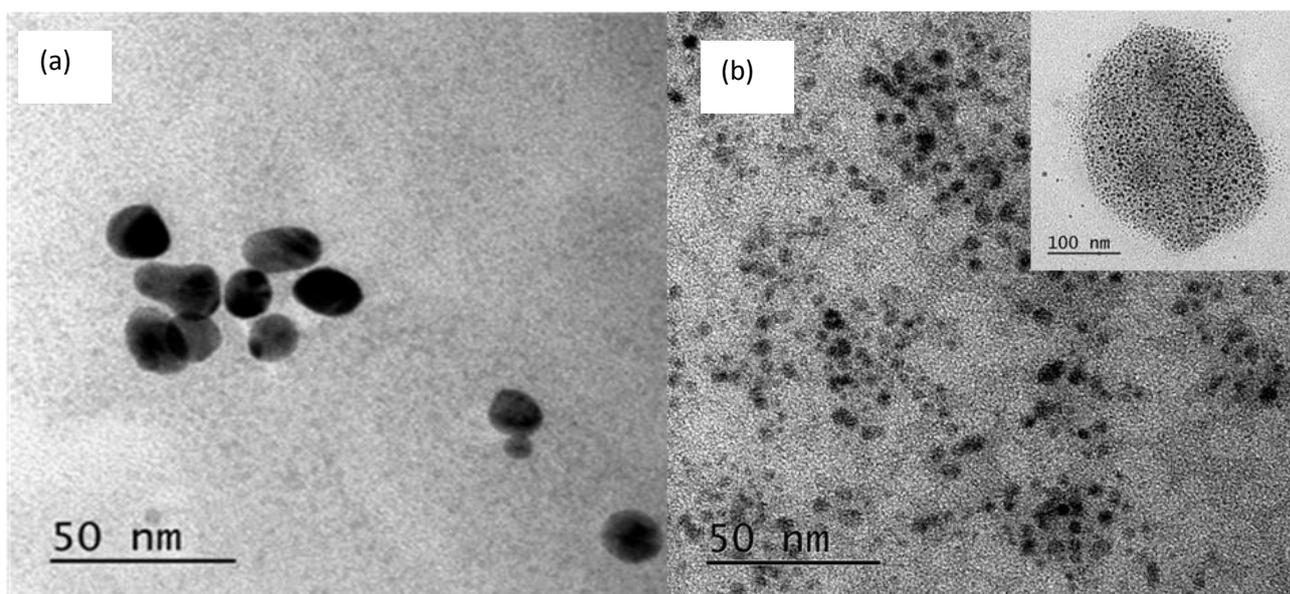


Figura 11 - Microscopia eletrônica de Transmissão das Nanopartículas obtidas por (a) Turkevich e (b) Pluronic F127 1,0 mmol L⁻¹.

Nas imagens (Figura 11), observa-se que o tamanho de partículas obtidas pelo método Turkevich (25 nm) é bem superior ao tamanho das obtidas pela ação do PF127 (7 nm), o que corrobora com as observações feitas a partir dos espectros de UV-Vis. Outra observação interessante é o posicionamento das partículas obtidas pela ação do PF127, que se concentram em regiões circulares que podem ser interpretadas como micelas, reforçando o mecanismo já citado.

5.3. Efeito do Pluronic sobre as partículas pré-formadas

Também foi objeto de estudo desse projeto, o efeito do PF127 sobre nanopartículas já formadas pelo método Turkevich, o que se pode verificar observando o espectro representado na Figura 12.

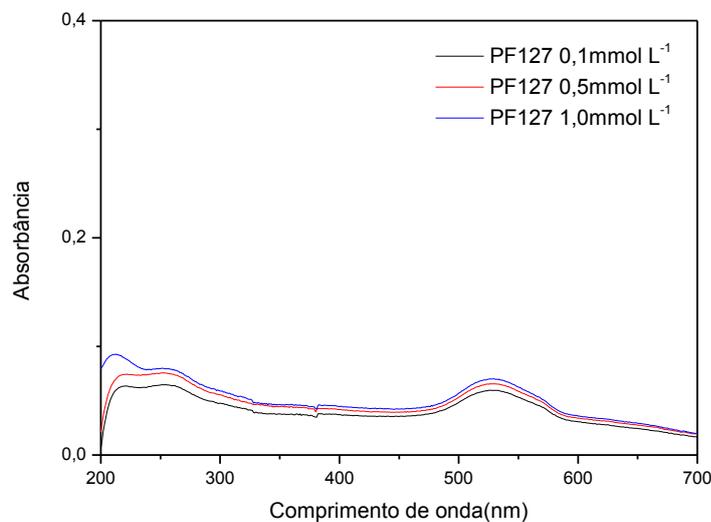


Figura 12 - Análise de UV-vis das amostras reduzidas por Turkevich e associadas ao Pluronic F127 não funcionalizado.

Nas amostras em que foi utilizado o PF127 pode-se observar a não detecção da banda existente a 220 nm atribuída a Au^{3+} não reduzido pelo método Turkevich, com um leve aumento na banda de 530 nm, o que nos leva a afirmar que o Pluronic F127 agiu reduzindo tais frações. No entanto, a linha de base é deslocada, o que sugere espalhamento de luz devido a formação de agregados.

A avaliação da morfologia e da dimensão das nanopartículas foi realizada por TEM. Foram utilizadas as amostras preparadas com a concentração de polímeros de 1 mmol L^{-1} . As AuNPs obtidas pela redução por citrato de sódio apresentaram em média 20 nm de diâmetro e morfologia aproximadamente esférica como observado na (Figura 13A), porém com a adição do PF127 na solução de AuNPs obtidas por citrato (figura 13B), observa-se uma mudança na morfologia e distribuição de diâmetros, onde partículas de menores dimensões se concentram preferencialmente nos agregados poliméricos ('manchas').

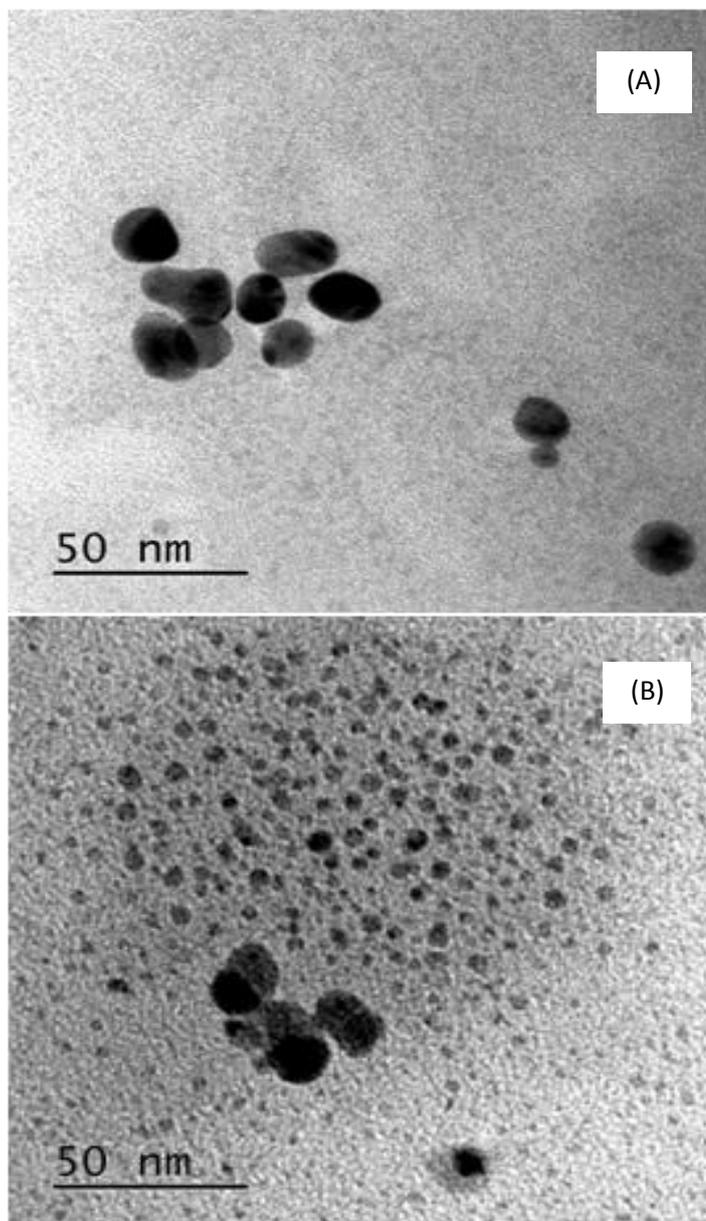


Figura 13 - Imagens TEM das AuNPs (A) reduzida por citrato de sódio ; (B) com posterior adição de PF127.

Os resultados obtidos por TEM estão em concordância com os obtidos por absorção no UV-Vis e são satisfatórios ao projeto, uma vez que mostram a viabilidade do Pluronic na obtenção de nanopartículas de ouro de maneira competitiva ao método de Turkevich.

5.4. Estabilidade dos sistemas

Apesar de apresentar muitas vantagens o Pluronic não consegue estabilizar as nanopartículas de ouro por um longo tempo, e sabendo dessa informação a estabilidade dos sistemas foi monitorada para verificar através do deslocamento ou alteração de intensidade da banda plasmônica, além de espalhamento característico da formação de aglomerados maiores.

A Figura 14 mostra os espectros obtidos a partir das AuNPs até 35 dias de sua síntese, acondicionadas a temperatura ambiente.

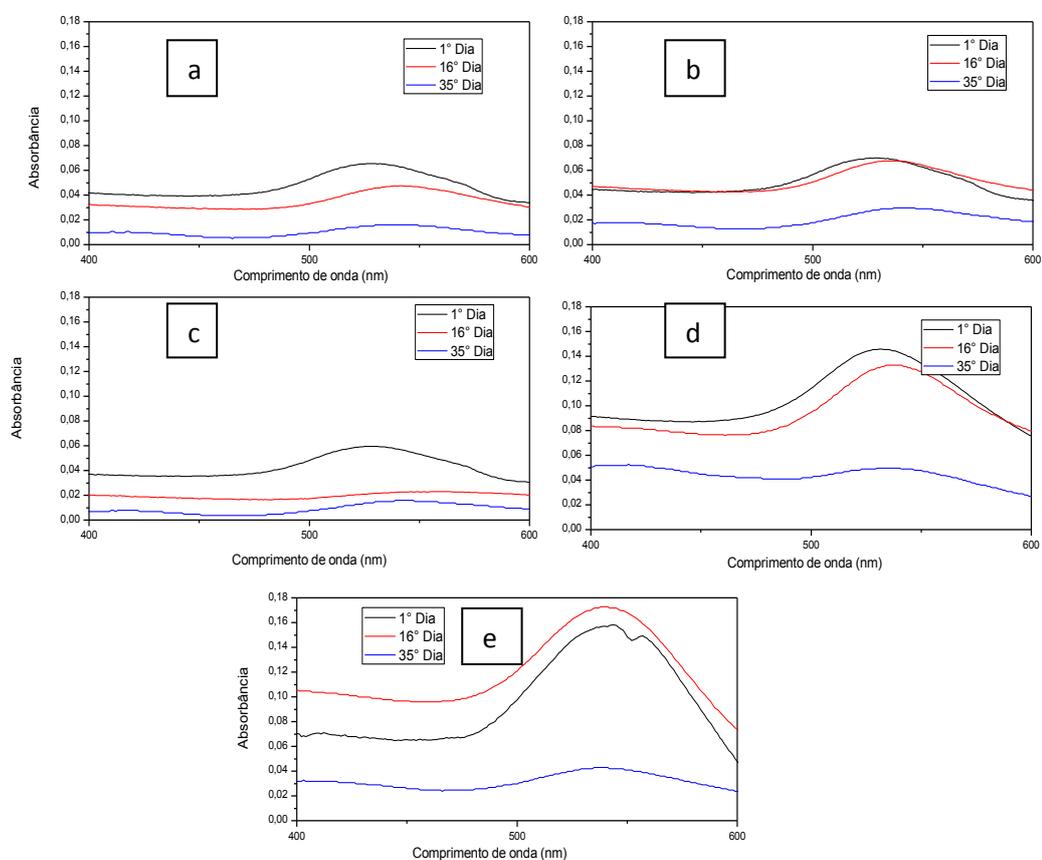


Figura 14 - Espectroscopia no UV-Vis das AuNPs obtidas por PF127 a (a) 0,1 mmol L⁻¹, (b) 0,5 mmol L⁻¹, (c) 1 mmol L⁻¹, (d) 1,5 mmol L⁻¹ e (e) 2 mmol L⁻¹

Mesmo utilizando elevadas concentrações do PF127, não foi possível manter a estabilidade das nanopartículas no prazo de 35 dias, fato essa afirmado com base nas

alterações ocorridas na banda SPR, que além de sofrer redução de intensidade, mostra alargamento do pico e deslocamento para comprimentos de ondas maiores, fenômenos esses associados à redução da população, aumento da polidispersão e aumento da dimensão das partículas. Entretanto, também foi possível observar a existência de banda SPR mesmo aos 35 dias de observação para as maiores concentrações de PF127, o que se pode considerar uma melhoria na estabilidade, embora as partículas formadas por essas concentrações possuam tamanho superior em relação as obtidos em concentrações menores.

5.5. Análise de diferentes condições de síntese sobre a formação das nanopartículas

Os parâmetros de síntese das nanopartículas de ouro foram investigados, visto que a literatura não apresenta estudos dessa natureza para o sistema em questão. Como pode ser visto na Figura 15, a temperatura, concentração e incidência de irradiação UV têm efeito considerável sobre a formação das nanopartículas.

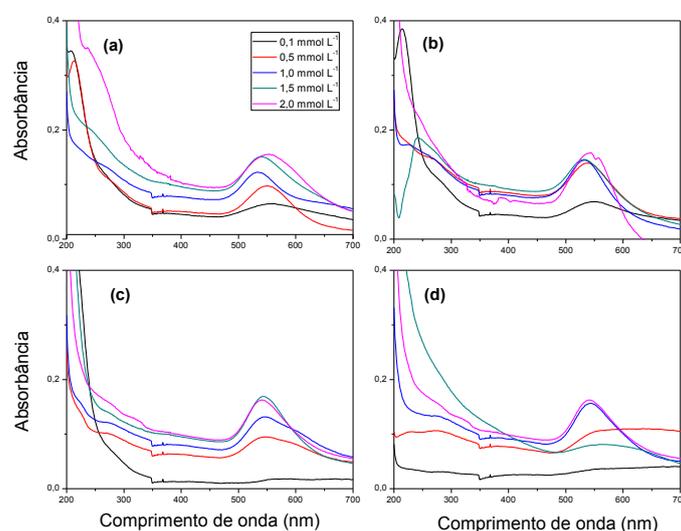


Figura 15 - Nanopartículas de ouro obtidas a (a) 25°C; (b) 25°C + UV; (c) 60°C e (d) 60°C + UV

Quando comparamos às amostras obtidas a 25°C sem e com irradiação de luz UV, observa-se que a incidência de radiação UV, Figuras 15a e 15b respectivamente, leva a formação de uma banda SPR mais intensa e estreita, o que é indicativo da formação de uma maior população de nanopartículas com menor dispersão, além de um deslocamento para comprimentos de onda menores (“blue shift”). A justificativa

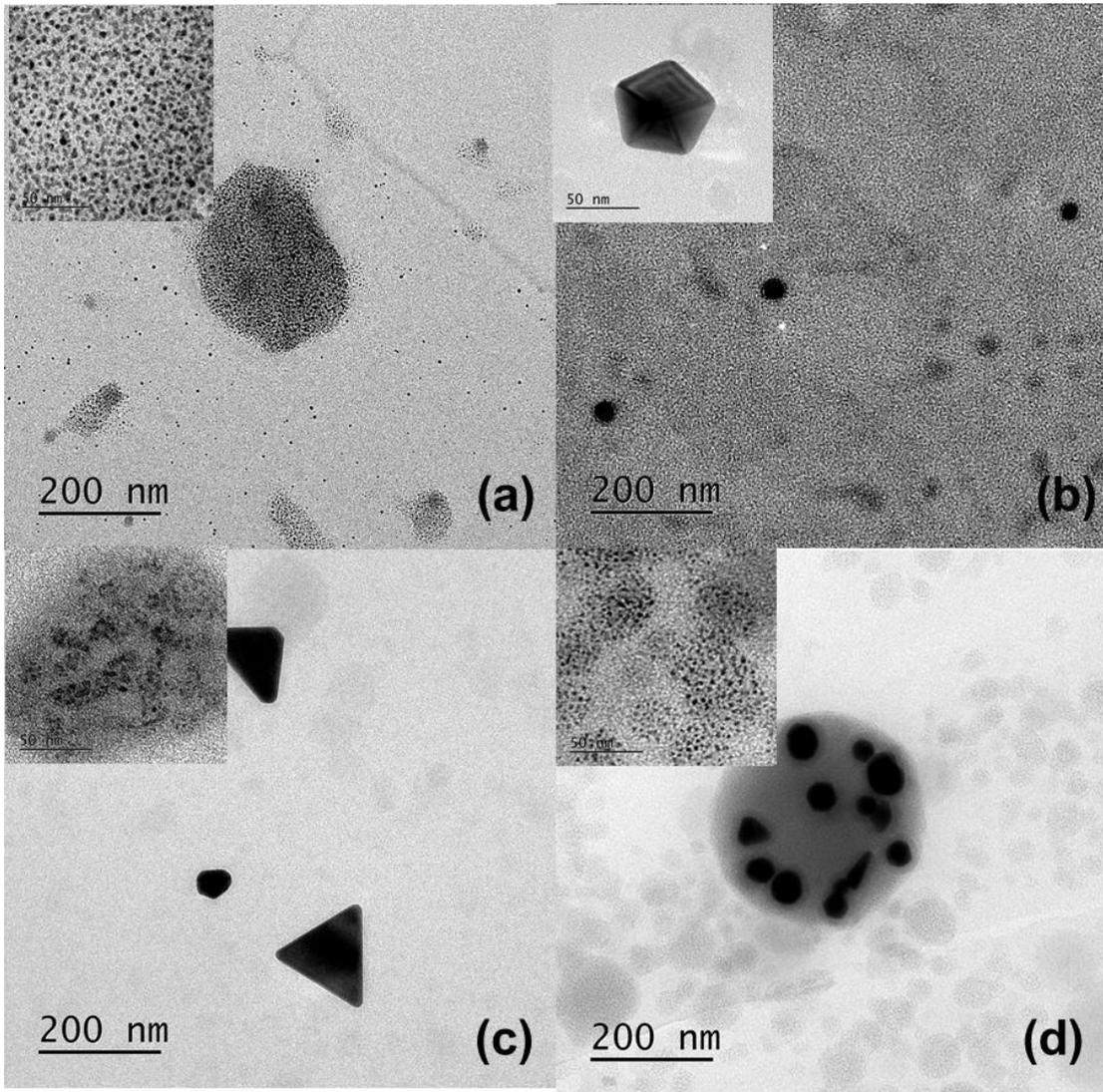
para ambas as observações é a mesma, a radiação UV é capaz de fotocatalisar a redução das nanopartículas de ouro, formando novos núcleos, por sua vez os núcleos formados em maior quantidade são estabilizados pelo PF127, dando origem a um sistema com uma maior população de partículas, distribuição mais estreita e menor dimensão das partículas observadas. O que poderá ser comprovado olhando as imagens de TEM que serão mostradas a seguir (Figura 15).

De fato, SAKAI et al. (2013) observaram que os íons de Au^{3+} são totalmente reduzido em uma concentração de pelo menos 1 mmol L^{-1} de Pluronic F127 . Entretanto , os autores investigaram a síntese apenas a temperatura ambiente e sem irradiação UV [81] .Resultados similares foram encontrados por Yahyaei e Azizian (2013), em que a redução de prata foi mais eficiente usando a incidência de uma lâmpada de UV (6W) a 253,7 nm, em comparação com as amostras obtidas sem incidência de UV . Os autores sugeriram que a incidência de UV excita as moléculas F127 que reduz Ag^+ mais rapidamente [26].

Um efeito similar ao que ocorre com as nanopartículas obtidas a 25°C com e sem incidência UV é também visto para nanopartículas obtidas a 60°C , porém a dimensão das partículas obtidas a essa temperatura é superior as que foram obtidas a 25°C . Neste caso, a dimensão das partículas obtidas a 60°C leva a formação de agregados maiores pela redução da energia de Gibbs do sistema ocasionada pela elevação da temperatura, essa variação na energia de Gibbs faz com que o raio critico para estabilização da nanopartícula torne-se maior, levando a formação de grandes partículas mesmo em concentrações mais altas do Pluronic.

As microscopias apresentadas na Figura 16 comprovam as observações feitas por espectroscopia de UV-Vis, além de fornecerem informações da morfologia e organização as nanopartículas e do PF127 nas diferentes condições empregadas.

(A)



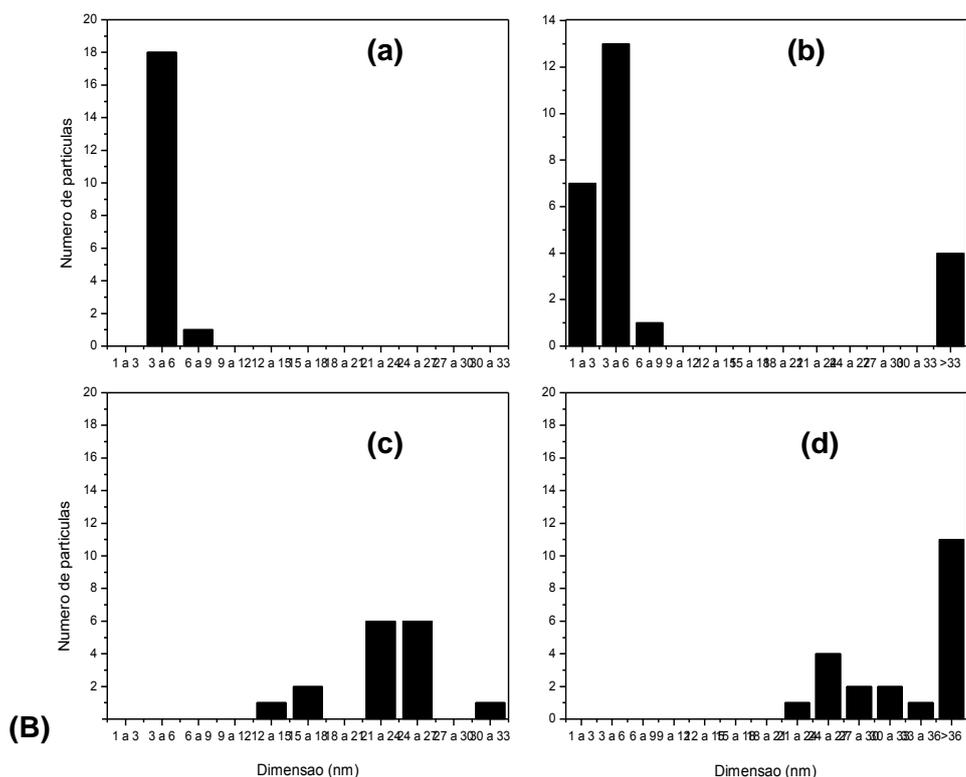


Figura 16 – (A) Imagens obtidas por TEM das nanopartículas obtidas por (a) PF127 + 25°C (b) PF 127 + 25°C + UV (c) PF127+ 60°C (d) PF127+ 60°C + UV. (B) Histogramas respectivos dos tamanhos médios a partir das imagens.

As imagens obtidas microscopia confirmam os dados obtidos por espectroscopia de UV-Vis, uma vez que na temperatura de 25°C (Figura 16-a) observa-se a formação de partículas preferencialmente nas micelas do PF127 com distribuição de tamanho estreita. A incidência de radiação UV (Figura16-b) leva a formação de partículas com dimensão similar, porém há uma pequena fração da população apresenta morfologia diferente das esféricas visualizadas nas amostras obtidas sem incidência de luz, além de maior dimensão(40-50nm). Quando as partículas são obtidas a temperatura de 60°C (Figura 16-c), pode se observar que a dimensão das mesmas aumenta substancialmente, corroborando com os espectros UV. Além disso, observa-se que as partículas fogem a forma esférica e assumem caráter prismático, o que pode ser explorado na entrega de drogas anti-cancer [86]. Mesmo a incidência de luz UV não é capaz de minimizar o efeito da temperatura, pois observando a Figura 16-d observa-se

que a associação da temperatura com incidência de radiação UV leva, na verdade, a partículas maiores que também fogem a forma esférica.

As observações em relação aos tamanhos médios das amostras preparadas em diferentes condições são mais nitidamente observadas nos histogramas da Figura 17, construídos a partir da contagem das amostras.

5.6. Estudo da cinética de formação das nanopartículas

Para avaliação da cinética de formação das nanopartículas foi utilizado medidas de UV-Vis tomadas em intervalo de tempo para concentrações 0,5; 1; 1,5 e $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do PF127, sendo que a concentração de $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ não foi utilizado, visto que nos experimentos anteriores apresentou uma baixa formação de nanopartículas, o que dificultaria o estudo.

Como parâmetro da ocorrência de reação, foi utilizada como referência a evolução da intensidade da banda SPR ao longo do tempo, que não ocorre no mesmo comprimento de onda para todas as concentrações por razões já discutidas nesta Dissertação, porém fica compreendida entre 520 e 560 nm comprimento característico da formação de nanopartículas de ouro.

Para construção das curvas cinéticas utilizou-se correlação de absorvância com concentração segundo a lei de Beer (8).

$$A = a \times b \times c \quad (8)$$

onde a é a absorvância molar, b é o caminho ótico e c , a concentração da espécie

A partir dos dados coletados por espectroscopia de UV-Vis foram construídas curvas que correlacionam a absorvância com o tempo (Figura 17), e tomando como referência a intensidade da banda SPR, pode-se construir as curvas apresentadas na Figura 18, que permitem avaliar a cinética de formação das partículas com o tempo.

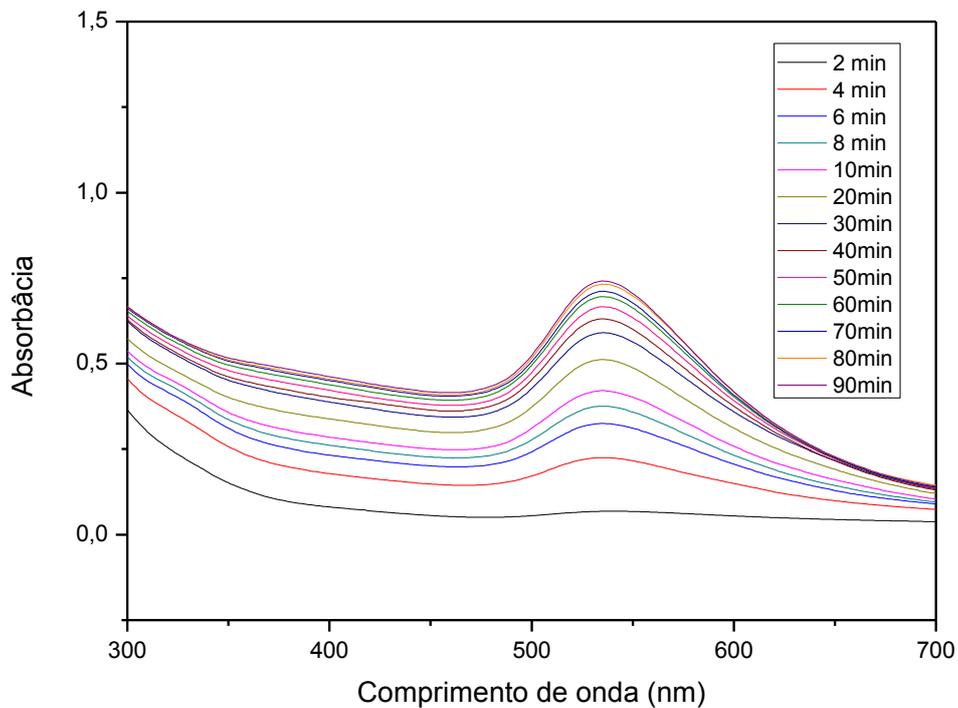


Figura 17 - Espectroscopia de UV-Vis das AuNPs obtidas com 1 mmol L⁻¹ de PF127 e radiação UV ao longo do tempo.

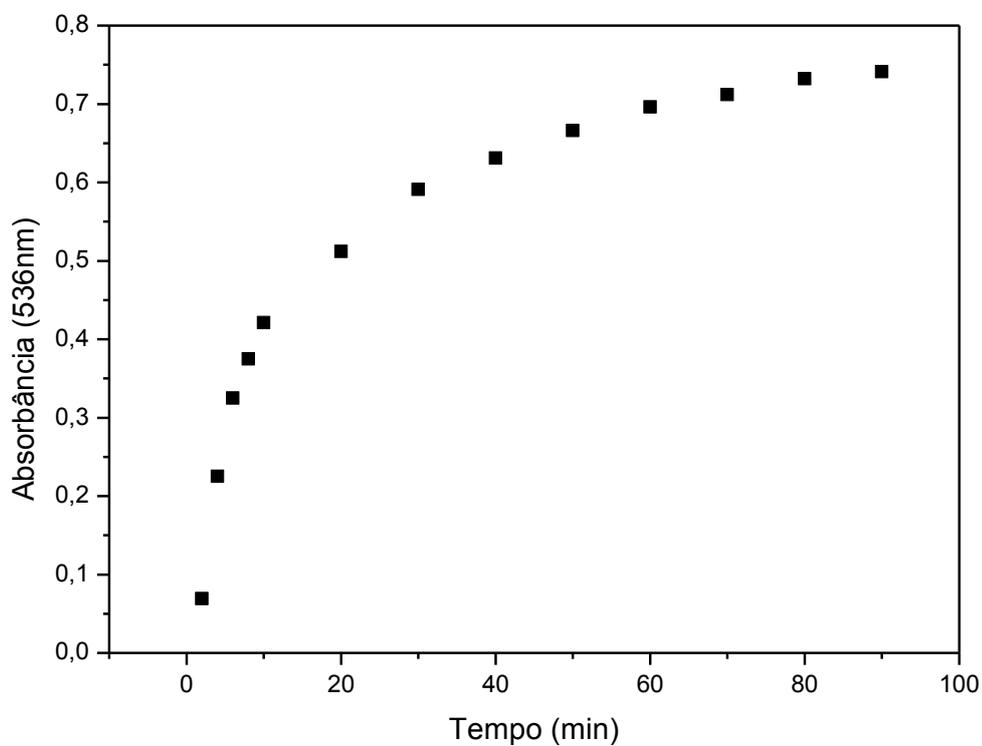


Figura 18 - Variação de intensidade da banda plasmônica das AuNPs obtidas com 1mmol L⁻¹ de PF127 e radiação UV ao longo do tempo.

Os dados obtidos de cada curva foram tratados segundo modelos descritos na literatura [26] que definem como a cinética se ajusta a um modelo de primeira ordem (9), de segunda ordem (10) ou ao modelo de Avrami (11), sendo o ajuste realizado com auxílio do software STATISTICA, pelo método de regressão não linear e estimação do erro pelo método dos mínimos quadrados.

$$A = A_{\infty} (1 - e^{-kt}) \quad (9)$$

$$A = \frac{A_{\infty} kt}{1+kt} \quad (10)$$

$$A = A_{\infty} (1 - e^{-kt^N}) \quad (11)$$

A avaliação cinética forneceu os dados que se encontram na Tabela 3, na qual é mostrada a constante cinética obtida para cada modelo (k), com e sem a incidência de radiação UV respectivamente, bem como o ajuste dos dados a cada modelo (R), sendo que os dados descritos em vermelho apresentaram correlação estatística confiável e os descritos em preto ficaram fora das estimativas estatísticas.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos estimados a partir dos modelos de 1ª ordem, 2ª ordem e Avrami

Concentração de PF127 / mol L ⁻¹	Parâmetros						
	1ª ordem		2ª ordem		Avrami		
	k	R	k	R	k	R	N
0,5	0,0759	95,76	0,1327	98,22	0,1509	98,23	0,7050
1	0,1330	91,20	0,2200	96,12	0,2800	94,96	0,5800
1,5	0,2249	92,25	0,4293	99,39	0,4891	98,32	0,5050
2	0,2012	85,56	0,3560	96,3	0,4728	95,10	0,4637
0,5+UV*	0,0431	99,21	0,0793	97,92	0,0667	99,69	0,8597
1+UV*	0,0719	97,51	0,1283	98,28	0,1306	99,05	0,7539
1,5+UV*	0,1047	96,17	0,1790	95,92	0,1502	96,62	0,8140
2+UV*	0,1169	96,72	0,2004	95,95	0,1521	96,91	0,8575

*a terminologia "+ UV" refere-se a incidência da radiação

Observa-se (Tabela 2) que o comportamento cinético das partículas sofre grande influência das condições de preparação. Para as amostras preparadas sem irradiação UV, observando os ajustes aos dados, a reação ocorre segundo uma cinética de segunda ordem, outro aspecto que pode ser ressaltado é a tendência no aumento da velocidade (constante cinética) à medida que a concentração aumenta, com exceção da concentração de 2 mmol L^{-1} , que tem valor de constante cinética menor que a de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, fato esse que pode ser atribuído ao aumento de viscosidade do meio promovido pela alta concentração do PF127, o que limitaria a mobilidade das espécies em crescimento para os núcleos formados. Um cenário diferente ocorre quando observamos a cinética das amostras que foram submetidas a incidência de radiação UV. Nesse caso, as reações ocorrem preferencialmente segundo uma cinética de primeira ordem, ou seja, com menor influência dos reagentes, já que a irradiação UV é capaz de formar núcleos, causando um efeito sinérgico com a ação do PF127. Essa tendência só não se aplicou às amostras obtidas na concentração de 1 mmol L^{-1} , que continuaram a obedecer o modelo de segunda ordem, o que pode ser atribuído a um predomínio da ação do PF127 sobre a irradiação.

Também houve uma tentativa de se separar as principais etapas que contribuem para a cinética de formação das nanopartículas, a nucleação e crescimento. Para tal foi aplicado o método de derivação da curva para separação das etapas de nucleação e crescimento (Figura 19), se considera o intervalo de dados entre o primeiro máximo e o primeiro mínimo integrantes da nucleação e os demais dados pertencentes a etapa de crescimento [87].

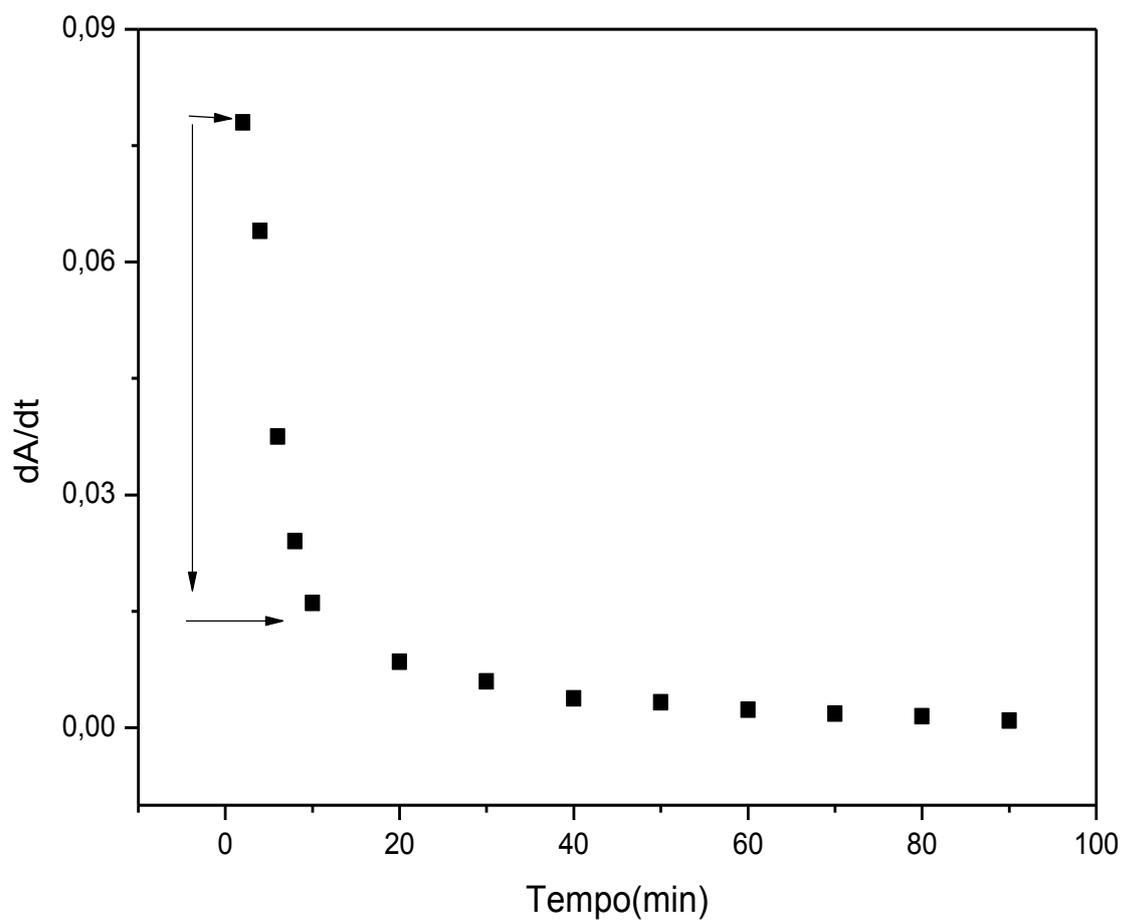


Figura 19 - Derivada da curva de Absorbância em relação ao tempo para a amostra obtida a 1 mmol L^{-1} e irradiação UV.

Estes resultados estão apresentados na Tabela 4, e mostram como se dá a variação das constantes cinéticas e os ajustes dos dados aos respectivos modelos.

Tabela 4 - Dados da cinética de obtenção das nanopartículas separados em etapas.

Etapa	Amostra	1ª ordem		2ª ordem		Avrami		
		K	R	K	R	K	R	N
Nucleação	0,5	0,09379	97,49	0,1285	94,43	0,0663	98,29	1,1823
	1	0,1438	96,46	0,2271	92,64	0,1358	96,49	1,0316
	1,5	0,2284	91,89	0,4367	99,42	0,374282	99,58	1,005395
	2	0,2224	93,15	0,3855	93,91	0,286194	94,68	0,830900
Crescimento	0,5	0,09379	97,49	0,1425	90,24	0,0663	98,29	1,1823
	1	0,06048	66,75	0,03943	58,87	0,255291	83,94	0,579512
	1,5	0,08858	67,63	0,3661	92,29	0,462503	97,20	0,486210
	2	0,1067	37,69	0,2735	91,43	0,495661	94,33	0,430199
Nucleação UV	0,5 + UV	0,0532	99,29	0,0646	97,55	0,0378	99,97	1,1714
	1 + UV	0,0868	97,97	0,1174	95,86	0,0718	98,24	1,0980
	1,5 + UV	0,1147	91,35	0,1645	87,84	0,0760	92,45	1,2200
	2 + UV	0,1248	92,90	0,1837	88,86	0,0842	93,96	1,2100
Crescimento UV	0,5 + UV	0,0392	98,82	0,0961	88,78	–	–	–
	1 + UV	0,0529	97,56	0,1544	88,63	0,1006	99,26	0,8126
	1,5 + UV	0,0688	97,71	0,2468	87,00	0,1407	99,70	0,7834
	2 + UV	0,0762	96,60	0,2992	86,34	0,1767	99,17	0,7526

Observando os dados da Tabela 3 para as amostras obtidas sem irradiação UV, nota-se que com o aumento da concentração a etapa de nucleação apresenta um aumento no valor da constante cinética, chegando a mudar a ordem de reação para as concentrações de 1,5 e 2 mmol L⁻¹, comportamento atribuído a ação do agente redutor em maior quantidade formando núcleos de dimensão similar, o que facilita o alcance do raio crítico. A mesma tendência é observada na etapa de crescimento, porém comparando os dados das concentrações que permaneceram na mesma ordem de reação, ou seja, 0,5 com 1 mmol L⁻¹, e 1,5 com 2 mmol L⁻¹, pode-se supor que a redução na constante cinética de crescimento das nanopartículas está associada com o aumento de viscosidade do meio promovido pelo PF127, que por sua vez pode estar diminuído mobilidade dos núcleos formados e seu crescimento assim como das

espécies em crescimentos. Já a incidência de radiação UV tem efeitos distintos sobre as duas etapas de formação das partículas. A princípio é notório que a irradiação UV promove uma redução média de 40% na constante cinética da etapa de nucleação em comparação ao processo sem incidência de radiação, um indicativo que a nucleação torna-se mais lenta provavelmente pela maior formação de núcleos que por uma concorrência pelas frações reduzida leva mais tempo para alcançar o raio crítico. Na etapa de crescimento, verifica-se a influência da radiação UV de maneiras diferentes a depender da concentração do PF127, pois se observa aumento na velocidade e cinética de primeira ordem, mesmo para as concentrações de 1,5 e 2 mmol L⁻¹. Possivelmente, como a redução de Au³⁺ com irradiação ocorre homoganeamente na solução ao invés de ser concentrada nas coroas dos PF127, o efeito do aumento da viscosidade pode ser minimizado, tendo espécies de crescimento mais próximas as superfícies dos núcleos, supondo um modelo de crescimento limitado por difusão.

Os resultados obtidos através do estudo cinético se assemelham com obtidos por Yahyaei & Azizian (2013), quando estudaram a cinética de obtenção de nanopartículas de prata e viram que as etapas de formação das nanopartículas ocorriam por ordens diferentes e sofriam influência da concentração do polímero [26].

5.7. Avaliação da atividade catalítica das nanopartículas de ouro

A redução do p-nitrofenol possui importância na obtenção de moléculas ativas para aplicações biológicas e farmacêuticas. Devido a isso diversas rotas são estudadas para obtenção realização de tal reação, inclusive com aplicação de catalisadores, visto que o borohidreto de sódio não é eficiente nessa tarefa [88] [89] [90].

O gráfico mostrado na figura 20 mostra o efeito catalítico do AuNPs obtidas por meio do PF127 (figura 20-A) e pelo método Turkevich (figura 20-B) sobre pico existente a 400 nm indicativo da presença do p-nitrofenol [73].

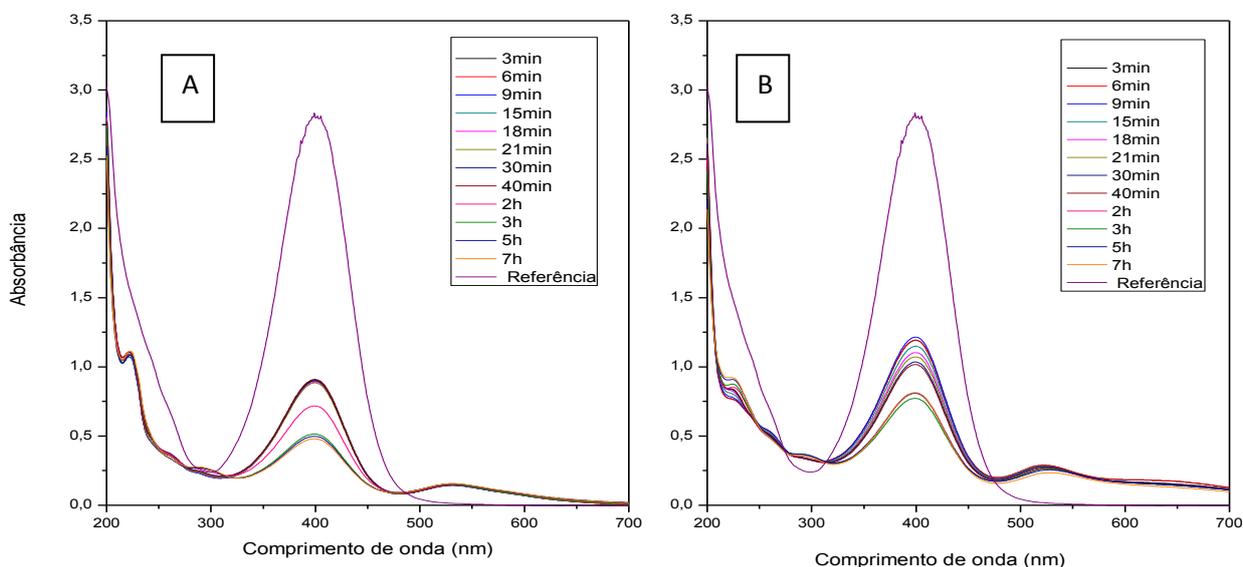


Figura 20 - Espectro da redução do p-nitrofenol catalisada por nanopartículas de ouro reduzidos por (A) PF127 (B) citrato de sódio

Comparando a redução do p-Nitrofenol pelo borohidreto de sódio na ausência de catalisadores, com relação as demais curvas (em que foi utilizadas nanopartículas obtidas pelos dois métodos) verifica-se que a nanopartículas são capazes de catalisar a reação. A evidência para tal afirmação esta na redução gradativa da banda a 400 nm, que inicialmente é mais rápida e depois tem sua velocidade diminuída. A figura 21 mostra o quantitativo presente de p-nitrofenol após 7 horas de monitoramento para os três sistemas em estudo.

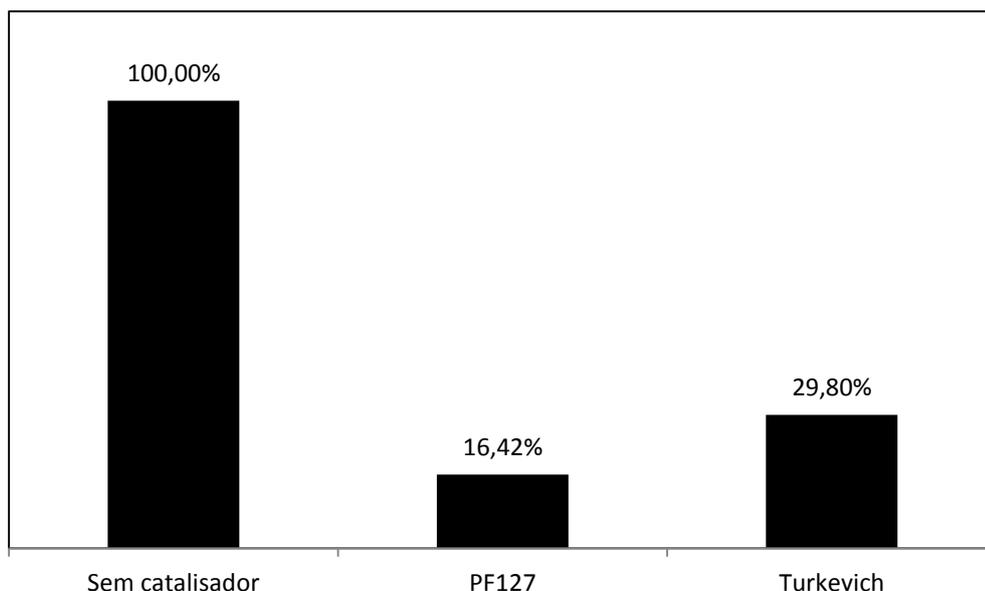


Figura 21 - Gráfico comparativo da presença de p-nitrofenol após 7 horas de reação.

Comparando a área dos picos de 400 nm tomadas dos espectros após 7h e reação na ausência que na presença dos catalisadores observa-se que a reação não ocorre mesmo para tempos elevados [73], observa-se também que as nanopartículas reduzidas por meio do PF127 têm melhor eficiência na redução, pois conseguiram promover uma redução de 83,57%, enquanto as nanopartículas obtidas pelo método Turkevich promovem uma redução de 70,19% no mesmo tempo de observação. A redução do p-nitrofenol auxiliada pelo ouro pode estar associada à melhoria na transferência de elétrons do íon BH_4^- para compostos nitro mediadas pelas nanopartículas [73], e a diferença na eficiência do processo pode estar associado a dimensão das partículas obtidas por meio do PF127 que são menores que as obtidas pelo método Turkevich e, por sua vez, possuem maior áreas superficial por unidade de volume.

5.8. Obtenção de clusters de ouro

A redução das partículas por PF127-Tiol tem seu espectro apresentado na Figura 22, na qual se pode observar que não há ocorrência de banda SPR, banda na região de 530 nm, observa-se também o surgimento de uma absorção intensa na região de 320 nm, comportamento que pode ser atribuído à formação de *nanoclusters* de ouro (AuNCLs) por ação do radical tiol ligado a cadeia polimérica [38] [91].

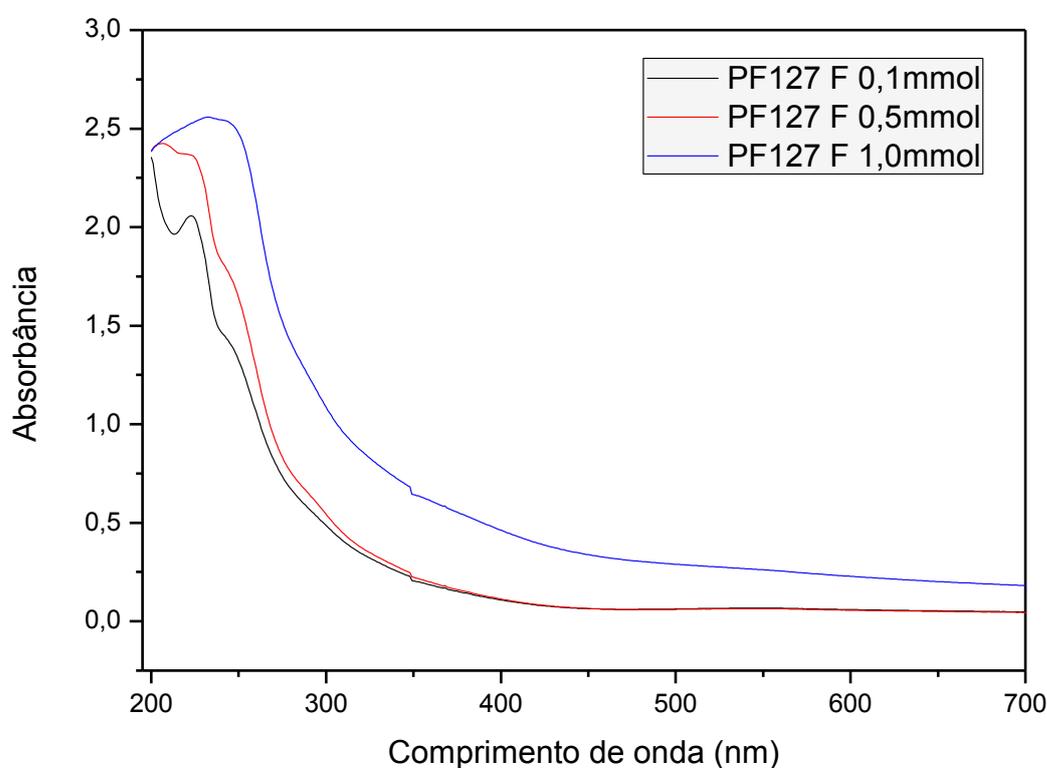


Figura 22 - - Espectroscopia de absorção no UV dos clusters de ouro obtidos pela ação do PF127-Tiol.

A não ocorrência da banda SPR é decorrente da redução do tamanho das partículas a uma dimensão tal que atinge o início dos efeitos quânticos, onde seus elétrons estão em níveis de energias discretos, o que é um forte indício de que as partículas obtidas têm dimensões inferiores a 2 nm. [92], podendo ser mais facilmente identificados por fluorescência [93].

À medida que a concentração de PF127-Tiol aumenta, é possível observar o deslocamento da banda a 320 nm (*red-shift*), evento esse correlacionado com a dimensão dos *clusters*, ou seja, o aumento da concentração do Pluronic F127 funcionalizado dá origem a AuNCLs com dimensões maiores, porém o ponto de início do evento (*onset*) permanece abaixo de 500 nm, o que leva a entender que os efeitos quânticos de confinamento são conservados [92] [94] [38].

É possível correlacionar a posição do ponto *on set* dos espectros obtidos dos *clusters* com a dimensão dos mesmo, utilizando outras técnicas como espectrometria de massa para realização de tal correlação, como observado em alguns trabalhos presentes na literatura [41], [95].

Embora os *clusters* obtidos pela redução/estabilização promovida pelo Pluronic F127-tiol não tenham passado todas as caracterizações necessárias para definir o número de átomos presente em cada *clusters*, a comparação dos espectros obtidos com outros presentes na literatura permite estimar a sua dimensão pela similaridade de comportamento observado, tanto no ponto “*on set*” da absorção quanto no ombro formado em comprimentos de onda menores, de maneira que nesse trabalho foi obtido provavelmente *cluster* que variam entre Au11- Au25.

A explicação para o comportamento distinto entre o PF127 e PF127-Tiol com relação ao efeito de aumento de concentração é a possível competição entre o agente redutor e os estabilizantes do meio [95]. A fração hidrofóbica (PPO) de cada cadeia de PF127 envolve os núcleos de ouro formados, que são protegidos pelo segmento hidrofílico (PEO), o qual por sua vez permite o crescimento limitado por difusão desses núcleos. A presença dos grupos tióis no PF127-Tiol também tem ação estabilizante nas partículas, porém a ação dos tióis sobre os núcleos formados limita mais eficientemente seu crescimento, dando origem a *clusters* com dimensões diferentes devido a essa concorrência cinética influenciada pelo aumento da concentração do Pluronic F127. [41]

O resultado aqui obtido pela redução das nanopartículas por meio do PF127-Tiol difere dos demais encontrados na literatura por não utilizar nenhum agente redutor a exemplo do borohidreto de sódio para a formação das nanopartículas [39], sendo que o próprio contato entre o polímero funcionalizado promove a redução do Au³⁺ em partículas com dimensões menores que as obtidas pelo polímero não funcionalizado, visto que não há ocorrência da banda SPR.

A avaliação da morfologia e da dimensão dos aglomerados de AuNCLs foi realizada por TEM. Pode-se confirmar diferenças dos sistemas em que foi utilizado o

PF127-Tiol e PF127 na obtenção dos AuNCLs conforme. No sistema em que foi utilizado o PF127-Tiol, houve formação de aglomerado de AuNCLs com boa uniformidade, dando origem a um arranjo que podemos considerar bimodal com dimensões médias de $0,5 \text{ nm} \pm 0,012$ e $3,53 \text{ nm} \pm 0,010$ (análise da imagem considerando cerca de 30 medidas) . [96] [97]. Na imagem com menor aumento, observa-se uma maior aglomeração de AuNCLs nas micelas de PF127-Tiol.

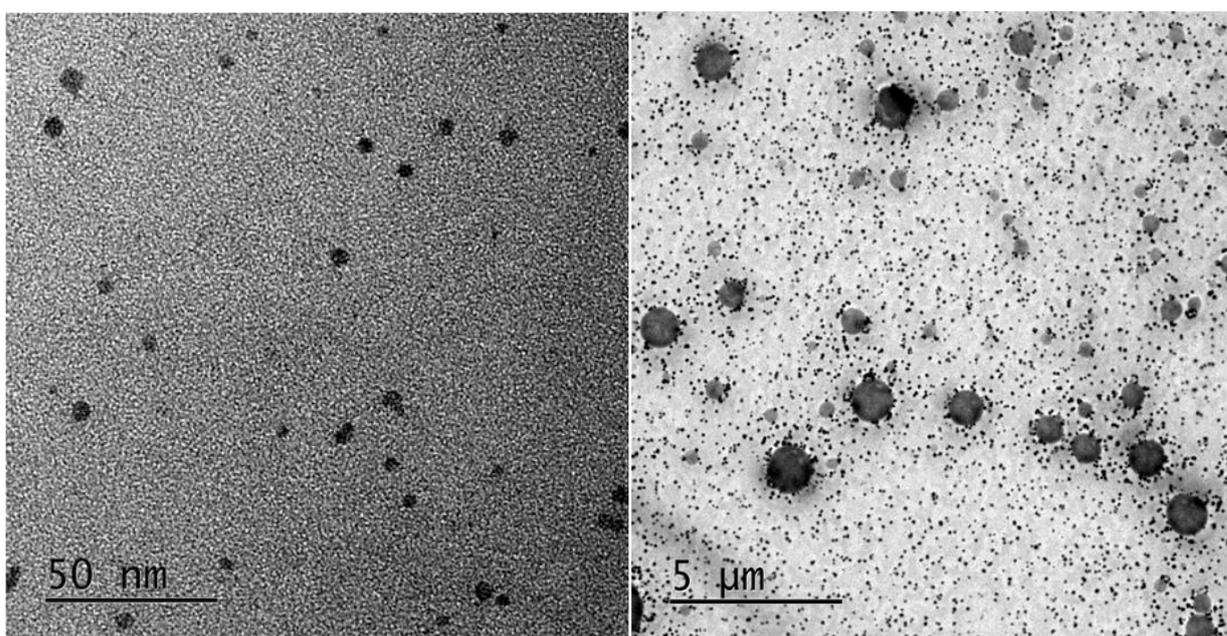


Figura 23 – Imagens de TEM dos AuNCLs formados com 1 mmol L^{-1} de PF127-tiol

O efeito do PF127-Tiol sobre as partículas de ouro obtidas previamente pelo método Turkevich também foi avaliado, sendo as amostras obtidas por esse método submetidas a espectroscopia de UV-Vis, dando origem a espectros (Figura 24) que mostram com o PF127-Tiol age sobre as partículas.

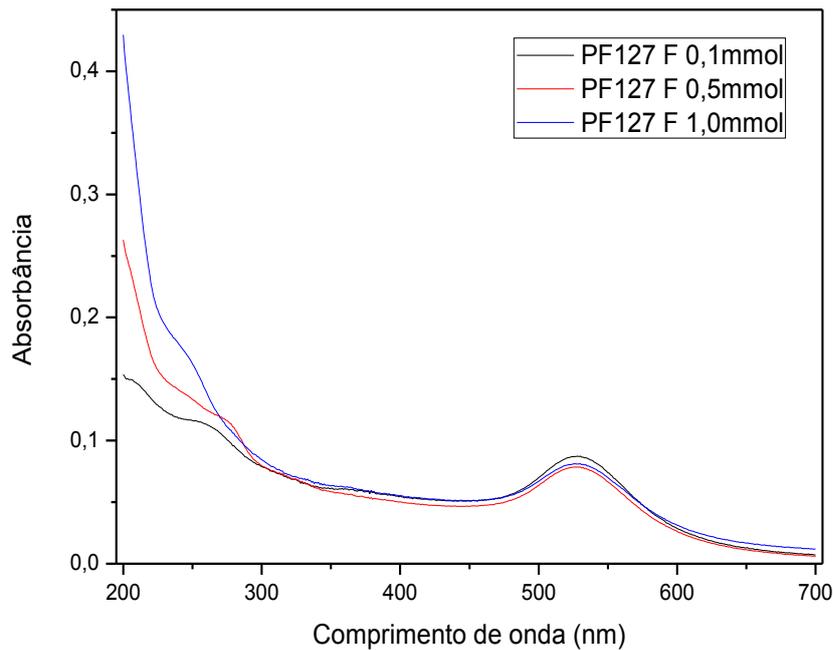


Figura 24 - Espectroscopia de absorção no UV/Vis das AuNPs obtidas por Turkevich com adição posterior de PF127-tiol.

Nas amostras em que foi utilizado o PF127-tiol há formação de uma banda em 320 nm e uma pequena redução da banda em 530 nm para concentrações mais altas do polímero, o que permite sugerir que não só houve formação de AuNCLs a partir das frações não reagidas de Au^{3+} , como também AuNPs podem ter diminuído em tamanho para a formação de AuNCLs pela presença do grupo tiol, o que na literatura é denominado de 'core etching' [95].

As imagens de TEM das amostras que receberam a adição posterior do PF127-Tiol (Figura 25), confirmam as observações feitas com base nos espectros.

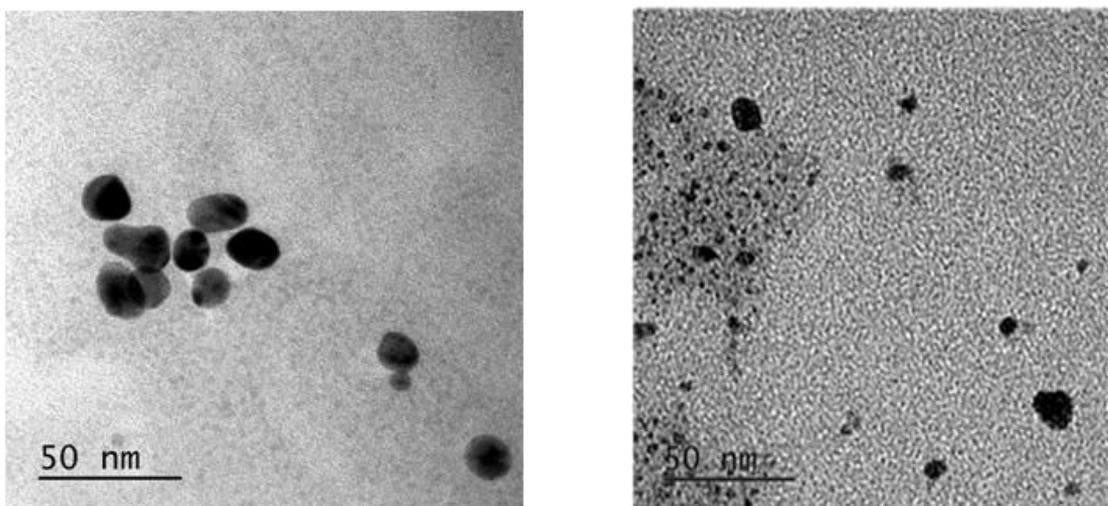


Figura 25 - Imagens por TEM das AUNPs obtidas por (a) redução com citrato de sódio (e) redução por citrato de sódio e posterior acréscimo de PF127-Tiol

Segundo Xu et al. (2010), no caso de PF127-Tiol, as AuNPs previamente reduzidas com borohidreto de sódio apresentam uma distribuição das partículas nas superfícies das micelas. Os autores, porém não fazem atribuições às populações de clusters [80]. Neste trabalho, observou-se (em menores aumentos) que o arranjo das amostras de AuNPs com adição posterior de PF127-Tiol difere significativamente do observado para as amostras com a adição de PF127, sendo que as partículas estão distribuídas mais homogeneamente sobre o porta-amostras no primeiro caso com um menor número dos agregados polimérico formado (dado não mostrado).

A estabilidade dos clusters de ouro também foi monitorada por espectroscopia de UV-Vis como mostrado na Figura 26, não somente para que pudesse ser verificado o comportamento do sistema ao longo do tempo, mas também para comparar a estabilidade das partículas obtidas com o polímero funcionalizado com as do não funcionalizado.

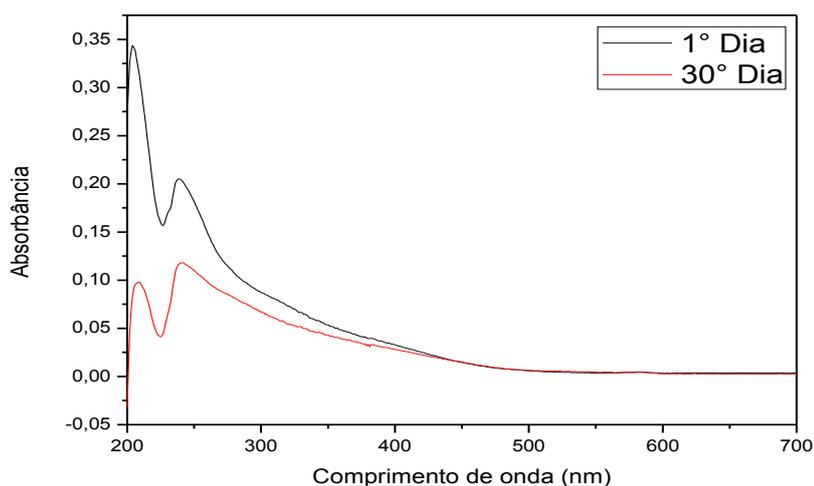


Figura 26 - Estabilidade dos Clusters obtidos pela ação do PF127-Tiol 0,5mmol

Após 30 dias de monitoramento o que se observa (Figura26) é uma redução de intensidade na absorção que ocorre a partir de 500nm, porém o ponto on set da absorção permanece inalterado, o que nos permite afirmar que em comparação com os sistemas em que foi utilizado o Pluronic não funcionalizado os sistemas com Pluronic funcionalizado se mostraram mais estáveis, apresentando menores alterações no espectro ao longo do tempo de observação.

5.9. Incorporação da Baicaleína

Os testes de incorporação da baicaleína foram realizados para os sistemas de PF127-AuNPs e PF127-Tiol com a finalidade de verificar a eficiência dos sistemas para tal finalidade. As concentrações acima da cmc do PF127 foram utilizadas na obtenção de nanopartículas (PF127-AuNPs) e nanoclusters (PF127-Tiol) de ouro, garantindo assim que o ativo permaneceria encapsulado nos núcleos das micelas e/ou na monocamada polimérica na superfície das nanopartículas e nanoclusters de ouro.

Para quantificação do conteúdo encapsulado foi realizada uma curva de calibração com a baicaleína, observando a absorção máxima em 320 nm.

Após a filtragem sob centrifugação em membranas de 100 kDa, o filtrado foi submetido a análise por espectroscopia de absorção no UV-Vis, fornecendo os espectros apresentados na Figura 27.

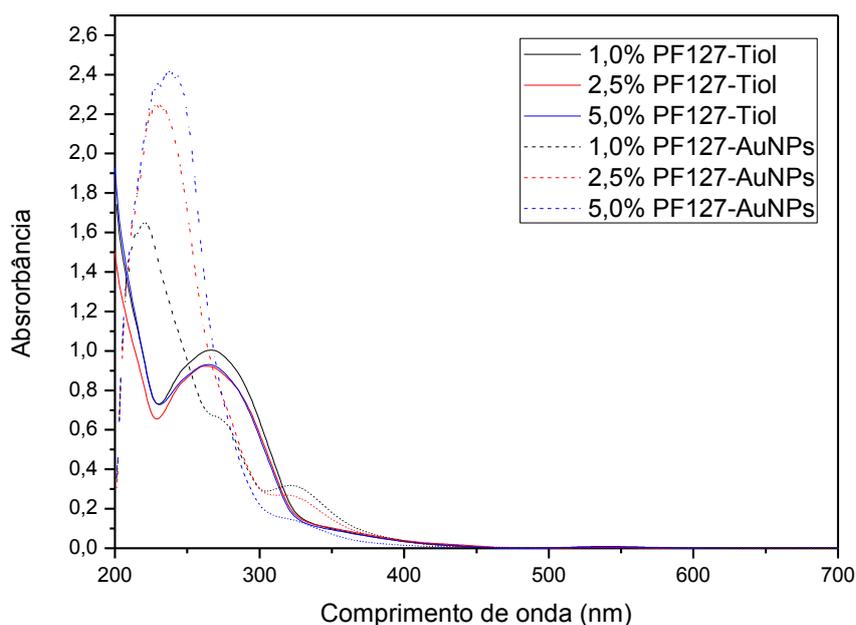


Figura 27 - Espectros de absorção no UV-Vis dos filtrados obtidos a partir do encapsulamento AuNPs-PF127-Tiol e (b) AuNPs-PF127

A tabela 5 mostra os resultados obtidos para os sistemas em que foi utilizado o PF127-Tiol e PF127-AuNPs.

Tabela 5 – Dados da eficiência de encapsulamento da baicaleína nos sistemas em que foi utilizado o PF127 e o PF127-Tiol

Amostras		Absorbância	Concentração da suspensão (mol L ⁻¹)	Concentração do filtrado (mol L ⁻¹)	E.E %*
	PF127 (% em massa)				
PF127- AuNPs	1,0	0,318	3,93x10 ⁻⁴	3,47E-04	94
	2,5	0,265	2,31x10 ⁻⁴	2,31E-04	93
	5,0	0,143	3,47x10 ⁻⁴	3,47E-04	98
PF127- Tiol- AuNPs	1,0	-	3,47x10 ⁻⁴	ND*	-
	2,5	-	2,31x10 ⁻⁴	ND*	-
	5,0	-	3,70x10 ⁻⁴	ND*	-

*ND: Não detectável

Verifica-se na tabela que para as amostras em que foi utilizando os sistema de nanopartículas de ouro reduzidos por Pluronic não funcionalizado (PF127-AuNPs) a eficiência de encapsulamento não varia linearmente com o aumento de concentração, já nas amostras em que foi utilizado o sistema de clusters reduzidos com pluronic funcionalizado (PF127-Tiol-AuNCs) não foi possível detectar a presença da baicaleína no filtrado, o que impossibilitou a quantificação do conteúdo encapsulado, possivelmente pela presença de alguns clusters que passaram pelo sistema de filtragem e deram origem a região de absorção observada a aproximadamente 400nm (onset), podendo essa ter mascarado a absorção que poderia ser observado a 320nm, referente a baicaleína.

Porém, mesmo sem dados exatos os indícios sugerem que os sistemas de PF127-Tiol-AuNCs são mais eficientes na incorporação da baicaleína, o que precisa ser melhor investigado para comprovação.

6. Conclusões

- A funcionalização do polímero foi atingida com sucesso pelo método utilizado resultados comprovados pelo teste de Elmann's e por RMN.
- A obtenção de nanopartículas e *nanoclusters* de ouro sem o uso de agentes redutores convencionais é possível para diversas dimensões e morfologias, variando-se a concentração do Pluronic F127, temperatura e incidência de radiação UV.
- Os resultados obtidos por absorção no UV-Vis e TEM estão em concordância e confirmam o efeito do PF127 e do PF127-Tiol sobre as nanopartículas obtidas pelo método Turkevich.
- A cinética de formação das nanopartículas é influenciada pelo aumento de concentração e pela incidência de radiação UV.
- A estabilidade coloidal dos sistemas é baixa, mas apresenta leve melhora com o aumento da concentração, sendo que os sistemas em que utilizado o polímero funcionalizado é mais estável.
- Os sistemas se mostram promissores na incorporação de bioativos.

7. Bibliografia

1. SCHMID, G. (Ed.). *Nanoparticles: From Theory to Application*. 2^a. ed. [S.l.]: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGa, 2010.
2. SHI, L. et al. "Nanoparticles as delivery vehicles for sunscreen agents". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2012. 122–129.
3. MANCIN, F.; PRINS, L. J.; SCRIMIN, P. "Catalysis on gold-nanoparticle-passivating monolayers". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, January 2013. 61-69.
4. MEDINA-SÁNCHEZ, M. et al. "On-chip magneto-immunoassay for Alzheimer's biomarker electrochemical detection by using quantum dots as labels". *Biosensors and Bioelectronics*, April 2014. 279–284.
5. YANG, Y. et al. "Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery". *Biotechnology Advances*, November 2014. 1301–1316.
6. CONDEA, J.; EDELMANA, E. R.; ARTZIA, N. "Target-responsive DNA/RNA nanomaterials for microRNA sensing and inhibition: The jack-of-all-trades in cancer nanotheranostics?" *Advanced Drug Delivery Reviews*, January 2015. 169-183.
7. ALKILANY, A. M. et al. "Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions." *Advanced Drug Delivery Reviews*, February 2012. 190–199.
8. BURKOWSKA-BUT, A.; SIONKOWSKI, G.; WALCZAK, M. "Influence of stabilizers on the antimicrobial properties of silver nanoparticles". *Journal of Environmental Sciences*, 2014. 542–549.
9. CHATTERJEE, K. et al. "Core/shell nanoparticles in biomedical applications". *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 209, p. 8-39, July 2014.
10. JAYALEKSHMI, A. C.; SHARMA, C. P. "Gold nanoparticle incorporated polymer/bioactive glass composite for controlled drug delivery application." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 126, p. 280-287, February 2015.
11. XU, J.-P. et al. "Gold-Nanoparticle-Stabilized Pluronic Micelles Exhibiting Glutathione Triggered Morphology Evolution Properties". *Langmuir*, v. 26, n. 22, p. 16841–16847, July 2010. ISSN 10.1021/la102929k.
12. KOWALCZUK, A. et al. "Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications." *Progress in Polymer Science*, v. 39, n. 1, p. 43–86, January 2014.
13. SHI, C. et al. "Improved delivery of the natural anticancer drug tetrandrine." *International Journal of Pharmaceutics*, v. 479, n. 1, p. 41-51, February 2015.

14. FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. D. C. "NANOTECNOLOGIA: ASPECTOS GERAIS E POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM CATÁLISE". *Quimica Nova*, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, Agosto 2009.
15. ALMEIDA, R. D.; KASSAB, L. R. P.; ARAÚJO, C. B. D. "EFEITOS DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO NAS PROPRIEDADES ÓPTICAS DE VIDROS DE TELURETO DOPADOS COM ÍONS DE Eu^{3+} ". *Boletim Técnico da FATEC-SP*, v. 22, p. 14-17, Julho 2007.
16. CHOI, J.; WANG, N. S. "Nanoparticles in Biomedical Applications and Their Safety Concerns". In: FAZEL, R. *Biomedical Engineering – From Theory to Applications*. [S.l.]: InTech, 2011. Cap. 13, p. 299-314.
17. CAO, Y. et al. "Ultrasensitive luminol electrochemiluminescence for protein detection based on in situ generated hydrogen peroxide as coreactant with glucose oxidase anchored AuNPs-MWCNTs labeling". *Biosensors and Bioelectronics*, v. 31, p. 305-309, October 2012.
18. YU, D. et al. "A novel electrochemical sensor for determination of dopamine based on AuNPs-SiO₂ core-shell imprinted composite." *Biosensors and Bioelectronics*, v. 38, p. 270-277, June 2012.
19. MIRZAA, A. Z.; SHAMSHADB, H. "Preparation and characterization of doxorubicin functionalized gold nanoparticles". *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 1857-1860, February 2011.
20. FARKAS, J. et al. "Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes". *Aquatic Toxicology*, v. 96, p. 44-52, 2010.
21. DUNCAN, B.; KIM, C.; ROTELLO, V. M. "Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems". *Journal of Controlled Release*, v. 148, p. 122-127, June 2010.
22. GHOSH, P. et al. "Gold nanoparticles in delivery applications". *Advanced Drug Delivery Reviews*, p. 1307-1315, 2008.
23. ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. "State of the art in gold nanoparticle synthesis". *Coordination Chemistry Reviews*, v. 257, p. 638– 665, 2013.
24. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. "a study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold". *Discussions of the Faraday Society*, v. 11, p. 55-75, 1951. ISSN DOI: 10.1039/DF9511100055.
25. NI, Y. et al. "Fabrication of a novel hydrogen peroxide biosensor based on Au-(PEO106PPO70PEO106) hairy nanospheres". *Electrochimica Acta*, v. 69, p. 282-286, March 2012.
26. YAHYAEI, B.; AZIZIAN, S. "Rapid photogeneration of silver nanoparticles in ethanolic solution: A kinetic study". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and*

Biomolecular Spectroscopy, v. 101, p. 343-348, 2013.

27. ALEXANDRIDIS, P.; TSIANOU, M. Block copolymer-directed metal nanoparticle morphogenesis and organization. *European Polymer Journal*, 2011. 569–583.
28. CAO, G. *NANOSTRUCTURES&NNANOMATERIALS: Synthesis, Properties & Applications*. 1. ed. London: Imperial College Press, 2004.
29. FINNEY, E. E.; FINKE, R. G. Nanocluster nucleation and growth kinetic and mechanistic studies: A review emphasizing transition-metal nanoclusters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008. 351–374.
30. BASTÚS, N. G.; COMENGE, J.; PUNTES, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir*, Barcelona, July 2011. 11098–11105.
31. HOSTETLER, M. J. et al. Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size. *Langmuir*, 14, n. 17-30, 1998.
32. FIOLHAIS, C. Dos núcleos aos agregados atômicos : campo médio e movimentos coletivos. *Ciências : revista de cultura científica*, v. 9, p. 22-42, 1991. ISSN 0870-7650.
33. HAKKINEN, H. Atomic and electronic structure of gold clusters: understanding flakes, cages and superatoms from simple concepts. *Chemical Society Reviews*, v. 37, p. 1847–1859, July 2008. ISSN 10.1039/b717686b.
34. LOVE, J. C. et al. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.*, v. 105, p. 1103-1169, 2005.
35. TOK, J. B.-H. (Ed.). *Nano and Microsensors for Chemical and Biological Terrorism Surveillance*. 1. ed. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, v. I, 2008.
36. SMITH, S. C.; HAMILTON, I. P. Hydrogen atom transfer in alkane thiol-gold cluster complexes: A density functional theory study. *Computational and Theoretical Chemistry*, v. 1021, p. 171–176, October 2013.
37. LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J. Phys. Chem. B*, 1999. 8410-8426.
38. HOSTETLER, M. J. et al. Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size. *Langmuir*, v. 14, p. 17-30, 1998.
39. OTT, L. S.; FINKE, R. G. Transition-metal nanocluster stabilization for catalysis: A critical review of ranking methods and putative stabilizers. *Coordination Chemistry*

- Reviews, v. 251, p. 1075–1100, 2007.
40. BALASUBRAMANIAN, S. K. et al. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*, v. 31, p. 9023-9030, 2010.
 41. NEGISHI, Y.; NOBUSADA, K.; TSUKUDA, T. Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)-Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals. *J. AM. CHEM. SOC.*, v. 127, p. 5261-5270, 2005.
 42. SCHAAFF, T. G. et al. Isolation of Smaller Nanocrystal Au Molecules: Robust Quantum Effects in Optical Spectra. *J. Phys. Chem. B*, v. 101, p. 7885-7891, July 1997.
 43. CUNHA, R. B.; CASTRO, M. D. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas : O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biologia, Ciencia e Desenvolvimento*, v. 36, p. 40-46, 2006.
 44. ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T. A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block-copolymer surfactants in aqueous-solutions and at interfaces: thermodynamics, structure,dynamics, and modeling. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, p. 1-46, 1995.
 45. CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, março 2007. 303–317.
 46. LI, Y.-Y. et al. Pluronic F127 nanomicelles engineered with nuclear localized functionality for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, n. 5, p. 2698-2707, July 2013.
 47. ZHANG, L.; EISENBERG, A. Multiple Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Block Copolymers. *Science*, v. 268, p. 1728-1730, 1995.
 48. GAUCHER, G. et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 109, p. 169 – 188, 2005.
 49. ALAKHOV, V. et al. Pluronic block copolymers and Pluronic poly(acrylic acid) microgels in oral delivery of megestrol acetate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, n. 10, p. 1233-1241, February 2010.
 50. TYRRELL, Z. L.; SHEN, Y.; RADOSZ, M. Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers. *Progress in Polymer Science*, v. 35, n. 9, p. 1128-1143, September 2010.
 51. KWON, G. S. Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Water-Soluble Compounds.

- Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, v. 20, n. 5, p. 357-403, 2003.
52. BUTT, A. M. et al. In Vitro Characterization of Pluronic F127 and D--Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate Mixed Micelles as Nanocarriers for Targeted Anticancer-Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*, v. 2012, p. 11 pages, July 2012. ISSN doi:10.1155/2012/916573.
 53. KABANOV, A. V. et al. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions. *Macromolecules*, v. 28, p. 2303-2314, 1995.
 54. TAO, Y. et al. Nano-formulation of paclitaxel by vitamin E succinate functionalized Pluronic micelles for enhanced encapsulation, stability and cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102, n. 1, p. 604–610, February 2013.
 55. AL-NAHAIN, A. et al. Triggered pH/redox responsive release of doxorubicin from prepared highly stable graphene with thiol grafted Pluronic. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 450, n. 1-2, p. 208-217, June 2013.
 56. COELHO, J. F. et al. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, v. 1, p. 164-209, April 2010.
 57. SIMON, T.; BOCA, S. C.; ASTILEAN, S. Pluronic-Nanogold hybrids: Synthesis and tagging with photosensitizing molecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 97, p. 77-83, April 2012.
 58. CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Buenos Aires, v. 66, n. 1, p. 303-317, Março 2007.
 59. ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, p. 36-48, October 2012.
 60. CHANDAROY, P.; SEN, A.; HUI, S. W. Temperature-controlled content release from liposomes encapsulating Pluronic F127. *Journal of Controlled Release*, Buffalo, v. 76, p. 27-37, March 2001.
 61. SCHAFFAZICK, S. R. et al. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS. *Quimica Nova*, Porto Alegre, v. 26, n. 5, p. 726-737, Fevereiro 2003.
 62. LIN, Y.-L. et al. Baicalein, isolated from *Scutellaria baicalensis*, protects against endothelin-1-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via inhibition of TRPC1 channel expression. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 138, n. 1, p. 373-381, september 2011.

63. CHANDRASHEKAR, N. et al. Baicalein inhibits pulmonary carcinogenesis-associated inflammation and interferes with COX-2, MMP-2 and MMP-9 expressions in-vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 261, n. 1, p. 10-21, Maio 2012.
64. CHAO, J.-I.; SU, W.-C.; LIU, H.-F. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT. *Mol. Cancer Ther.*, v. 6, n. 11, p. 3039-3048, November 2007.
65. PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, Hradec Králové, v. 82, p. 513-523, January 2011.
66. SITHISARN, P. et al. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. *Antiviral Research*, v. 97, p. 41-48, October 2012.
67. CHEN, L. et al. Synergistic activity of baicalein with ribavirin against influenza A (H1N1) virus infections in cell culture and in mice. *Antiviral Research*, v. 91, p. 314-320, July 2011.
68. ZHANG, Y. et al. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 53, p. 325–333, 2013.
69. LIU, X. Y. et al. Catalysis by gold: New insights into the support effect. *Nano Today*, ago. 2013. 403-416.
70. HUTCHINGS, G. J.; BRUST, M.; SCHMIDBAUR, H. Gold—an introductory perspective. *Chemical Society Reviews*, December 2008. 1759–1765.
71. MAJOUGA, A. G. et al. New type of organic/gold nanohybrid material: Preparation, properties and application in catalysis. *Applied Surface Science*, Moscow, January 2015. 73-78.
72. BOURGEAT-LAMI, E.; GUYOT, A. Thiol-ended polyethylene oxide as reactive stabilizer for dispersion polymerization of styrene. *Colloid Polym Science*, v. 275, p. 716-729, 1997.
73. GAO, Z. et al. Glucomannan-mediated facile synthesis of gold nanoparticles for catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Nanoscale Research Letters*, v. 404, p. 1-8, 2014.
74. ELLMAN, G. L. Tissue Sufhydryl Groups. *Biochemistry and Biophysics*, 82, 1958.
75. FULMER, G. R. et al. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the

Organometallic Chemist. *Organometallics*, v. 29, p. 2176–2179, February 2010.

76. HANHONG GROUP. Hanhong. Disponível em: <http://www.hanhonggroup.com/nmr/nmr_en/RB01070015.html>. Acesso em: 5 February 2015.
77. KHLEBTSOV, N. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 6620–6625, September 2008.
78. SANTOS, H. S. et al. Selective determination of tobramycin in the presence of streptomycin through the visible light effect on surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *Microchemical Journal*, May 2014. 206–215.
79. ALEXANDRIDIS, P. Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers. *Chem. Eng. Technol.*, v. 34, n. 1, p. 15-28, 2011.
80. XU, J.-P. et al. Gold-Nanoparticle-Stabilized Pluronic Micelles Exhibiting Glutathione Triggered Morphology Evolution Properties. *Langmuir* article, 10 Outubro 2010. 16841–16847.
81. SAKAI, T. et al. Block copolymer-mediated synthesis of gold nanoparticles in aqueous solutions: Segment effect on gold ion reduction, stabilization, and particle morphology. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2013. 124–131.
82. SU, K.-H. et al. Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *NANO LETTERS*, v. 3, n. 8, p. 1087-1090, June 2003.
83. CAO, J.; SUN, T.; GRATTAN, K. T. V. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors and Actuators B*, v. 195, p. 332-351, January 2014.
84. SHOU, Q.-H. et al. Facile Synthesis of Gold-nanoparticles-decorated Polymer Assemblies and Core–Shell Gold Nanoparticles Using Pluronic Block Copolymers. *The Chinese Journal of Process Engineering*, v. 11, n. 4, p. 711-715, August 2011.
85. SCHAEFFER, N. et al. Fluorescent or not? Size-dependent fluorescence switching for polymer-stabilized gold clusters in the 1.1–1.7 nm size range. *Chemical communications*, v. 34, p. 3986-3988, August 2008.
86. DHARMATTI, R. et al. Biogenic gold nano-triangles: Cargos for anticancer drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, August 2014. 92-98.
87. YAHYAEI, B.; AZIZIAN, S. Rapid photogeneration of silver nanoparticles in ethanolic solution: A kinetic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013. 343-348.

88. DUAN, Z.; MA, G.; ZHANG, W. Preparation of Copper Nanoparticles and Catalytic Properties for the Reduction of Aromatic Nitro Compounds. *Bull. Korean Chem. Soc.*, v. 33, n. 12, 2012.
89. SETAMDIDEH, D.; KHEZRI, B.; MOLLAPOUR, M. Convenient Reduction of Nitro Compounds to their Corresponding Amines with Promotion of NaBH₄/Ni(OAc)₂·4H₂O system in wet CH₃CN. *ORIENTAL JOURNAL OF CHEMISTRY*, v. 27, n. 3, p. 991-996, 2011. ISSN 0970-020 X.
90. PRADHAN, N.; PAL, A.; PAL, T. Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 196, n. 2, p. 247–257, January 2002.
91. TEMPLETON, A. C.; WUELFING, W. P.; MURRAY, R. W. Monolayer-Protected Cluster. *American Chemical Society*, v. 33, n. 1, p. 27-36, 2000.
92. WANG, Z. et al. Design of Polymeric Stabilizers for Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles in Water. *Langmuir*, v. 23, n. 2, p. 885–895, 2007.
93. CUI, M.; ZHAO, Y.; SONG, Q. Synthesis, optical properties and applications of ultra-small luminescent gold nanoclusters. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 57, p. 73-82, 2014.
94. ZHANG, J.; XU, S.; KUMACHEVA, E. Polymer Microgels: Reactors for Semiconductor, Metal, and Magnetic Nanoparticles. *J. AM. CHEM. SOC.*, v. 126, p. 7908-7914, February 2004.
95. PALLIPURATH, A. et al. Surfactant-free coating of thiols on gold nanoparticles using sonochemistry: A study of competing processes. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 21, p. 1886–1892, March 2014.
96. BRUST, M. et al. Synthesis of Thiol-derivatized Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. *J. CHEM. SOC.*, p. 801-802, December 1998.
97. ZHANG, M. et al. A ratiometric fluorescent probe for sensitive, selective and reversible detection of copper(II) based on riboflavin-stabilized gold nanoclusters. *Talanta*, v. 117, p. 399-404, September 2013.
98. BAJPAI, A. K. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, v. 33, p. 1088–1118, 2008.
99. BAE, K. H. et al. Thermosensitive Pluronic Micelles Stabilized by Shell Cross-Linking with Gold Nanoparticles. *Langmuir*, Daejeon, v. 22, p. 6380-6384, May 2006.