



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Letícia Silva De Bortoli

**Síntese Verde de Nanopartículas de Ouro Livres de Ligantes por Ablação a Laser em  
Meio Aquoso e seu Potencial de Aplicação em Sensores Eletroquímicos**

Florianópolis

2022

Letícia Silva De Bortoli

**Síntese Verde de Nanopartículas de Ouro Livres de Ligantes por Ablação a Laser em  
Meio Aquoso e seu Potencial de Aplicação em Sensores Eletroquímicos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação  
em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de  
mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.  
Orientador: Prof. Márcio Celso Fredel, Dr.-Ing.  
Coorientadora: Profa. Daniela Zambelli Mezalira, Dra.

Florianópolis

2022

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

De Bortoli, Letícia Silva  
Síntese Verde de Nanopartículas de Ouro Livres de  
Ligantes por Ablação a Laser em Meio Aquoso e seu Potencial  
de Aplicação em Sensores Eletroquímicos / Letícia Silva De  
Bortoli ; orientador, Márcio Celso Fredel, coorientadora,  
Daniela Zambelli Mezalira, 2022.  
123 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Engenharia de Materiais, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. Nanotecnologia  
verde. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Ablação a laser. 5.  
Sensores eletroquímicos. I. Fredel, Márcio Celso. II.  
Mezalira, Daniela Zambelli. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Engenharia de Materiais. IV. Título.

Letícia Silva De Bortoli

**Síntese Verde de Nanopartículas de Ouro Livres de Ligantes por Ablação a Laser em Meio Aquoso e seu Potencial de Aplicação em Sensores Eletroquímicos**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. João Batista Rodrigues Neto, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Filipe Samuel Correia Pereira Silva, Dr.  
Instituição Universidade do Minho

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

---

Prof. João Batista Rodrigues Neto, Dr.  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Márcio Celso Fredel, Dr.-Ing.  
Orientador

Florianópolis, 2022.

Aos meus queridos e amados pais, pela oportunidade da vida, dos estudos e formação, além de todo incentivo e amor, fundamentais para tornar essa vivência possível.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, pelo apoio incondicional sem o qual nada disso seria possível. Agradeço pelo reconhecimento, pelo valor dado aos meus estudos e pelo incentivo nas horas mais difíceis.

Agradeço aos meu orientador, Márcio Celso Fredel pela oportunidade, liberdade e confiança depositada para o desenvolvimento dessa pesquisa. À minha coorientadora, Daniela Mezalira, por acreditar no meu potencial, por todo apoio, ensinamentos e por ser um exemplo para mulheres na ciência, me motivando nessa vida acadêmica.

Ao Edson Costa Santos, Moisés Felipe Teixeira e especialmente ao Lucas Bóries Fachin, da Nanogreen, pela oportunidade de parceria, pelo incentivo e confiança na realização dessa pesquisa, e por todo o apoio técnico e aprendizado imensurável durante esse período, tanto do ponto de vista científico quanto empresarial.

Agradeço ao servidor Rogério Campos, pela prestatividade e apoio dado aos estudantes do Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGMAT), bem como ao então coordenador do PPGMAT, Prof. João Batista, por toda atenção, empatia e suporte, essenciais nas etapas finais desse projeto.

Aos professores Dachamir Hotza e Milton Pereira, por disponibilizarem a infraestrutura de seus respectivos laboratórios, Procer/EQA e LMP/EMC, para a realização de parte das atividades experimentais mesmo durante esse crítico período da pandemia.

Aos colegas do LMP, Calil e Fred, pelo auxílio e treinamento para o operar a máquina a laser. E ao Caio Cuneo, pelo interesse em realizar sua pesquisa de iniciação científica em área correlata ao meu trabalho, acompanhando e apoiando algumas etapas.

Aos técnicos do Linden, em especial à Emanuelle, bem como à equipe do LCME, em especial ao Eduardo, pela disponibilidade e apoio na realização de análises de caracterização.

Aos parceiros do departamento de química da UFSC, pelo apoio na realização de análises e trocas de conhecimento: Prof. Daniel Borges, Thuany, Heitor, Prof. Tatiane Maranhão, Prof. Cristiane Jost e em especial ao Caio Vanoni, ao qual sou muito grata pelo incentivo, amizade e auxílio indispensável na etapa de aplicação do material desenvolvido nesse trabalho.

Aos amigos e colegas que tive a oportunidade de conhecer no CERMAT e me apoiaram de alguma forma, mesmo que online durante esse período de pandemia: Roberta, Thamyres, Elvira, Vivian, Rafael Matos, e todos os demais.

Aos meus amigos da vida, em especial a minha melhor amiga e irmã, Luiza, por toda a atenção, incentivo, conversas e distrações, tornando esse período mais saudável.

Ao Bernardo Marucco, por dividir a vida comigo durante esse período turbulento. Por acompanhar de perto com muita paciência, carinho, amor, companheirismo. Por segurar a barra em diversos momentos difíceis nos quais minha mente esteve tão distante. Obrigada pelo apoio diário, por todas as vezes que me ouviu e soube mostrar com muito talento um lado otimista e feliz da vida.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

can you hear the women who came before me  
five hundred thousand voices  
ringing through my neck  
as if this were all a stage built for them  
i can't tell which parts of me are me  
and which parts are them  
can you see them taking over my spirit  
shaking out of my limbs  
to do everything  
they couldn't do  
when they were alive  
(KAUR, 2020)



## RESUMO

A ablação a laser em líquidos (LAL) é um método físico para produção de nanopartículas (NPs) que apresenta uma abordagem ecologicamente amigável, atraindo até mesmo a atenção industrial. Esta técnica permite a produção de NPs sem o uso de reagentes tóxicos e sem geração de resíduos, utilizando apenas um feixe de laser para ablacionar um alvo sólido imerso em um meio líquido. Uma das vantagens da LAL, em comparação com o método químico de síntese, é a possibilidade de produzir NPs sem ligantes, nem resíduos de precursores e subprodutos reacionais ligados à superfície, resultando em NPs de alta pureza. Tais aspectos tornam a LAL um método interessante para a produção de nanopartículas de ouro (AuNPs), as quais desempenham um papel importante na fabricação de sensores eletroquímicos, devido à sua excelente condutividade elétrica e estabilidade química. Em específico, a elevada pureza e área superficial disponível das AuNPs produzidas por LAL, faz com que os átomos na superfície das NPs sejam facilmente acessíveis, levando ao aumento do número de sítios ativos para reações eletroquímicas e catalíticas. Neste trabalho, avaliou-se a viabilidade de produção de AuNPs pela técnica LAL utilizando um laser de fibra comercial nanopulsado. A influência dos parâmetros intrínsecos do laser, como largura de pulso, frequência e potência do laser, na concentração e distribuição de tamanho das AuNPs foi investigada. Em seguida, parâmetros extrínsecos como a velocidade de varredura do laser e o tempo de ablação foram otimizados. As amostras foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis, DLS, e a concentração teórica foi determinada pela diferença de massa do alvo antes e após o processo de ablação. A condição de maior desejabilidade visando alta concentração e baixa distribuição de tamanho de partícula, foi alcançada com o uso de pequena largura de pulso (4 ns), alta frequência (1500 kHz) e alta potência (50 W). Com o aumento da velocidade de varredura do laser, uma maior geração de partículas foi inicialmente observada (de 500 a 1000 mm/s), seguida de um efeito de fragmentação das partículas geradas (de 1000 a 2000 mm/s). Essa fragmentação se tornou ainda mais evidente com o aumento do tempo de ablação, sendo acompanhada por uma redução da produtividade do processo. Micrografias de TEM mostraram nanopartículas esféricas com tamanho médio de  $20 \pm 8$  nm para AuNPs produzidas em água deionizada por 120 segundos e  $15 \pm 5$  nm para AuNPs produzidas em 300 segundos, ambas usando os mesmos parâmetros otimizados de produção. A adição de NaCl (100  $\mu$ M) no meio aquoso da ablação, permitiu a produção de AuNPs menores e com uma distribuição de tamanho mais estreita, alcançando diâmetro de  $10 \pm 2$  nm. Análises de XRD evidenciaram a formação da estrutura cristalina típica do ouro metálico para as amostras produzidas tanto em água deionizada pura, quanto na presença de NaCl. Além disso, a adição de NaCl no meio líquido levou à formação de amostras mais estáveis e reprodutíveis, considerando a variabilidade de diferentes lotes de produção. Dessa forma, estas amostras foram selecionadas para aplicação em um sensor eletroquímico para determinação da dopamina por voltametria cíclica. Um perfil eletrocatalítico e um aumento de 3 e 6 vezes no módulo da corrente de pico de oxidação e redução, respectivamente, foram alcançados com eletrodos modificados com AuNPs produzidas por LAL em comparação com eletrodos de carbono vítreo não modificados. Quando comparadas com AuNPs produzidas por rota química, as AuNPs obtidas por LAL se mostraram mais eficientes em facilitar a transferência eletrônica de reações eletrocatalíticas. O sensor desenvolvido alcançou um limite de detecção de 0,77  $\mu$ M e 1,08  $\mu$ M considerando o sinal de oxidação e redução, respectivamente, sendo promissor para aplicação na determinação da dopamina.

**Palavras-chave:** Nanotecnologia verde. Nanopartículas de ouro. Ablação a laser. Sensores eletroquímicos. Dopamina.

## ABSTRACT

Laser Ablation in Liquids (LAL) is a physical method for producing nanoparticles (NPs) that presents an eco-friendly approach, attracting even industrial attention. This technique allows the production of NPs without using toxic reagents and with no waste generation, using just a laser beam to ablate a solid target inside a liquid medium. One of LAL's advantages, compared to the chemical method, is the possibility of producing NPs without ligands, residual precursors, and reduction reaction products on their surface, resulting in high purity NPs. Such aspects make LAL an interesting method for producing gold nanoparticles (AuNPs), which play an important role in the manufacture of electrochemical sensors due to their excellent electrical conductivity and chemical stability. In particular, the high purity and available surface area of AuNPs produced by LAL make the atoms on the surface easily accessible, leading to an increase in the number of active sites for electrochemical and catalytic reactions. This work evaluated the feasibility of producing AuNPs by the LAL technique using a commercial nanopulsed fiber laser. The influence of intrinsic laser parameters, such as pulse width, frequency, and laser power on the AuNPs concentration and size distribution was investigated. Then, extrinsic parameters such as laser scan speed and ablation time were optimized. The samples were characterized by UV-Vis spectroscopy, DLS, and the theoretical concentration was determined by the target mass difference before and after the ablation process. The highest desirability condition aiming at high concentration and low particle size distribution was achieved with the use of small pulse width (4 ns), high frequency (1500 kHz), and high power (50 W). As the laser scan speed increased, a higher particle generation was initially observed (from 500 to 1000 mm/s), followed by a fragmentation effect of the generated particles (from 1000 to 2000 mm/s). This fragmentation became even more evident with the increase in the ablation time, accompanied by a reduction in the productivity of the process. TEM images showed the spherical morphology of AuNPs with an average size of  $20 \pm 8$  nm for AuNPs produced in deionized water for 120 seconds and  $15 \pm 5$  nm for AuNPs produced for 300 seconds, both using the same optimized production parameters. The addition of NaCl (100  $\mu$ M) in the aqueous medium of the ablation allowed the production of smaller AuNPs, reaching a diameter of  $10 \pm 2$  nm, presenting a narrower size distribution. XRD analyzes evidenced the formation of the typical crystal structure of metallic gold for the samples produced both in pure deionized water and in the presence of NaCl. Furthermore, the addition of NaCl in the liquid medium resulted in more stable and reproducible samples, considering the variability of different batches. Thus, these samples were selected for application in an electrochemical sensor to determine dopamine by cyclic voltammetry. An electrocatalytic profile and a 3- and 6-fold increase in the peak current modulus of oxidation and reduction, respectively, were achieved with electrodes modified with AuNPs produced by LAL compared to unmodified glassy carbon electrodes. Compared to AuNPs produced by chemical route, LAL-AuNPs showed to be more efficient in facilitating the electronic transfer and electrocatalytic reactions. The developed sensor reached a limit of detection of 0.77  $\mu$ M and 1.08  $\mu$ M, considering the oxidation and reduction signal, respectively, being promising for dopamine determination.

**Keywords:** Green Nanotechnology. Gold Nanoparticles. Laser Ablation. Electrochemical sensor. Dopamine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do efeito LSPR em AuNPs mostrando a interação dos elétrons livres da banda de condução com a radiação eletromagnética incidente.....	27
Figura 2 – Representação esquemática do processo de ablação a laser para obtenção de nanopartículas.....	30
Figura 3 – Representação dos efeitos de LAL, LFL e LML durante a interação de um feixe laser com o material alvo em meio líquido .....	33
Figura 4 – Comparativo dos efeitos da ablação em regime de pulso ultracurto e longo.....	35
Figura 5 – Fotografia de dispersões de AuNPs de diferentes tamanhos (diâmetro entre 20 e 60 nm) desenvolvidas pelo método de redução utilizando citrato.....	44
Figura 6 – Representação esquemática de um sensor eletroquímico e leitura para determinação de substâncias.....	47
Figura 7 – Processo de modificação de GCE por <i>drop casting</i> .....	48
Figura 8 – Ilustração esquemática do setup de ablação a laser em meio líquido. ....	55
Figura 9 – Fluxograma das etapas experimentais empregadas para otimização da produção de nanopartículas de ouro neste trabalho. ....	57
Figura 10 – Esquema da preparação dos eletrodos de carbono vítreo modificados com AuNPs. ....	58
Figura 11 – Micrografias de varredura dos alvos de ouro após o processo de LAL usando os modos nominais T2 (2 ns, 3000 kHz), T3 (4 ns, 1500 kHz), T4 (8 ns, 750 kHz), T5 (16 ns, 400 kHz) e T6 (30 ns, 220 kHz) do equipamento .....	66
Figura 12 – Espectro de absorção UV-Vis das dispersões de AuNPs produzidas nos testes preliminares. ....	67
Figura 13 – Correlação entre concentração teórica e número de partículas por mL das amostras obtidas nos testes preliminares. Abaixo, o aspecto visual das dispersões obtidas. ...	68
Figura 14 – Método empregado para medida aproximada da área afetada por um único pulso usando o Software ImageJ, a partir de uma imagem de microscopia eletrônica de varredura. ....	70
Figura 15 – SEM dos alvos de ouro após o processo de LAL na etapa de testes experimentais fatoriais. ....	71
Figura 16 – Espectro de absorção UV-Vis das dispersões de AuNPs produzidas nos testes fatoriais. ....	72

Figura 17 – Correlação entre concentração teórica e número de partículas por mL das amostras obtidas nos testes fatoriais. Abaixo, o aspecto visual das dispersões obtidas.....	73
Figura 18 – Gráfico de Pareto para a influência dos parâmetros largura de pulso (L), frequência (F) e potência (P) na a) concentração ( $R^2 = 0,99992$ ; Adj: 0,99943) e b) no PDI dos coloides produzidos ( $R^2 = 0,99997$ ; Adj: 0,99982).....	74
Figura 19 – Gráfico de Superfície de Resposta do PDI considerando a potência fixa de 50 W. ....	76
Figura 20 – Curvas de distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento (linha preta) e por número (barras azuis) obtidas por DLS na etapa de testes fatoriais (identificação da amostra no canto superior esquerdo). ....	77
Figura 21 – a) Espectro de absorção UV-Vis das dispersões produzidas em diferentes velocidades de varredura do laser e b) Influência da velocidade de varredura na concentração das dispersões obtidas (resultados de produção em triplicata). ....	79
Figura 22 – Curvas de distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento (linha preta) e por número (barras azuis) obtidas por DLS de dispersões produzidas em diferentes velocidades de varredura do laser: a) 500, b) 1000 e c) 2000 mm/s.....	81
Figura 23 – a) Espectro de absorção UV-Vis das dispersões produzidas em diferentes tempos de processo (60, 120 e 300 s) e b) Influência do tempo do processo na concentração das dispersões obtidas (resultados de produção em triplicata). ....	82
Figura 24 – Curvas de distribuição de tamanho de partícula por intensidade (linha preta) e por número (barras azuis) obtidas por DLS de dispersões produzidas em a) 120 e b) 300 s. ....	82
Figura 25 – a) e b) Micrografias obtidas por TEM; c) histograma de distribuição do tamanho; e d) Padrão de difração obtido por SAED das AuNPs produzidas em 120 s. ....	84
Figura 26 – a) e b) Micrografias obtidas por TEM; c) histograma de distribuição do tamanho; e d) padrão de difração obtido por SAED das AuNPs produzidas em 300 s. ....	85
Figura 27 – a) e b) Micrografias obtidas por TEM; c) histograma de distribuição do tamanho; e d) padrão de difração obtido por SAED das AuNPs produzidas em 120 s na solução aquosa de 100 $\mu$ M de NaCl. ....	86
Figura 28 – Difratoograma de raios X das AuNPs produzidas apenas em H <sub>2</sub> O e na solução contendo 100 $\mu$ M de NaCl. ....	87
Figura 29 – Espectros de absorção obtidos para estudo de estabilidade a longo prazo da dispersão de AuNPs produzida em água deionizada por 120 s a) sob incidência de luz à	

temperatura ambiente, b) na ausência de luz à temperatura ambiente e c) na ausência de luz e refrigeradas a aprox. 4 °C.....	88
Figura 30 – Espectros de absorção obtidos para estudo de estabilidade a longo prazo da dispersão de AuNPs produzida em água deionizada por 300 s a) sob incidência de luz à temperatura ambiente, b) na ausência de luz à temperatura ambiente e c) na ausência de luz e refrigeradas a aprox. 4 °C.....	89
Figura 31 – Espectros de absorção obtidos para estudo de estabilidade a longo prazo da dispersão de AuNPs produzida na solução aquosa de 100 µM de NaCl por 120 s a) sob incidência de luz à temperatura ambiente, b) na ausência de luz à temperatura ambiente e c) na ausência de luz e refrigeradas a aprox. 4 °C.....	89
Figura 32 – Potencial zeta em função do pH da dispersão para as AuNPs produzidas em água deionizada e na solução de NaCl 100 µM por 120 s. ....	92
Figura 33 – Gráfico da concentração das AuNPs obtida por AAS (barra cinza claro) versus concentração teórica (barra cinza escuro). n=5. ....	95
Figura 34 – a) Voltamogramas cíclicos para DA 70 µM em solução tampão PBS 0,01 M (pH 7,4) para o GCE, GCE/Nafion, GCE/AuNPs/Nafion, GCE/AuNPs.QMC1/Nafion e GCE/AuNPs.QMC2/Nafion. v = 50 mV/s. ....	97
Figura 35 – a) Voltamogramas cíclicos para DA 70 µM em PBS 0,01 M (pH 3, 4, 5, 6, 7,4 e 8) utilizando o eletrodo GCE/AuNPs/Nafion. v = 50 mV/s. b) correlação entre a variação do pH e os valores de E <sub>p</sub> e i <sub>p</sub> anódico e catódico (n = 3).....	99
Figura 36 – a) Voltamogramas cíclicos para DA 70 µM em PBS 0,01 M (pH 7,4) utilizando o eletrodo GCE/AuNPs/Nafion em diferentes velocidades de varredura.....	100
Figura 37 – Correlação entre a) log i <sub>p</sub> e log v e b) E <sub>p</sub> vs. log v, obtidas a partir do estudo de variação da velocidade de varredura. ....	101
Figura 38 – Mecanismo de oxidação da dopamina. ....	102
Figura 39 – Voltamogramas cíclicos para diferentes concentrações de DA em PBS 0,01 M (pH 7,4) utilizando o eletrodo GCE/AuNPs/Nafion. v = 100 mV/s. a) branco; b) 2,8; c) 4,2; d) 5,6; e) 7; f) 8,4; g) 9,8; h) 11,2; i) 12,6; j) 14; k) 20,9; l) 27,9; m) 34,8; n) 48,7; o) 69,3 µM. ....	103
Figura 40 – Curvas de calibração externa para DA (n=3) a) sinal anódico e b) sinal catódico .....	104
Figura 41 – <i>Half-Normal plot</i> da variável resposta concentração teórica. ....	120
Figura 42 - <i>Half-Normal plot</i> da variável resposta PdI. ....	121

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Descrição dos 12 princípios da química verde .....	21
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produtividade (mg/h) do processo de LAL, em diferentes parâmetros experimentais, para produção de AuNPs reportadas na literatura.....	39
Tabela 2 – Eletrodos quimicamente modificados com AuNPs reportados na literatura para determinação da DA.....	51
Tabela 3 – Codificação dos modos definidos pelo fabricante do equipamento e seus respectivos parâmetros (em cinza, os modos testados nesse estudo).....	56
Tabela 4 – Valores da área do alvo afetada pelo laser e diâmetro equivalente, obtidos por meio do Software ImageJ.....	70
Tabela 5 – Parâmetros testados na etapa de planejamento fatorial.....	71
Tabela 6 – Desejabilidade individual da concentração e PdI e desejabilidade global calculadas para cada conjunto de parâmetros testados (em verde, a maior desejabilidade global obtida).	75
Tabela 7 – Valores de $\zeta$ após produção e índice de partículas primárias (PPI) após a produção e após 3 meses das amostras armazenadas na ausência de luz e refrigeradas a aprox. 4 °C....	91
Tabela 8 – Reprodutibilidade do processo considerando resultados de análises de UV-Vis, DLS e concentração teórica de diferentes lotes de produção das AuNPs nos parâmetros otimizados (Au.120 s, Au.300 s e Au.120 s NaCl 100 $\mu$ M).....	93
Tabela 9 – ANOVA para Concentração teórica identificando (em vermelho) as variáveis que foram significativas no experimento ( $p < 0,05$ ) após redução do coeficiente de regressão L ( $R^2 = ,99992$ ; Adj: ,99943).....	120
Tabela 10 – ANOVA para PdI identificando (em vermelho) as variáveis que foram significativas no experimento ( $p < 0,05$ ) após redução do coeficiente de regressão F:P ( $R^2 = ,99997$ ; Adj: ,99982).....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês, <i>atomic absorption spectrometry</i> )
AuNPs	Nanopartículas de ouro
CAGR	Taxa de crescimento anual composta (do inglês, <i>compound annual growth rate</i> )
DA	Dopamina
DLS	Espalhamento dinâmico de luz (do inglês, <i>dynamic light scattering</i> )
XRD	Difração de raios X (do inglês, <i>X-ray diffraction</i> )
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês, <i>glassy carbon electrode</i> )
LAG	Ablação a laser em gás (do inglês, <i>laser ablation in gas</i> )
LAL	Ablação a laser em líquido (do inglês, <i>laser ablation in liquids</i> )
LFL	Fragmentação a laser em líquido (do inglês, <i>laser fragmentation in liquids</i> )
LML	Fusão a laser em líquido (do inglês, <i>laser melting in liquids</i> )
LoD	Limite de detecção (do inglês, <i>limit of detection</i> )
LoQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>limit of quantitation</i> )
LSPR	Ressonância localizada de <i>plasmons</i> de superfície (do inglês, <i>localized surface plasmon resonance</i> )
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, <i>transmission electron microscopy</i> )
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês, <i>scanning electron microscopy</i> )
NPs	Nanopartículas
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>phosphate buffer saline</i> )
PdI	Índice de polidispersividade (do inglês, <i>polydispersity Index</i> )
PEG	Polietilenoglicol
PPI	Índice de partículas primárias (do inglês, <i>primary particle index</i> )
PVP	Polivinilpirrolidona
SAED	Difração de elétrons de área selecionada, (do inglês, <i>selected area electron diffraction</i> )
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPR	Ressonância de <i>plasmons</i> de superfície (do inglês, <i>surface plasmon resonance</i> )
THF	Tetraidrofurano
UV-Vis	Ultravioleta-visível



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\lambda$	Comprimento de onda
L	Largura de pulso
P	Potência da fonte laser
F	Frequência de repetição de pulso
Nd:YAG	Granada de ítrio alumínio dopado com neodímio
SP	Sobreposição de pulso
V	Velocidade de varredura do laser
$S_s$	<i>Spot size</i>
E	Potencial elétrico
i	Corrente elétrica
$M^2$	Fator de qualidade do feixe laser
N	Densidade de partículas
$\zeta$	Potencial Zeta
v	Velocidade de varredura de potencial
$d_i$	Desejabilidade individual
D	Desejabilidade global
$i_p$	Corrente de pico
$E_p$	Potencial de pico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1	JUSTIFICATIVA .....	24
1.2	OBJETIVOS .....	25
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>26</b>
2.1	NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	26
2.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	28
<b>2.2.1</b>	<b>Processo de ablação a laser para produção de AuNPs.....</b>	<b>29</b>
<i>2.2.1.1</i>	<i>Comprimento de onda do laser.....</i>	<i>32</i>
<i>2.2.1.2</i>	<i>Largura de pulso.....</i>	<i>34</i>
<i>2.2.1.3</i>	<i>Frequência e velocidade de varredura do laser.....</i>	<i>35</i>
<i>2.2.1.4</i>	<i>Potência, energia de pulso e fluência .....</i>	<i>36</i>
<i>2.2.1.5</i>	<i>Características das AuNPs produzidas por LAL .....</i>	<i>37</i>
<i>2.2.1.6</i>	<i>Meio líquido utilizado para produção de NPs .....</i>	<i>40</i>
2.3	SENSORES CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	43
<b>2.3.1</b>	<b>Sensores eletroquímicos amperométricos.....</b>	<b>46</b>
<i>2.3.1.1</i>	<i>Eletrodos quimicamente modificados com AuNPs .....</i>	<i>48</i>
<i>2.3.1.2</i>	<i>Sensores eletroquímicos para determinação da dopamina.....</i>	<i>50</i>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
3.1	MATERIAIS.....	53
3.2	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO .....	54
<b>3.2.1</b>	<b>Produção das nanopartículas de ouro .....</b>	<b>54</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Modificação dos eletrodos.....</b>	<b>58</b>
3.3	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO .....	59

<b>3.3.1</b>	<b>Análise superficial dos alvos e caracterização das nanopartículas de ouro ...</b>	<b>59</b>
3.3.1.1	<i>Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)</i> .....	59
3.3.1.2	<i>Análise de Espectroscopia UV-Vis</i> .....	59
3.3.1.3	<i>Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (<math>\zeta</math>)</i> .....	60
3.3.1.4	<i>Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)</i> .....	62
3.3.1.5	<i>Análise de Difração de Raios X (XRD)</i> .....	62
3.3.1.6	<i>Análise de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)</i> .....	63
<b>3.3.2</b>	<b>Medidas eletroquímicas</b> .....	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>65</b>
4.1	PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO POR LAL .....	65
4.1.1	<b>Testes preliminares com parâmetros dos modos do equipamento</b> .....	<b>65</b>
4.1.2	<b>Análise da influência dos parâmetros intrínsecos do laser</b> .....	<b>69</b>
4.1.3	<b>Análise da influência de parâmetros extrínsecos do laser</b> .....	<b>79</b>
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS OTIMIZADAS .....	83
4.2.1	<b>Microscopia Eletrônica de Transmissão</b> .....	<b>83</b>
4.2.2	<b>Difração de Raios X</b> .....	<b>87</b>
4.2.3	<b>Estabilidade dos coloides</b> .....	<b>88</b>
4.2.4	<b>Reprodutibilidade e Produtividade do processo</b> .....	<b>93</b>
4.2.4.1	<i>Espectrometria de Absorção atômica</i> .....	95
4.3	APLICAÇÃO DAS AuNPs EM SENSORES ELETROQUÍMICOS .....	96
4.3.1	<b>Comportamento eletroquímico do sensor modificado com AuNPs</b> .....	<b>96</b>
4.3.2	<b>Efeito do pH</b> .....	<b>99</b>
4.3.3	<b>Efeito da velocidade de varredura</b> .....	<b>100</b>
4.3.4	<b>Construção da curva de calibração externa para a dopamina</b> .....	<b>102</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>106</b>
5.1	<b>Sugestões para Trabalhos Futuros</b> .....	<b>107</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE A – Tratamentos dos dados no Software Statistica .....</b>	<b>119</b>
<b>APÊNDICE B – Número de mols de elétrons envolvidos segundo equação de Laviron</b>	<b>122</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de ouro (AuNPs) possuem propriedades físico-químicas que interessam à diversos campos interdisciplinares de aplicação da nanotecnologia como a física, química, biologia, medicina e ciência dos materiais, com foco, principalmente em aplicações biomédicas e em sensores (TROUILLER *et al.*, 2015). As aplicações promissoras dessas nanopartículas (NPs) desencadeiam um interesse crescente em técnicas de produção que resultem em alto rendimento e apresentem segurança ocupacional e ambiental, além de permitirem a obtenção de partículas de alta pureza e elevada área superficial disponível para interações (BUENO-ALEJO *et al.*, 2012).

As técnicas convencionais de síntese de AuNPs são baseadas na redução química, exigindo reagentes químicos como ácidos, redutores, solventes e ligantes que podem induzir toxicidade nos produtos finais e causar problemas para posterior funcionalização e aplicação desses materiais (AMENDOLA; MENEGHETTI, 2007; CONNOR *et al.*, 2005). Nessas condições, as AuNPs obtidas podem apresentar, ligados em sua superfície, restos de reagentes e moléculas de estabilizantes que geralmente precisam ser removidos ou trocados, exigindo técnicas de purificação dispendiosas e que podem gerar ainda mais resíduos. Além disso, em muitos casos, nem sempre os rendimentos das sínteses são altos o suficiente para serem considerados vantajosos (BUENO-ALEJO *et al.*, 2012).

Visando incentivar o emprego de tecnologias mais sustentáveis nos processos de desenvolvimento e produção de produtos químicos, Anastas e Warner (1998) estabeleceram os 12 Princípios da Química Verde, apresentados no Quadro 1. Estes princípios definem estratégias para processos de alto aproveitamento e baixa geração de resíduos, aspectos cruciais para a viabilidade comercial de um produto (ANASTAS; WARNER, 1998).

Quadro 1 – Descrição dos 12 princípios da química verde

<b>P1</b>	<b>Prevenção de resíduos</b>	É melhor prevenir resíduos, que tratá-los depois de serem gerados.
<b>P2</b>	<b>Economia de átomos</b>	As metodologias sintéticas devem ser desenvolvidas de modo a incorporar o maior número possível de átomos dos reagentes no produto final.
<b>P3</b>	<b>Síntese segura</b>	Deve-se desenvolver rotas sintéticas que utilizem e gerem substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente.

<b>P4</b>	<b>Desenho de processos seguros</b>	Projetistas precisam assegurar, tanto quanto possível, que todo o material e energia utilizados ou produzidos não gerem riscos ambientais.
<b>P5</b>	<b>Solventes auxiliares seguros</b>	Substâncias auxiliares como solventes, agentes de purificação e secantes, precisam ser evitadas ao máximo, quando inevitável, devem ser inofensivos ou reutilizados.
<b>P6</b>	<b>Eficiência energética</b>	Produtos, processos e sistemas devem ser planejados para maximizar a eficiência no uso de materiais, energia, espaço e tempo.
<b>P7</b>	<b>Fontes renováveis de matéria prima</b>	O uso de biomassa como matéria prima deve ser priorizado no desenvolvimento de novas tecnologias e processos.
<b>P8</b>	<b>Minimizar ou evitar derivação</b>	A geração de derivados deve ser minimizada e quando possível, evitada, pois essas etapas usam reagentes adicionais que podem gerar resíduos.
<b>P9</b>	<b>Catálise</b>	O uso de catalisadores (tão seletivo quanto possível) deve ser escolhido em substituição aos reagentes estequiométricos.
<b>P10</b>	<b>Produtos degradáveis</b>	Os produtos químicos precisam ser projetados para a biocompatibilidade. Após a utilização, não devem permanecer no ambiente, degradando-se.
<b>P11</b>	<b>Análise em tempo real para prevenção</b>	A possível formação de substâncias tóxicas deve ser detectada antes da sua geração por monitoramento e controle em tempo real do processo.
<b>P12</b>	<b>Química segura para prevenção de acidentes</b>	A escolha das substâncias adicionadas ou formadas em um processo químico deve considerar a minimização do risco de acidentes, vazamentos, incêndios e explosões.

Fonte: (ANASTAS; WARNER, 1998).

Considerando tais aspectos estabelecidos e buscando uma técnica possível de se obter AuNPs de alta pureza de forma mais verde, a síntese por ablação a laser em meio líquido surge como uma alternativa. Essa metodologia consiste basicamente em utilizar um alvo sólido irradiado por um laser de alta energia que seja capaz de remover nanopartículas desse material. A grande vantagem dessa técnica é a não utilização de reagentes químicos ou ligantes, sendo capaz de produzir NPs de alta pureza e sem a geração de resíduos (BESNER *et al.*, 2008; KALUS *et al.*, 2017; SPORTELLI *et al.*, 2018). Além disso, partículas carregadas eletricamente podem ser produzidas apenas em água, conferindo estabilidade à dispersão, sem

a necessidade de estabilizantes e/ou ligantes, por meio da repulsão eletrostática (LETZEL *et al.*, 2019; WALTER *et al.*, 2010), dessa forma, contribuindo com os princípios 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 12 da química verde mencionados no Quadro 1.

A otimização de um processo limpo, rápido e eficiente para a síntese de AuNPs puras e sem ligantes impulsiona o crescimento da sua aplicabilidade, principalmente para o desenvolvimento de sensores e biossensores. Em específico, devido sua excelente condutividade elétrica, estabilidade química, resistência à oxidação, biocompatibilidade e elevada área superficial específica, as AuNPs desempenham um papel importante na fabricação de sensores eletroquímicos, sendo utilizadas como excelentes transdutores e amplificadores de sinais. (PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2012)

De modo geral, em um sensor eletroquímico, uma reação química de oxidação ou redução de uma substância de interesse é convertida em um sinal elétrico diretamente proporcional à concentração da substância. Esses sensores permitem análises em tempo real de diferentes moléculas, como neurotransmissores, anticorpos, antígenos, toxinas, drogas, entre outros (PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2012). A grande vantagem desse método é a sua elevada sensibilidade e especificidade, além de fornecer respostas a um baixo custo e fácil portabilidade quando comparado às técnicas convencionais como Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Eletroquimioluminescência (ECLIA) ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Nesse campo, as AuNPs são excelentes candidatas para a modificação química de eletrodos, conferindo um aprimoramento da transferência de elétrons entre o analito e o sensor, permitindo o desenvolvimento de dispositivos mais sensíveis e seletivos (ZHU *et al.*, 2002). Dessa forma, as AuNPs produzidas por ablação a laser são extremamente promissoras nesse campo de aplicação, pois devido à sua elevada pureza e área superficial disponível, os átomos de metal na superfície das NPs sejam mais facilmente acessíveis quando comparadas às AuNPs produzidas por rotas químicas convencionais e, portanto, espera-se um aumento do número de sítios de superfície ativos para reações eletroquímicas e catalíticas.

Apesar da produção de nanopartículas por ablação a laser ter avançado nas últimas décadas, essa técnica ainda perde espaço para a rota química convencional tanto em escala industrial quanto laboratorial. Um controle fino da distribuição do tamanho e da morfologia das partículas são deficiências da ablação a laser quando comparada com rotas químicas. Dessa forma, esforços devem ser mantidos para a completa maturidade desse processo (AMANS; CAI; BARCIKOWSKI, 2019).



Dentro desse contexto, esta pesquisa visou explorar o potencial da síntese de nanopartículas de ouro utilizando a técnica de ablação a laser em meio líquido aquoso buscando a otimização dos parâmetros do processo para obtenção de partículas com propriedades como diâmetro, distribuição de tamanho e concentração adequadas para aplicação em sensores eletroquímicos.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Estima-se que o mercado de diagnósticos *point of care* irá chegar a US\$ 49,6 bilhões até 2027, a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 8,6% (MARKETS AND MARKETS, 2021). Este setor de diagnósticos, em específico, se destaca como uma das áreas mais promissoras de aplicação das nanopartículas de ouro. Dessa forma, estima-se que a demanda por esses nanomateriais apresentará um crescimento significativo nos próximos anos. Segundo o relatório de pesquisa de mercado "*Gold Nanoparticle Market Research Report by End User - Global Forecast to 2025 - Cumulative Impact of COVID-19*" publicado em junho de 2021 pela 360iResearch, o tamanho do mercado global de nanopartículas de ouro foi estimado em US \$ 3.667,03 milhões em 2019 e deve atingir US \$ 7.455,01 milhões em 2025, a um CAGR de 12,55% (360IRESEARCH, 2021).

Atualmente no Brasil, não existem fornecedores de nanopartículas de ouro em larga escala, o que torna o nosso país dependente de tecnologias importadas. A produção e fornecimento de AuNPs está atualmente concentrada nos Estados Unidos, com 44% do volume movimentado, seguido da região Ásia-Pacífico com 30%, Europa com 21,42%, e 4,58% no resto do mundo (GRAND VIEW RESEARCH, 2019).

Esse fator se torna uma barreira para o avanço tecnológico devido aos elevados custos de importação, tempo necessário para fornecimento e falta de proximidade com os fabricantes para desenvolvimentos conjuntos.

Nesse cenário, a motivação desta pesquisa é estimular a produção nacional de nanopartículas de ouro por meio de um método simples, eficiente e limpo, isto é, livre de contaminantes tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente, e que resulte em partículas de elevada pureza, qualidade e propriedades físico-químicas adequadas para aplicações em diversos dispositivos, com enfoque em sensores eletroquímicos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Essa pesquisa busca explorar o processo de ablação a laser em meio aquoso para produção de nanopartículas de ouro, utilizando um laser de fibra comercial de alta frequência pulsado em nanosegundos. Objetiva-se obter nanopartículas de ouro ultrapuras com propriedade físico-químicas adequadas para aplicações em sensores eletroquímicos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Explorar os parâmetros intrínsecos (largura de pulso, frequência e potência) e extrínsecos (velocidade de varredura do laser e tempo de ablação) da máquina laser para viabilizar a produção de nanopartículas de ouro;
- Avaliar a influência dos parâmetros do laser nas propriedades das nanopartículas obtidas tais como concentração e distribuição de tamanho de partícula.
- Obter coloides estáveis com partículas esféricas de diâmetro  $< 100$  nm, sendo que quanto menores, mais desejável e estreita distribuição de tamanho, preferencialmente, monomodal.
- Avaliar a reprodutibilidade e produtividade do processo de ablação a laser desenvolvido para obtenção de dispersões de nanopartículas de ouro;
- Avaliar o potencial de aplicação das nanopartículas produzidas por ablação a laser em sensor eletroquímico para determinação da dopamina.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, será apresentada uma revisão bibliográfica acerca das tecnologias empregadas neste trabalho, possibilitando ao leitor o conhecimento da temática do estudo. Serão abordados conceitos sobre as propriedades, aplicações e métodos de síntese das nanopartículas de ouro; princípios do processo de ablação a laser para produção de nanopartículas, seus últimos avanços e desafios; e por fim, uma revisão sobre sensores eletroquímicos baseados em eletrodos de carbono vítreo modificados com nanopartículas de ouro e sua aplicação para determinação da dopamina.

### 2.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas são materiais particulados com dimensões em escala nanométrica (1 a 100 nm), que apresentam propriedades diferentes quando comparadas ao seu material de origem em micro ou macro escala. Essas novas propriedades são dependentes de características específicas como o tamanho, distribuição, morfologia, fase e composição das nanopartículas (RESENDE *et al.*, 2017).

Para um dado volume, à medida que o tamanho das partículas diminui, tem-se um aumento da área superficial específica. Isso leva a ligações mais fracas na superfície do material e, portanto, os átomos de superfície se tornam mais reativos e disponíveis para interação com o meio. Nessas condições, novas propriedades como maior reatividade, mudança de cor, estabilidade química e térmica, absorção, refletância, condutividade térmica e elétrica e propriedades catalíticas podem ser observadas (ANU MARY EALIA; SARAVANAKUMAR, 2017; KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

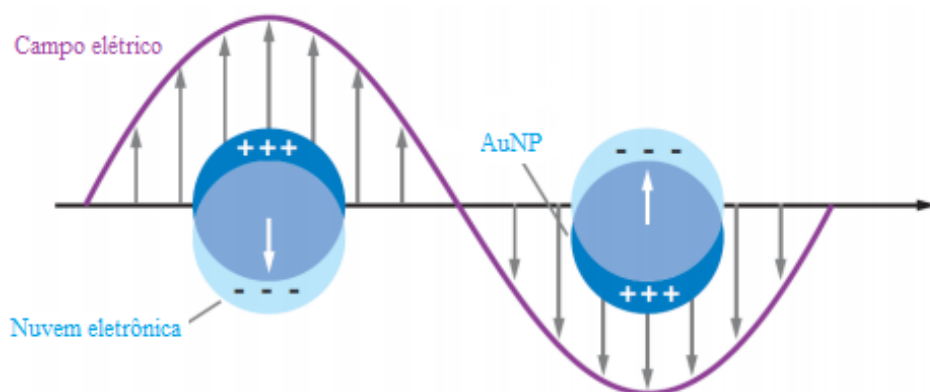
As nanopartículas de ouro apresentam propriedades físicas e químicas, incluindo excelente estabilidade química, resistência à oxidação, alta condutividade elétrica, biocompatibilidade, e processos de funcionalização química da superfície bem estabelecidos, que as tornam atraentes para aplicações em diversos campos. As áreas mais exploradas para aplicação das AuNPs incluem a fotônica, terapia fototérmica para tratamento do câncer, armazenamento de informação, células fotovoltaicas, catalisadores e sistemas de detecção ópticos e eletrônicos. Além disso, propriedades antimicrobianas e antioxidantes expandem ainda mais as possibilidades de aplicações das AuNPs. (NEHL; HAFNER, 2008; RAMALINGAM, 2019; SUN; XIA, 2003; TOMAR; GARG, 2013).

Ainda assim, o principal campo de aplicação das AuNPs é em sensores e biosensores, principalmente para fins diagnósticos e de monitoramento. Isso se deve a capacidade das AuNPs de emitirem sinais devido algumas de suas propriedades que incluem a extinção ou aprimoramento de fluorescência dependente da distância entre partículas, a alta condutividade elétrica e propriedades ópticas dependentes do efeito de ressonância de *plasmons* de superfície (PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014; POHLOT, 2015).

A ressonância localizada de *plasmons* de superfície (LSPR - do inglês, *localized surface plasmon resonance*), é uma propriedade óptica de extrema importância das AuNPs, sendo responsável pelas cores características das suspensões coloidais de Au. Esse efeito, representado esquematicamente na Figura 1, é decorrente de uma oscilação coerente e localizada dos chamados *plasmons* de superfície da partícula quando esta está sob incidência de luz. Nesse caso, os elétrons condutores da partícula são excitados pela radiação eletromagnética da luz, que possui comprimento de onda maior que o tamanho da partícula. (PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

A frequência de oscilação dos elétrons livres nas AuNPs ocorre na região visível do espectro eletromagnético e dá origem à intensa absorção observada entre 520 e 800 nm, dependendo da forma e tamanho das partículas, quando os coloides são submetidos à técnica de espectrofotometria (EUSTIS; EL-SAYED, 2006).

Figura 1 – Representação esquemática do efeito LSPR em AuNPs mostrando a interação dos elétrons livres da banda de condução com a radiação eletromagnética incidente.



Fonte: Adaptado de (WILLETS; VAN DUYN, 2007).

Dispersões contendo AuNPs esféricas apresentam uma alteração na banda de absorção para maiores comprimentos de onda a medida em que o diâmetro das partículas

aumenta, apresentando tipicamente um pico de absorção em 520 nm, para partículas com diâmetro < 30 nm, e na faixa de 680-700 nm, para partículas com cerca de 100 nm. Já partículas de outros formatos, como os *nanorods* de ouro, apresentam duas bandas de ressonância de *plasmon* de superfície, em 520-530 nm, relativa à sua seção transversal e em comprimentos de onda mais longos, na região do infravermelho, relativa à sua seção longitudinal (MODY *et al.*, 2010; PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014).

## 2.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Os processos de síntese de nanopartículas são classificados em duas abordagens “*bottom-up*” (de baixo para cima) e “*top-down*” (de cima para baixo). A estratégia *bottom-up* baseia-se em métodos químicos onde ocorre a interação entre átomos e/ou moléculas individuais para a formação das nanopartículas. Estão incluídas nessa abordagem técnicas como processo sol-gel, deposição química em fase vapor, pirólise, condensação atômica ou molecular e redução química, as quais permitem controlar diversos parâmetros, como a distribuição de tamanho e forma das nanopartículas (RESENDE *et al.*, 2017).

Já a estratégia *top-down*, segue o caminho oposto, partindo de métodos físicos para a desconstrução do material macroestruturado até a obtenção do produto final nanoestruturado, geralmente por meio de técnicas de nanolitografia, pulverização catódica, cauterização química, ablação a laser e moagem de alta energia. Essa abordagem é comumente utilizada para produção em escala, mas ainda são observadas dificuldades em se obter uma homogeneidade nas características das nanopartículas obtidas (RESENDE *et al.*, 2017).

O método de redução química utilizando citrato é o mais empregado para obtenção de AuNPs e foi descrito pela primeira vez por Turkevich, em 1951, (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Essa técnica consiste basicamente em adicionar citrato de sódio em excesso sobre uma solução aquosa de ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) mantida em refluxo a 100 °C. Após cerca de trinta minutos de reação, é obtida uma dispersão coloidal de AuNPs, de coloração roxa. O citrato em excesso serve para, além da redução do precursor de ouro, estabilizar as nanopartículas em dispersão coloidal. Após alguns minutos de estabilização, a dispersão de AuNPs se torna vermelha. Geralmente, esta técnica permite a obtenção de partículas bem estabilizadas, com diâmetro entre 5-50 nm (POHLOT, 2015).

Embora a redução química de íons metálicos seja o método mais difundido para a síntese de nanopartículas metálicas, como as AuNPs, muitos agentes redutores, ácidos e

solventes utilizados nas rotas químicas são tóxicos, de custo elevado e, ainda, seus resíduos podem ser incorporados à nanoestrutura, dificultando a caracterização e limitando suas aplicações devido uma menor disponibilidade da área superficial para interação (ISAEVA; KIRYUKHINA; GORBUNOVA, 2013). Além disso, a utilização desses reagentes tóxicos, leva a geração de resíduos nocivos para a saúde e o meio ambiente, e os processos escolhidos utilizam rotas geralmente complexas e com múltiplos passos. Nesse sentido, entende-se que é necessário o desenvolvimento de procedimentos visando à obtenção de nanopartículas com ampla aplicabilidade tecnológica. A ablação a laser é um método proposto por diversos autores como uma rota verde para obtenção de nanopartículas de alta pureza (SPORTELLI *et al.*, 2018).

### 2.2.1 Processo de ablação a laser para produção de AuNPs

O método de ablação a laser para produção de nanopartículas de ouro vem sendo estudado na última década, mas ainda não é amplamente conhecido e utilizado comercialmente. Atualmente, apenas três empresas comercializam nanopartículas produzidas por essa rota: as americanas i-Colloid (NANO IMRA, 2019a) e EvoqNano (EVOQNANO, 2021) e a alemã Particular (PARTICULAR, [s.d.]). Essa técnica consiste em focalizar um feixe de laser pulsado de alta intensidade na superfície de um alvo sólido, neste caso ouro metálico, possibilitando a remoção de material da superfície e sua extinção no meio, podendo este ser ar, gás, líquido ou vácuo, solidificando na forma de nanopartículas.

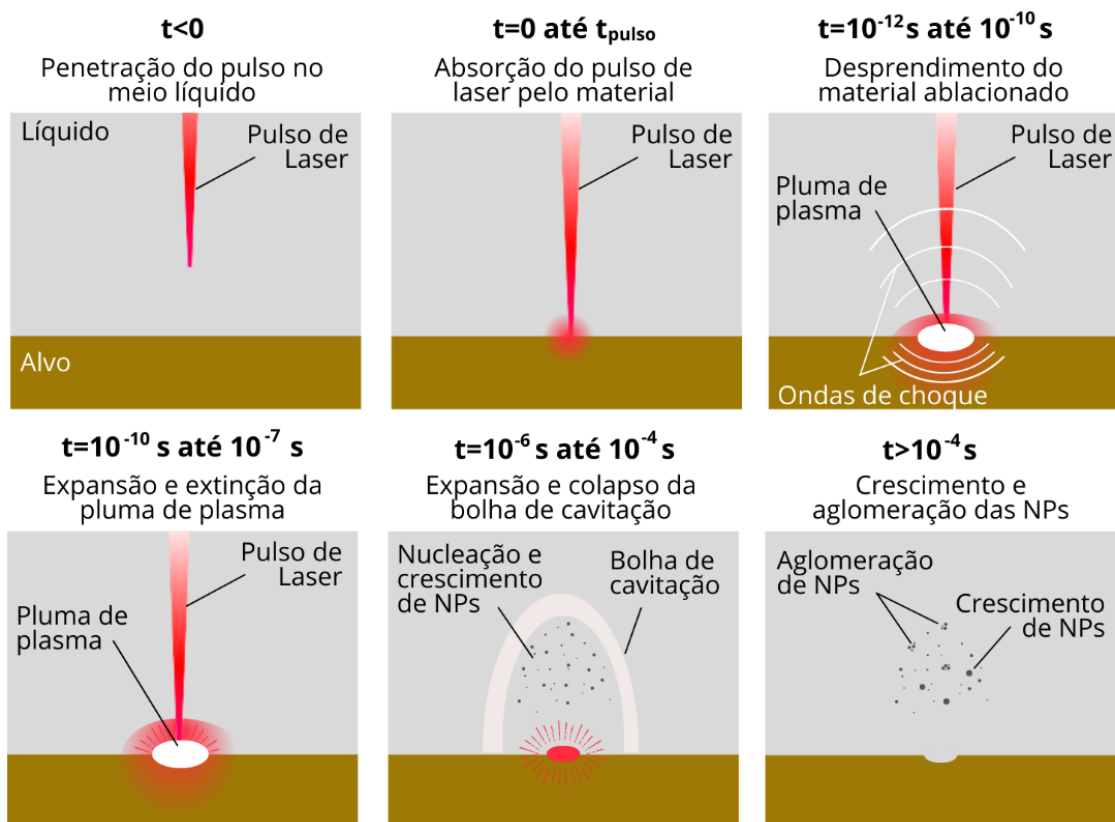
A necessidade de uma câmara de vácuo ou de atmosfera controlada para a ablação a laser em gás (LAG - do inglês, *laser ablation in gas*), e de algum tipo de mecanismo de remoção e filtragem de gás para coletar e armazenar as nanopartículas produzidas, dificulta a utilização dessa técnica. Por outro lado, a ablação a laser em líquido (LAL – do inglês, *laser ablation in liquids*) apresenta uma configuração experimental mais simples e, portanto, é a técnica mais explorada para o desenvolvimento de NPs (KIM *et al.*, 2017). Além disso, a LAL confere a possibilidade de obter NPs bem dispersas em meio líquido e a produção em uma dispersão, e não em pó solto, aumenta a segurança ocupacional e a segurança de manuseio (SINGH *et al.*, 2012).

Durante o processo de LAL, a alta energia do laser é transferida para o material do alvo ablacionado. A radiação eletromagnética é absorvida pelos elétrons livres do alvo metálico e a energia é transferida para a rede vibratória do material, onde um aumento da

temperatura ocorre devido ao processo de relaxamento elétron-fônon. Como resultado, o material é expelido da superfície na forma de uma pluma de plasma localizada. Devido à alta pressão exercida pelo líquido circundante e ao considerável gradiente de temperatura entre a pluma e o líquido, a pluma de plasma é confinada. Durante o decaimento do plasma, a energia é transferida para o líquido circundante, produzindo uma camada de vapor e gerando uma bolha de cavitação. Logo depois, a bolha de cavitação passa por uma evolução periódica de expansão seguida de retração até seu colapso, em questão de microssegundos (SASAKI, 2012; STRATAKIS; SHAFEEV, 2012).

A nucleação das NPs ocorre durante a fase plasmática, quando o material é ejetado, e logo após, já na bolha de cavitação, as NPs passam por um processo de crescimento e são liberadas para a dispersão no meio líquido após o colapso da bolha, resultando em uma dispersão coloidal (DELL'AGLIO *et al.*, 2015; REZA SADROLHOSSEINI *et al.*, 2019). A Figura 2 ilustra o processo de LAL para produção de NPs em decorrência do tempo ( $t$ ).

Figura 2 – Representação esquemática do processo de ablação a laser para obtenção de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de (STAUSS *et al.*, 2016).

Esse sistema atinge temperaturas e pressões elevadas em períodos muito curtos, tornando complexos os mecanismos de interação laser-matéria e aumenta a não linearidade do processo. A pressão dentro do plasma e da bolha de cavitação atinge valores na ordem de dezenas de GPa e as temperaturas atingem cerca de 5000-10000 K (DE GIACOMO *et al.*, 2013; SEMALTIANOS, 2010). Esses valores extremos levam à formação de regiões com aspecto típico de fusão no alvo. Além disso, a alta pressão faz com que uma quantidade considerável de partículas se deposite de volta à superfície do alvo durante o colapso da bolha de cavitação, como observado por De Giacomo *et al.* (2013).

Apesar da complexidade do mecanismo, essa metodologia permite uma síntese limpa que se baseia apenas na utilização do alvo do material desejado, uma máquina a laser e o meio em que a ablação ocorrerá. Assim, espera-se que as nanopartículas produzidas sejam tão puras quanto o alvo e o meio, sem subprodutos ou contaminação de estabilizantes, agentes redutores ou outros produtos químicos que eventualmente são utilizados em rotas químicas de síntese (TSUJI, 2012). Dessa forma, a superfície livre de impurezas deixa os sítios ativos mais disponíveis para qualquer tipo de interação com outras moléculas (SINGH *et al.*, 2012).

Uma produção eficiente de nanopartículas de qualidade pelo método físico de ablação a laser depende do conhecimento e controle adequado de um conjunto de parâmetros. Comprimento de onda ( $\lambda$ ), duração/largura do pulso (L), potência da fonte do laser (P), frequência de repetição de pulso (F) e, conseqüentemente, a energia do pulso e a fluência são exemplos de parâmetros do laser que devem ser otimizados para alcançar uma produtividade satisfatória, levando em conta o controle de propriedades como morfologia, tamanho de partícula e polidispersividade. Esses parâmetros do laser devem ser ajustados conforme as propriedades do material ablacionado (condutividade térmica, densidade e absorção), meio líquido no qual ocorre a síntese (água destilada, álcool, solventes ou outros) e seus aspectos como quantidade de líquido, temperatura, pH, pressão, altura do filme líquido acima do alvo, etc (LEWIS; PEREZB, 2012). Além disso, também são dependentes de especificidades da máquina a laser disponível e da configuração experimental adaptada para tal.

Dessa forma, nas seções seguintes são abordadas algumas das influências dos principais parâmetros do laser no processo de LAL, de modo a permitir uma melhor compreensão da técnica para alcançar o objetivo deste trabalho, em adaptar a máquina a laser disponível para produção de AuNPs, priorizando um curto tempo de processo.



### 2.2.1.1 Comprimento de onda do laser

A radiação laser é uma radiação eletromagnética monocromática, i.e., emite luz com comprimento de onda único e definido, os quais são determinados conforme o meio ativo de cada tipo de laser (STEEN; MAZUMDER, 2010). Alguns dos meios ativos mais comuns são gases como dióxido de carbono e argônio e materiais sólidos, como Nd:YAG (granada de ítrio alumínio dopado com neodímio).

No entanto, recentemente, lasers de fibra têm ganhado mais espaço no mercado. Nesse caso, o ressonador óptico responsável pela reflexão, distribuição, condução e transmissão do feixe de laser é uma fibra óptica dopada com íons de terras raras, principalmente os de érbio (Er), neodímio (Nd), itérbio (Yb), túlio (Tm) ou praseodímio (Pr) (PASCHOTTA, 2019).

Diversas vantagens justificam a preferência pelo uso de lasers de fibra frente ao Nd:YAG. Entre essas vantagens destaca-se maior eficiência energética, maior confiabilidade e praticidade, rápida inicialização, menor necessidade de manutenção, maior vida útil e menor custo (INJEYAN; GOODNO, 2011). No entanto, poucos trabalhos retratam a utilização de lasers de fibra para o processo de LAL, sendo a grande maioria Nd:YAG (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017).

Cada meio ativo gera um feixe de laser com comprimento de onda bem definido, o qual tem uma grande influência na produção das NPs. Essa influência é dependente do espectro de absorção específico do material ablaçionado e das NPs produzidas, de modo que, dependendo do comprimento de onda utilizado, pode haver mais ou menos quantidade de radiação absorvida pelo alvo. (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017).

Apesar de alguns trabalhos reportarem o uso de lasers com comprimento de onda de 355 nm e 532 nm para o processo de produção de AuNPs por LAL, o comprimento de onda fundamental para alcançar máxima produtividade está normalmente compreendido entre 800 e 1064 nm, os quais podem ser gerados por lasers Nd:YAG assim como por lasers de fibra (TORRISI; TORRISI, 2018; ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017).

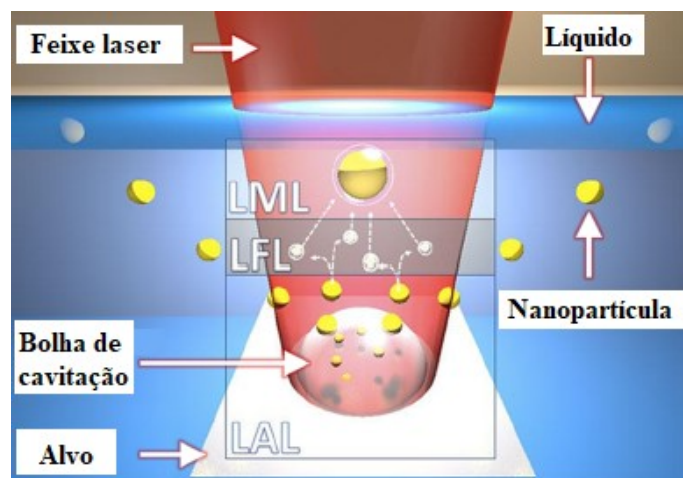
No entanto, durante o processo de LAL, uma vez que as NPs são formadas e dispersas no meio líquido, elas podem absorver parte da radiação incidente, especialmente aquelas que apresentam propriedades de LSPR, como é o caso das AuNPs, que apresentam uma forte absorção em torno de 520 nm. Quando irradiadas por um laser com comprimento de onda nessa região, por exemplo, as AuNPs dispersas absorvem a energia do feixe de laser,

o que pode levar à um efeito de fragmentação e consequente redução no tamanho médio das partículas. Nessa situação tem-se uma menor energia sendo transferida para a superfície do alvo, o que ocasiona uma diminuição da taxa de ablação (PYATENKO *et al.*, 2013; SCHWENKE *et al.*, 2011).

Embora o efeito da pós-irradiação tenha se mostrado eficaz na redução de tamanho de partícula, alguns trabalhos apontam um efeito contrário, onde uma fusão fotoinduzida resulta na formação de agregados de AuNPs (BARRY *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2013). Esses dois efeitos contrários definem outras duas metodologias que também envolvem o laser para produção de nanomateriais: a fragmentação a laser em líquido (LFL - do inglês, *laser fragmentation in liquids*) e a fusão a laser em líquido (LML – do inglês, *laser melting in liquids*). Dessa forma, o processo de LAL costuma ser acompanhado por LFL e/ou LML de forma intencional ou não, principalmente se a camada de líquido acima do alvo for alta o suficiente para gerar um gradiente de fluência ao longo do caminho do feixe, conforme ilustra a Figura 3.

Nesse gradiente, quanto menor a fluência (energia por área) e maior o tempo de interação, as partículas tendem a fundir e o efeito de LML é observado. Por outro lado, se temos uma maior fluência em um tempo curto de interação, o processo de LFL se torna mais pronunciado e um efeito de fragmentação é observado. Esse aspecto é característico de processos realizados em bateladas, ou seja, na ausência de um sistema de fluxo, por exemplo, que permita a remoção das partículas recém geradas do meio onde ocorre a ablação.

Figura 3 – Representação dos efeitos de LAL, LFL e LML durante a interação de um feixe laser com o material alvo em meio líquido



Fonte: Adaptado de (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017)

### 2.2.1.2 *Largura de pulso*

A largura de pulso é um dos principais parâmetros que determinam os aspectos da interação entre o feixe laser e o material alvo. Esse parâmetro é geralmente definido como a largura a meia altura de uma curva que descreve o perfil temporal de um feixe em intensidade de radiação por tempo.

Existem três regimes principais usados: pulso longo (em nanossegundos, ns), pulso curto (em picossegundos, ps) e pulso ultracurto (em femtossegundos, fs). A escolha da largura de pulso é importante para a geração de nanopartículas, pois influencia na criação e propagação da pluma de plasma e da bolha de cavitação.

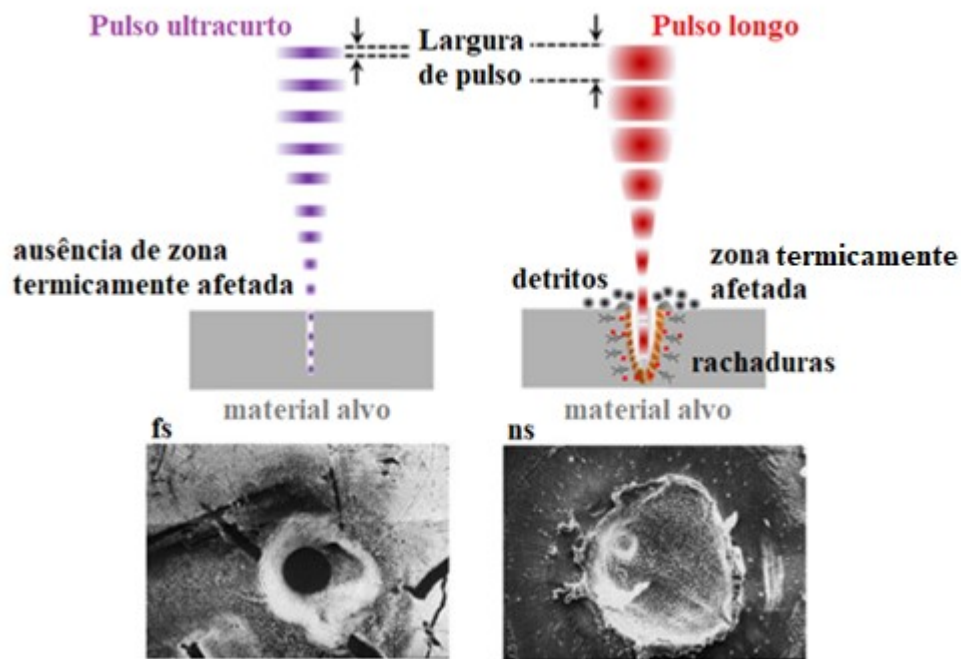
Quando se utiliza pulso longo, o material alvo fica susceptível a um aquecimento considerável, que pode provocar a fusão e vaporização de uma grande área. Nessa situação, uma grande área do alvo sólido é termicamente afetada para formação de nanopartículas (TSUJI, 2012). Além disso, devido à duração mais longa do pulso, e a rápida formação da bolha de cavitação, o feixe laser pode interagir com a pluma de plasma criada e provocar um aquecimento adicional do sistema (TOMKO *et al.*, 2017). Toda essa interação faz com que esse regime mostre uma grande zona afetada pelo calor, detritos de superfície e uma aparência geral deformada da cratera criada. Por essa razão, acredita-se que o processo de ablação associado a pulsos de nanossegundos se trata de um processo de ablação térmica, envolvendo aquecimento, fusão e solidificação (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017).

Por outro lado, quando se trabalha com pulsos curtos e ultracurtos, o efeito do aquecimento do sistema é minimizado, já que o pulso existe por um intervalo de tempo menor (SINGH *et al.*, 2012). Dessa forma, tem-se uma interação mais localizada, onde toda a energia do feixe de laser é transferida para o material antes que haja um aquecimento considerável da superfície. Nessa situação, a energia acumulada provoca a sublimação do material, que passa diretamente da fase sólida para a fase de vapor, gerando as nanopartículas (SEMALTIANOS, 2010). Sendo assim, o processo de ablação em femtosegundo, por exemplo, está associado a uma transição sólido-vapor (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017). Como não ocorre a fusão do material alvo, a área afetada pela interação do feixe laser é menor e mais definida, quando comparada a pulsos mais longos (KABASHIN *et al.*, 2010).

A Figura 4 ilustra o processo de ablação a laser associado ao regime de pulso ultracurto e pulso longo, apresentando comparativamente os efeitos causados na superfície do material alvo associado as diferentes larguras de pulso. Na figura, as imagens de microscopia

eletrônica de varredura (SEM - do inglês, *scanning electron microscopy*) evidenciam a diferença associada à interação de pulsos de 120 fs e 8 ns com alvos de prata, onde nota-se o efeito térmico de fusão associado ao pulso longo.

Figura 4 – Comparativo dos efeitos da ablação em regime de pulso ultracurto e longo.



Fonte: Adaptado de (ALI; LITVINYUK; RYBACHUK, 2021; TSUJI; KAKITA; TSUJI, 2003).

A largura de pulso também interfere no efeito de absorção da radiação do feixe laser pelas NPs formadas. Como descrito anteriormente, o processo de LFL é decorrente da absorção da energia por partículas previamente produzidas que permanecem no caminho do feixe laser, ou seja, partículas formadas por pulsos anteriores, caracterizando esse processo como uma absorção interpulso. No entanto, uma absorção intrapulso também é possível quando se utiliza lasers de nanossegundos. Nesse caso, partículas recém produzidas em um momento inicial de um pulso imediatamente absorvem a energia desse mesmo pulso, uma vez que a ejeção de NPs começa na escala de picossegundos (TSUJI, 2012).

### 2.2.1.3 Frequência e velocidade de varredura do laser

A largura de pulso também é importante para a definição de outros parâmetros como a frequência de operação e a velocidade de varredura do laser. A frequência é dada pelo

número de pulsos por segundo e, portanto, define o espaçamento temporal dos pulsos. Já a velocidade de varredura do feixe é um parâmetro extrínseco da fonte laser, sendo definida pela movimentação galvanométrica e/ou do cabeçote, por exemplo, influenciando na distância entre pulsos.

De modo geral, a bolha de cavitação gerada na interação do feixe com o material tem uma duração de cerca de 300 microssegundos ou mais (DELL'AGLIO *et al.*, 2015). Portanto, um pulso subsequente pode interferir no sistema se este atingir a mesma posição anterior, ainda na presença da bolha de cavitação, caracterizando uma sobreposição de pulsos (SP). A sobreposição de pulsos pode ser calculada conforme a Equação (1), onde V é a velocidade de varredura do laser, F é a frequência e  $S_s$  se refere ao *spot size*.

$$SP (\%) = \frac{[S_s - (V/F)]}{S_s} \cdot 100 \quad (1)$$

Uma situação de sobreposição de pulsos pode ocorrer, por exemplo, quando se utiliza regimes de alta frequência e/ou quando a velocidade de varredura não for grande o suficiente para deslocar o próximo pulso. Quando essa interferência acontece, a energia que chega à superfície é consideravelmente menor, devido a um possível espalhamento da radiação pela bolha de cavitação, uma vez que as nanopartículas contidas nessa bolha podem refleti-la ou absorvê-la, reduzindo a taxa de ablação do material (DITTRICH; BARCIKOWSKI; GÖKCE, 2021). No entanto, a literatura também reporta que a absorção da energia do laser pela pluma de plasma, aumenta a temperatura do plasma e favorece a atomização do material contido na pluma. Consequentemente, uma homogeneização das partículas geradas pode ser observada, reduzindo o tamanho e a polidispersividade das NPs (AMENDOLA; MENEGHETTI, 2009; DOLGAEV *et al.*, 2002; SHAFEEV; FREYSZ; BOZON-VERDURAZ, 2004; SINGH, A *et al.*, 2017).

#### 2.2.1.4 Potência, energia de pulso e fluência

Em lasers pulsados, a energia por pulso é diretamente proporcional à potência média e inversamente proporcional à taxa de repetição do laser, como mostra a Equação (2).

$$Energia\ de\ pulso = \frac{Pot\ência\ m\acute{e}dia}{Frequ\ência} \quad (2)$$

Dessa forma, quando se trabalha com regimes de alta frequ\encia, tem-se uma redu\c\ao da energia de pulso, quando comparado \a utiliza\c\ao de frequ\encias mais baixas. Este aspecto influencia diretamente na flu\encia, dada pela raz\ao da energia do pulso pela \area de irradia\c\ao como mostra a Equa\c\ao (3).

$$Flu\ência = \frac{Energia\ de\ pulso}{\acute{A}rea} = \frac{Energia\ de\ pulso}{\pi \left( \frac{Di\hat{a}metro\ do\ feixe}{2} \right)^2} \quad (3)$$

A flu\encia \e um par\ametro que determina a ocorr\encia ou n\ao da produ\c\ao de NPs, sendo que esta somente ocorre acima de um certo limite. Valores t\ipicos de flu\encia para produ\c\ao de NPs por abla\c\ao a laser est\ao compreendidos aproximadamente entre 0,1 e 100 J/cm<sup>2</sup> variando conforme o material utilizado e aspectos da superf\icie deste (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017). Em espec\ifico, para a abla\c\ao do ouro em \agua, esse limiar est\á em torno de 1 - 2 J/cm<sup>2</sup> (STARINSKIY; SHUKHOV; BULGAKOV, 2017). Quanto maior a flu\encia acima do limite m\inimo, um maior volume de material \e ejetado da superf\icie e, portanto, para um dado comprimento de onda e largura de pulso, \e comum observar um aumento da produ\c\ao de NPs, considerando um sistema que n\ao apresente sobreposi\c\ao de pulsos (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017). No entanto, altos valores de flu\encia tamb\em elevam a temperatura do plasma e da bolha de cavita\c\ao o que pode aumentar o efeito de fragmenta\c\ao (MOURA *et al.*, 2017; TORRISI; TORRISI, 2018), ou ainda resultar no efeito de fus\ao e forma\c\ao de nanopart\iculas maiores (KABASHIN; MEUNIER, 2003) dependendo do tempo de intera\c\ao, largura de pulso e comprimento de onda.

#### 2.2.1.5 Caracter\isticas das AuNPs produzidas por LAL

Nanopart\iculas de ouro de alta pureza j\aa foram sintetizadas usando m\etodo de LAL por diversos autores, obtendo-se NPs esf\ericas e dispersas com di\ametros m\edios de 10 nm (BARCHANSKI *et al.*, 2011), 23,5 nm (KHUMAENI; BUDI; SUTANTO, 2017) e 30 nm

(QAYYUM *et al.*, 2019), por exemplo. AuNPs com diâmetro médio de 8 nm foram obtidas após irradiação da dispersão após a ablação utilizando comprimento de onda de 532 nm, i.e., próximo à absorção máxima da suspensão coloidal de AuNPs (MAFUNÉ, *et al.*, 2002).

Starinskiy *et al.* (2017) estudaram a produção de AuNPs por ablação a laser em água destilada, utilizando um laser Nd:YAG (comprimento de onda de 1064 nm; duração do pulso de 9 ns; e frequência de 5 Hz). A altura de líquido acima da superfície foi de 10 mm. Foram utilizados valores de fluência relativamente baixos, na faixa 3 - 10 J/cm<sup>2</sup>, excedendo ligeiramente o limiar de ablação de ouro em água (~ 1 - 2 J/cm<sup>2</sup>). No entanto, nessas condições, verificou-se a formação de duas populações de nanopartículas: partículas com diâmetro em torno de 10 nm, dominando na dispersão, e um pequeno número de partículas maiores, entre 50-200 nm. Esses resultados indicam que houve a atuação de diferentes mecanismos de formação de NPs. Segundo os autores, as partículas maiores que foram formadas são possivelmente provenientes da emissão de micropartículas da superfície fundida ou agregação de partículas durante o colapso da bolha de cavitação (STARINSKIY; SHUKHOV; BULGAKOV, 2017).

Yu *et al.* (2017) propuseram uma nova abordagem de síntese de AuNPs por LAL utilizando pulsos múltiplos. Nesse método, um laser de fibra pulsado em picosegundos (comprimento de onda de 1064 nm; duração do pulso de 20 ns; e fluência de até 0,8 J/cm<sup>2</sup>) foi utilizado para gerar pacotes de sub-pulsos. Dentro de cada pacote, os pulsos foram aplicados em uma frequência de 20 MHz, e entre os pacotes a frequência foi modulada para 10 kHz. A altura de líquido (água deionizada) acima da superfície foi de 4 mm. Os autores variaram a quantidade de sub-pulsos dentro do pacote e observaram uma forte dependência do número de sub-pulsos no tamanho e na distribuição das nanopartículas. Partículas monodispersas com diâmetro médio de 4 nm foram obtidas utilizando o regime com maior quantidade de sub-pulsos dentro de um pacote, no qual todos os sub-pulsos foram focados no mesmo pixel do alvo, i.e. um regime de elevada sobreposição de pulsos. Dessa forma, os autores propuseram, de maneira inovadora, que a sobreposição de pulsos dentro de pacotes favoreceu a obtenção de coloides de Au menores e com estreita distribuição de tamanho (desvio padrão da distribuição = 5%) (YU; NAN; ZENG, 2017).

Apesar de diversos autores apontarem a LAL como uma técnica viável para a produção de AuNPs, grande parte desses trabalhos não reportam a produtividade do processo, ou a concentração da dispersão produzida. A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos que

reportaram a produtividade ou dados com os quais a mesma pode ser calculada, juntamente com parâmetros empregados no processo.

Tabela 1 – Produtividade (mg/h) do processo de LAL, em diferentes parâmetros experimentais, para produção de AuNPs reportadas na literatura.

Laser	Comprimento de onda (nm)	Largura de pulso (s)	Energia de pulso ( $\mu\text{J}$ )	Potência (W)	Frequência (kHz)	Tempo de ablação (s)	Produtividade (mg/h)	Ref.
Ti:Sapphire	800	$120 \cdot 10^{-15}$	240	-	5	60	15	(MENÉNDEZ-MANJÓN; BARCIKOWSKI, 2011)
CryLaS DSS-1064-Q4	1064	$1 \cdot 10^{-9}$	130	0,15	1,2	Fluxo contínuo	6,3	
Rofin Powerline E20	1064	$5 \cdot 10^{-9}$	330	5	15	Fluxo contínuo	13,4	(DITTRICH <i>et al.</i> , 2019)
Amphos flex 500	1030	$3 \cdot 10^{-12}$	100	500	5000	Fluxo contínuo	4932	
Nd:YAG	1064	$5,5 \cdot 10^{-9}$	112,07	-	0,01	2400	11,35	(BARRY <i>et al.</i> , 2014)
Amphos flex 500	1030	$3 \cdot 10^{-12}$	-	500	10000	Fluxo contínuo	4000	(STREUBEL; BENDT; GÖKCE, 2016)
Nd-YAG laser	1064	$8 \cdot 10^{-9}$	-	-	0,01	360	20	(PALAZZO <i>et al.</i> , 2017)
Nd-YAG laser	1064	$10 \cdot 10^{-9}$	-	-	0,01	160	1,38	(AFFANDI <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Nota-se que a utilização de lasers de alta potência pulsados em picosegundos aumenta significativamente a produtividade do processo (DITTRICH *et al.*, 2019). Isso se deve ao menor efeito térmico e a possibilidade de se trabalhar com elevadas frequências ainda evitando a sobreposição de pulsos. Nessas condições, a energia do laser é melhor aproveitada para remoção de material e formação de NPs, e não para o aquecimento de regiões adjacentes. Já os para lasers nanopulsados, o valor máximo encontrado na literatura com base as pesquisas realizadas neste trabalho, está em torno de 20 mg/h (PALAZZO *et al.*, 2017).

Riabinina *et al.* demonstraram que a produtividade de AuNPs produzidas por LAL usando um laser 1 ps é 20-30 vezes maior que a observada utilizando um laser 150 fs. A



concentração das dispersões obtidas também indicaram que uma duração de pulso de 2 ps é o ponto ótimo para maximizar a produtividade das AuNPs, sendo que abaixo desta, o efeito de fotoionização atenua a energia do feixe (RIABININA; CHAKER; MARGOT, 2012). Esse estudo contribui com o fato de que os pulsos curtos (ps) costumam ser a primeira escolha para a produção de NPs. No entanto, o alto custo desses lasers acaba dificultando sua aplicabilidade, levando ao interesse em otimizar processos de obtenção de NPs por ablação a laser em ns.

É intuitivo pensar que o processo de LAL em batelada possibilita a concentração de partículas com o tempo, obtendo dispersões altamente concentradas. No entanto, devido aos efeitos de absorção da energia do laser pelas partículas geradas, a produtividade tende a cair à medida em que o tempo total do processo aumenta (MENÉNDEZ-MANJÓN; BARCIKOWSKI, 2011). Dessa forma, existe um “limite de saturação” da dispersão que passa a impedir a remoção de material do alvo, e os efeitos de LFL e/ou LML dominam o processo.

Como alternativa, tem-se o emprego de sistemas de fluxo contínuo onde, geralmente, uma câmara de baixo volume e uma bomba peristáltica são projetados para permitir uma produção contínua de NPs. No entanto, o emprego de sistemas de fluxo contínuo leva a obtenção de dispersões consideravelmente mais diluídas, já que o líquido fica menos tempo confinado na câmara onde ocorre a ablação. Desse modo, para se obter concentrações comercialmente desejáveis ( $> 50$  ppm), sem a necessidade de etapas posteriores de concentração, esse sistema necessita da utilização de altas frequências, para que uma grande quantidade de pulsos, em um curto intervalo de tempo, permita a remoção de mais material do alvo (STREUBEL; BARCIKOWSKI; GÖKCE, 2016).

#### *2.2.1.6 Meio líquido utilizado para produção de NPs*

Aspectos relacionados ao meio líquido utilizado durante a síntese e a altura do líquido acima do alvo sólido afetam significativamente o processo. Um filme líquido menos espesso permite que o feixe de laser supere mais facilmente a barreira para atingir à superfície do alvo de forma a melhorar a produtividade das nanopartículas. No caso de filmes mais espessos, a quantidade de líquido e, conseqüentemente, a dispersão de NPs sobre o alvo pode ser suficiente para interagir com o laser, diminuindo a energia do feixe e potencializando efeitos de LFL e LML. No entanto, para geração de NPs por LAL, o filme líquido deve

possuir uma espessura suficiente para confinar efetivamente a pluma de plasma (ZHU; LU; HONG, 2001).

O meio líquido mais frequentemente empregado para produção de NPs metálicas por LAL é água deionizada, por ser um meio de baixo custo, não tóxico, além de não absorver a luz do laser (KRUUSING, 2004). Reações que ocorrem entre o material alvo e o oxigênio dissolvido, e reações oxidantes causadas pela decomposição da água induzida por plasma, podem gerar espécies como grupos hidroxila adsorvidos na superfície das NPs. Estudos indicam que as AuNPs sintetizadas por ablação a laser em água deionizada apresentam íons  $Au^+$  e  $Au^{3+}$  na sua superfície. Nessa situação, AuNPs parcialmente carregadas positivamente interagem diretamente com grupos hidroxilas (desprotonadas) presentes no meio aquoso. Esses grupos são adsorvidos na superfície das partículas, carregando negativamente a superfície e melhorando a estabilidade da dispersão. Analisando a concentração da superfície aniônica adsorvida na partícula sugere-se que aproximadamente 3,3 a 6,6% da superfície dos átomos de ouro são oxidados (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017).

Dessa forma, alguns trabalhos indicam que as nanopartículas produzidas por LAL não necessitam da adição de reagentes para manter a sua estabilidade, devido a essa estabilização eletrostática espontânea. No caso de NPs quimicamente sintetizadas, são utilizados agentes estabilizadores ou surfactantes, de modo que suas moléculas formam uma camada ao redor da nanopartícula promovendo uma estabilização estérica. (NANO IMRA, 2019b; WALTER *et al.*, 2010). No entanto, esse mecanismo pode dificultar a interação das NPs com sistemas/substâncias em aplicações posteriores, já que os estabilizantes volumosos ocupam sítios ativos das NPs, reduzindo sua área superficial livre.

Solventes orgânicos como o metanol, etanol, isopropanol, acetonitrila, etileno glicol e tetraidrofurano (THF) também são estudados para processos de ablação a laser, os quais tendem a resultar em uma maior eficiência de ablação e na produção de partículas menores (NAHARUDDIN *et al.*, 2020; ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017). Do mesmo modo, alguns estudos apontam o uso de estabilizantes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) (MAFUNÉ, *et al.*, 2002), mercaptanos, como alceno tiol (YANG *et al.*, 2007), polivinilpirrolidona (PVP) (TSUJI *et al.*, 2008), dextran e polietilenoglicol (PEG) (BESNER *et al.*, 2009) para alcançar um maior controle na produção de nanopartículas monodispersas e estáveis. No entanto, além do impedimento estérico dos ligantes citado anteriormente, a produção em diferentes solventes pode dificultar a aplicação posterior, onde geralmente é desejável uma dispersão em meio aquoso. Além disso, para preservar o caráter verde da

síntese, é importante viabilizar procedimentos livres de estabilizantes ou priorizar o uso de substâncias naturais.

Em 1997, Prochazka e colaboradores reportaram, pela primeira vez, que a presença de ânions de cloreto no meio líquido aumenta a eficiência do processo de ablação e reduz o tamanho de NPs de prata, quando comparada a síntese apenas em água. Na época, os autores concluíram que um aumento da concentração de cloreto de sódio (NaCl) de 2 a 5 mM melhora o rendimento da ablação, mas nenhuma alteração no espectro de absorção foi observada comparando as duas concentrações, não identificando uma dependência da concentração de NaCl para redução do tamanho de partícula (PROCHÁZKA *et al.*, 1997). Em 2015, Sharif and Dorranean observaram um aumento no diâmetro das nanopartículas de prata produzidas em meio aquoso ao aumentar a concentração de NaCl de 5 para 15 mM. Porém, foi observado também que o total de massa ablacionada diminuiu, indicando que baixas concentrações de NaCl são preferíveis para promover o efeito de redução de tamanho de partícula (SHARIF; DORRANIAN, 2015).

Para produção de nanopartículas de ouro, foi observado que baixas concentrações, na ordem de 10  $\mu\text{M}$  de NaCl, são suficientes para iniciar o processo de redução de tamanho de partícula. Letzel *et al.* reportaram, em 2019, que nanopartículas sintetizadas apenas em água pura apresentaram uma distribuição larga e bimodal. Em seus estudos, as partículas formadas na ausência de NaCl apresentaram um diâmetro médio de 17 nm porém uma quantidade significativa de partículas grandes de 40-70 nm de diâmetro também foram observadas. Na presença de 10  $\mu\text{M}$  de NaCl o diâmetro máximo encontrado foi de 40 nm representando uma significativa redução de tamanho das partículas maiores. Esse efeito se mostrou ainda mais significativo utilizando concentrações de 500  $\mu\text{M}$ , reduzindo o tamanho máximo das partículas para 20 nm (LETZEL *et al.*, 2019).

Ainda foi observado que usando o NaCl como um redutor de tamanho de partícula, ocorria uma redução na polidispersividade das partículas, indicando que os colóides produzidos em soluções  $> 30 \mu\text{M}$  de NaCl são monodispersos (REHBOCK *et al.*, 2013). No entanto, esse mesmo estudo observou um alto erro padrão das amostras produzidas em baixas concentrações de NaCl, indicando baixa reprodutividade. Foi observado também que as amostras sintetizadas na presença de NaCl tiveram uma estabilidade diminuída em comparação com amostras produzidas apenas em água.

No entanto, Sylvestre *et al.* reportaram que a presença de íons na solução onde as NPs são preparadas podem levar a uma melhor estabilização se baixas concentrações forem

utilizadas (<10 mM). Segundo os autores, isso ocorre devido ao efeito de *salting-in*, onde os íons são absorvidos na superfície da partícula e promovem maior força repulsiva pela formação de uma dupla camada elétrica. Essa camada é responsável por estabilizar as nanopartículas em soluções iônicas e a sua espessura diminui à medida em que a concentração de íons aumenta. Portanto, quando essa espessura se torna muito fina, as cargas na superfície das nanopartículas são afastadas, e um efeito de *salting-out* pode ser observado, onde a repulsão eletrostática deixa de ser efetiva ao utilizar altas concentrações de íons (SYLVESTRE *et al.*, 2004).

Essas observações apontam que o NaCl é um potencial aditivo para obtenção de dispersões de AuNPs menores e monodispersas por LAL. Esse sal é um reagente de baixo custo, ampla disponibilidade e atóxico, e a ação do ânion já ocorre dentro da bolha de cavitação, na escala de tempo de microssegundos (LETZEL *et al.*, 2017). No entanto, para atuar também como um estabilizante eletrostático a concentração de NaCl precisa ser relativamente baixa e um acompanhamento da estabilidade com o tempo deve ser conduzido para conhecimento da durabilidade/estabilidade a longo prazo da dispersão.

### 2.3 SENSORES CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO

Em uma definição geral, sensores são dispositivos que utilizam um sistema de detecção, transdução e amplificação de um sinal gerado a partir de uma reação com o analito, i.e. a substância que se deseja detectar. Atualmente, os desenvolvimentos mais recentes de sensores envolvem a utilização de nanomateriais, por sua alta reatividade e área superficial, aspectos que auxiliam na seletividade e sensibilidade de uma plataforma de detecção. A utilização desses dispositivos tem crescido significativamente nos últimos anos, e as principais aplicações envolvem desde a detecção de doenças ou a determinação de substâncias de interesse em fluidos biológicos, alimentos, fármacos até o monitoramento ambiental e prevenção de contaminação e bioterrorismo (CALIL; DA SILVA, 2011).

Na configuração de um sensor, as AuNPs são principalmente utilizadas como elementos de transdução. O transdutor é a parte responsável pela medição de uma mudança física ou química decorrente da presença do analito, transformando essa energia em um produto mensurável, como massa, carga, calor ou luz (CALIL; DA SILVA, 2011).

Os sensores baseados em AuNPs podem ser classificados conforme o mecanismo de transdução utilizado, ou seja, de acordo com a propriedade físico-química das AuNPs

utilizada para a transdução do sinal, podendo ser: óptica (absorbância, luminescência, espalhamento de luz, ressonância plasmônica), eletroquímica (amperométricos, potenciométricos e condutimétricos), magnética, termométrica, entre outras (SAHA *et al.*, 2012). Alguns dos principais tipos de sensores baseados em AuNPs são apresentados a seguir:

- **Colorimétricos:** As propriedades óticas das AuNPs são fortemente dependentes do tamanho de partícula, como ilustra a Figura 5. De modo geral, os biossensores colorimétricos baseados em AuNP exploram a agregação ou desagregação de nanopartículas que causam uma mudança no comprimento de onda absorvido, levando a uma alteração da coloração detectada visivelmente. (PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2012). Nesses sensores, a presença do analito, deve promover ou prevenir a agregação das AuNPs, alterando a estabilidade da dispersão por meio de mecanismos químicos de interação entre as partículas (PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014).

Figura 5 – Fotografia de dispersões de AuNPs de diferentes tamanhos (diâmetro entre 20 e 60 nm) desenvolvidas pelo método de redução utilizando citrato.



Fonte: (NOTARIANNI *et al.*, 2014)

- **Fluorescência:** AuNPs podem servir como excelentes inibidores para ensaios baseados em transferência de energia de ressonância de fluorescência devido à sua alta absorvidade molar e ampla largura de banda de energia. As AuNPs são comumente associadas à inibição da fluorescência quando os fluoróforos, componentes de uma molécula que faz com que esta seja fluorescente, são

conectados à sua superfície. Dessa forma, quanto as moléculas do analito entram em contato, ocorrem mecanismos que desassociam os fluoróforos das AuNPs, reativando a fluorescência. (PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2012).

- **Sensores baseados em espalhamento Raman:** A espectroscopia Raman é uma espectroscopia vibracional baseada no espalhamento inelástico, pelo analito, da radiação incidente. Devido à ausência de interferência da água e levando em consideração o baixo número de modos vibracionais de moléculas simétricas, a espectroscopia Raman é bastante apropriada para a detecção de biomoléculas. A sensibilidade e seletividade da espectroscopia Raman pode ser especialmente aprimorada a partir da amplificação dos sinais vibracionais da molécula que se deseja identificar utilizando sondas de AuNPs. Essa amplificação se dá por meio do efeito LSPR das nanopartículas, quando uma luz é incidida sobre estas, aumentando o espalhamento inelástico da luz gerado pelas moléculas adsorvidas na superfície das AuNPs (PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014).
- **Sensores baseados em LSPR:** O intenso campo eletromagnético induzido pela LSPR faz das nanopartículas transdutores de sinais muito eficientes. Discretas mudanças no índice de refração local podem ser detectadas através de alterações nos perfis dos espectros de extinção e espalhamento da luz, as quais resultam na perturbação desse campo elétrico responsável pelo efeito de ressonância de superfície. Dessa forma, quando um analito interage com a espécie imobilizada na superfície de AuNPs, o índice de refração próximo sofre alteração, permitindo a leitura do sensor.
- **Eletroquímicos:** As AuNPs exibem elevada área superficial específica, excelente condutividade e propriedades catalíticas que as tornam materiais ideais para uso em sensores eletroquímicos. Em aplicações eletroquímicas, as AuNPs têm o importante papel de conduzir elétrons diretamente das biomoléculas para a superfície do eletrodo, com a capacidade de amplificar o sinal detectado. (PEIXOTO DE ALMEIDA *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2012). Os sensores eletroquímicos podem medir sinais a partir da corrente resultante da oxidação ou

redução eletroquímica de uma espécie eletroativa, pela determinação da diferença de potencial, ou ainda, medição de mudanças na condutância, sendo classificados como amperométricos, potenciométricos e condutimétricos, respectivamente (CALIL; DA SILVA, 2011; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003). Os sensores amperométricos são objeto de estudo nessa pesquisa e, portanto, detalhes dessa técnica são abordados a seguir.

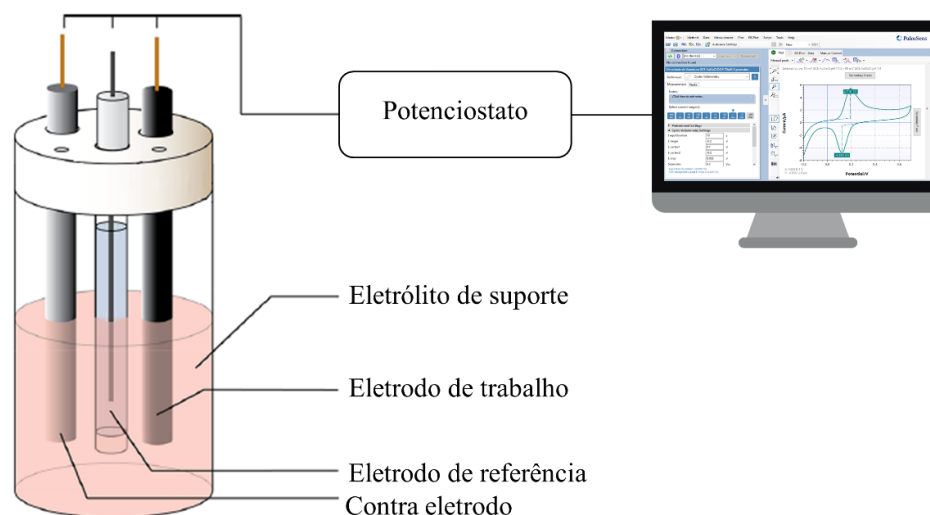
### 2.3.1 Sensores eletroquímicos amperométricos

Em sensores eletroquímicos amperométricos, um potencial (E) é aplicado sobre um eletrodo em contato com uma solução contendo a substância de interesse a ser analisada. O analito de interesse deve ser um composto eletroquimicamente ativo de modo que, na sua presença, uma reação de oxidação/redução ocorre, permitindo a medição de uma corrente elétrica (i) proporcional à concentração do analito que, portanto, pode ser interpretada como um sinal sensorial c

Sendo assim, uma plataforma eletroquímica de detecção, ou sensor eletroquímico, é baseado em um mecanismo de transferência de elétrons do, ou para, o analito (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003). A configuração desse sistema, apresentada na Figura 6, consiste em uma célula eletrolítica contendo uma solução chamada de eletrólito de suporte que contém o analito de interesse e três eletrodos, sendo eles:

- **Eletrodo de trabalho:** eletrodo no qual a reação de interesse ocorre, sendo composto por um substrato condutor, por exemplo, carbono vítreo, também conhecido como GCE (do inglês, *glassy carbon electrode*);
- **Contra eletrodo:** constituído também por um material condutor, por exemplo, platina, e tem a função de manter o balanço de cargas elétricas no sistema, além de fechar o circuito iônico junto ao eletrodo de trabalho e;
- **Eletrodo de referência:** sendo composto por um material condutor capaz de fornecer um potencial elétrico conhecido sem sofrer polarização, por exemplo, o eletrodo de prata/cloreto de prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{KCl}(\text{sat})$ ).

Figura 6 – Representação esquemática de um sensor eletroquímico e leitura para determinação de substâncias.



Fonte: Adaptado de (ELGRISHI *et al.*, 2018).

Os eletrodos são conectados a um potenciostato, que garante a aplicação do potencial e leitura da corrente. Uma reação de oxidação do analito resulta no fluxo de elétrons do eletrodo de trabalho para o contra eletrodo através de um circuito externo; e, inversamente, uma reação de redução resulta no fluxo de elétrons do contra eletrodo para o eletrodo de trabalho. Esse fluxo de elétrons constitui a corrente elétrica medida que é proporcional à concentração do analito (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

O eletrólito de suporte serve para reduzir a resistência ôhmica do meio, aumentando a sua condutividade, além de eliminar o transporte de massa por migração. Em uma definição ampla, eletrólitos são substâncias que, quando adicionadas em água, sofrem dissociação (liberam íons) ou ionização (produzem íons). Como uma transferência de elétrons ocorre entre os eletrodos, o eletrólito irá migrar garantindo o balanceamento de cargas. A concentração de sais dissolvidos determina a condutividade da solução, dessa forma, o eletrólito de suporte costuma ser, pelo menos, cem vezes mais concentrado do que a concentração do analito presente. É comum trabalhar com soluções tampão como eletrólitos de suporte, onde o pH pode ser ajustado a fim de se obter a melhor resposta eletroquímica. (ELGRISHI *et al.*, 2018).

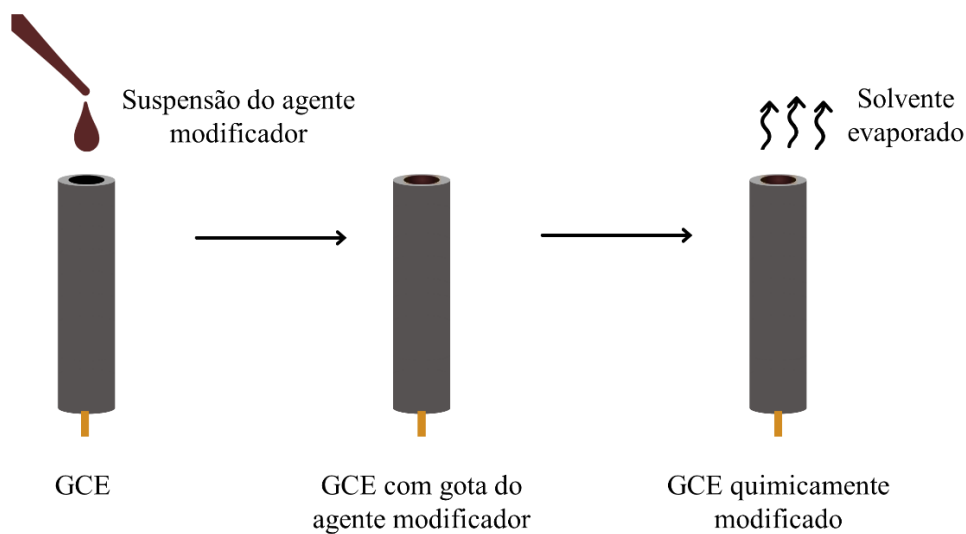


### 2.3.1.1 Eletrodos quimicamente modificados com AuNPs

Os eletrodos de trabalho de carbono vítreo foram produzidos pela primeira vez em 1962 por Yaada e Sato, obtendo-se um material cerâmico e isotrópico sendo composto por 99% de átomos de carbono (YAMADA; SATO, 1962). Dessa forma, devido sua elevada dureza, estabilidade química, condutividade elétrica, impermeabilidade a gases e biocompatibilidade, têm sido bastante explorados para produção de sensores eletroquímicos (VAN DER LINDEN; DIEKER, 1980).

Com o objetivo de melhorar a reatividade e seletividade do sensor, a modificação dos eletrodos de trabalho é bastante explorada. Nesse caso, eletrodos quimicamente modificados podem ser produzidos por meio da deposição de espécies eletroativas na superfície do GCE, formando filmes/camadas geralmente obtidos pela técnica de *drop casting* como ilustra a Figura 7.

Figura 7 – Processo de modificação de GCE por *drop casting*.



Fonte: Adaptado de (VANONI, 2019).

Dentre os materiais modificadores, as AuNPs são amplamente utilizadas na construção de sensores eletroquímicos por possibilitarem uma significativa melhora no sinal de corrente e auxiliarem no processo de catálise de reações redox, reduzindo o potencial necessário para a reação (ZHU *et al.*, 2002). Diversos trabalhos reportam a utilização de AuNPs em sensores eletroquímicos para detecção de diferentes substâncias (DA SILVA; GHICA; BRETT, 2018; DE BARROS *et al.*, 2021; GUERRA-BALCÁZAR *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2019; PAN *et al.*, 2021; RAHMATI *et al.*, 2020; ZAREI; KHODADADI, 2017).

Nesses estudos, um aumento da eficiência eletrocatalítica dos eletrodos modificados é atribuído às AuNPs, que agem como uma antena capaz de afunilar os elétrons entre o eletrodo e o eletrólito de forma eficiente.

Os aspectos relacionados a superfície dessas NPs são de extrema importância para os processos catalíticos, os quais incluem adsorção/dessorção e difusão de substâncias, todos ocorrendo na interface eletrodo/eletrólito. Portanto, AuNPs com elevada área superficial são preferíveis para aplicação em sensores eletroquímicos baseados em reações redox (ZHANG; CHAKER; MA, 2017). Apesar das rotas químicas de síntese serem capazes de fornecer AuNPs com pequenos diâmetros ( $< 20$  nm), se faz necessário o uso de moléculas de estabilizantes/ligantes na superfície, para prevenir a agregação. Essas moléculas, no entanto, ocupam sítios ativos na superfície da partícula, o que reduz a área superficial disponível para reação.

Dessa forma, AuNPs livres de ligantes produzidas por LAL apresentam vantagens para aplicações em sensores eletroquímicos devido a presença de uma superfície com mais sítios ativos disponíveis para reação (ZHANG; CHAKER; MA, 2017). Segundo a literatura, AuNPs produzidas por LAL possuem uma capacidade de cobertura da superfície 5 vezes maior do que seus contratipos produzidos por rota química, o que implica um significativo aumento da eficiência para interações de superfície (PETERSEN; BARCIKOWSKI, 2009).

Okó *et al.* utilizaram nanopartículas de ouro, de platina (Pt) e de liga Au-Pt produzidas por LAL apenas em água deionizada, para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em GCE para determinação da dopamina (DA) e do ácido ascórbico (AA). Nesse estudo, foi observado que a liga Au-Pt apresentou maior corrente de oxidação para o AA, facilitando sua detecção. No entanto, para a determinação da DA, a adição de Pt reduziu a atividade catalítica das AuNPs, indicando que somente os sítios ativos do Au favorecem essa reação. (OKO *et al.*, 2015).

AuNPs produzidas por LAL foram depositadas em GCE por deposição eletroforética para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para detecção simultânea de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  sendo capaz de detectar concentrações de  $0,3 \mu\text{M}$  de cada um dos íons presentes. No geral, os autores concluíram que AuNPs produzidas por LAL apontam como candidatas promissoras para detecção de traços de íons de metais pesados devido sua alta condutividade elétrica, ampla janela de potencial, além de apresentarem um método de produção mais limpo e não tóxico (XU *et al.*, 2014). Apesar dessa notável vantagem, o estudo de NPs metálicas

produzidas por LAL para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos é significativamente menos explorado se comparado com estudos envolvendo NPs sintetizadas quimicamente.

### 2.3.1.2 Sensores eletroquímicos para determinação da dopamina

De modo geral, sensores eletroquímicos vêm sendo extensivamente estudados para detecção e determinação de diversas substâncias de interesse clínico, ambiental e industrial, tais como toxinas, pesticidas, contaminantes, drogas, anticorpos, antígenos, entre outras. (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003). Ainda na área da saúde, a determinação de neurotransmissores é de grande interesse, permitindo o controle do nível de importantes substâncias responsáveis pelo funcionamento adequado do sistema nervoso e, conseqüentemente, de órgãos e funções metabólicas dependentes deste (BANERJEE *et al.*, 2020; MADHURANTAKAM *et al.*, 2020).

Em específico, a dopamina (3,4-dihidroxi-feniletanamina) é um neurotransmissor que desempenha diversas funções importantes no sistema cardiovascular, renal e nervoso central, contribuindo significativamente no controle de emoções como prazer e humor, movimento, percepção e motivação. No entanto, níveis anormais de dopamina no organismo humano podem ocasionar desordens neurológicas tais como hiperatividade, esquizofrenia, depressão, doença de Parkinson e Huntington (FERAPONTOVA, 2017; ZHANG; NEUMEYER; BALDESSARINI, 2007). Dessa forma, a quantificação da dopamina no organismo é essencial para uma melhor compreensão das condições biológicas do paciente, permitindo monitoramento e intervenção farmacológica quando necessária, sendo esta comumente administrada por meio de ampolas injetáveis contendo cloridrato de dopamina (DA SILVA, 2018).

As técnicas geralmente empregadas para monitoramento da dopamina tanto em fluidos biológicos quanto em fármacos para controle de qualidade, envolvem sistemas complexos com alto custo, tempo de análise elevado, tais como espectrofotometria, cromatografia, quimioluminescência e eletroforese capilar. Nesse sentido, a utilização de técnicas eletroanalíticas baseadas em sensores eletroquímicos amperométricos é uma alternativa atraente devido ao seu baixo custo, rápido tempo de análise, baixos limites de detecção, precisão e elevada sensibilidade (DA SILVA, 2018; PANDIKUMAR *et al.*, 2014).

A Tabela 2 apresenta uma breve revisão de trabalhos reportados na literatura focados no desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados com AuNPs, as quais são

geralmente combinadas com outros materiais, para a determinação da dopamina. A tabela apresenta a faixa de determinação e o limite de detecção (LoD – do inglês, *limit of detection*) alcançado em cada trabalho.

Tabela 2 – Eletrodos quimicamente modificados com AuNPs reportados na literatura para determinação da DA.

<b>Eletrodo modificado</b>	<b>Faixa de determinação (μM)</b>	<b>LoD (μM)</b>	<b>Referência</b>
AuNPs/GQD/Nafion/GCE	2 – 50	0,84	(JANG <i>et al.</i> , 2019)
AuNPs/GR/GCE	5 – 1000	1,86	(LI <i>et al.</i> , 2012)
AuNPs/rGO/GCE	6,8 – 41	1,4	(WANG <i>et al.</i> , 2014)
AuNPs/OPEDOT/erGO	4,0 – 100	1,0	(PAN <i>et al.</i> , 2021)
AuNPs-CDs/erGO/GCE	0,01 – 5,0 e 5,0 – 20.0	0,0031	(LI <i>et al.</i> , 2021)
AuNPs/rGO/PDA/GCE	340 – 610	110	(SHI <i>et al.</i> , 2019)
AuNPs/GCE	0,5-20	0,046	(OKO <i>et al.</i> , 2015)

*GQD* – Graphene quantum dots; *GR* – Graphene; *rGO* – Reduced graphene oxide; *OPEDOT* – Overoxidized poly(3,4-ethylenedioxythiophene); *erGO* – electrochemical reduced graphene oxide; *PDA* – Polydopamine; *CDs* – Carbon dots.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

De modo geral, os trabalhos reportados na literatura e apresentados na Tabela 2 utilizam AuNPs produzidas por rota química ou eletroquímica, ambas partindo do uso do ácido cloroáurico como precursor. Jang *et al.* (2019), Li *et al.* (2012) e Shi *et al.* (2019) utilizaram a clássica rota de redução por citrato para obtenção das AuNPs. Pan *et al.* (2021), por sua vez, utilizou uma molécula orgânica (3,4-etileno-dioxitiofeno) como redutor/estabilizante, enquanto Wang *et al.* (2014) e Li *et al.* (2021) obtiveram os compósitos com AuNPs por meio de eletrodeposição. Oko e colaboradores, como já discutido anteriormente, utilizaram AuNPs produzidas por ablação a laser em água deionizada, onde nota-se que um baixo limite de detecção pode ser alcançado com a modificação do GCE apenas com AuNPs. Esse resultado, quando comparado aos demais, aponta o potencial de utilização de nanopartículas produzidas por LAL para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. No entanto, a comparação direta desses sistemas é dificultada devido a diversas outras variáveis envolvidas que afetam o limite de detecção, como técnica de voltametria empregada, parâmetros de leitura, área do GCE, concentração de nanopartículas, entre outras. Dessa forma, um estudo comparativo direto se faz necessário, visto que na

literatura não foi encontrado nenhum estudo comparativo entre AuNPs produzidas por LAL e outras técnicas de produção, como a rota química de síntese convencional.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na primeira parte deste capítulo serão abordados os detalhes da metodologia empregada em cada etapa desta pesquisa, desde os estudos iniciais para viabilizar a produção das nanopartículas até a metodologia utilizada para produção dos eletrodos modificados com as AuNPs. Na segunda parte, são abordados as especificações e os objetivos de todas as caracterizações empregadas, incluindo as análises eletroquímicas do sensor desenvolvido.

#### 3.1 MATERIAIS

Para a produção das nanopartículas foram utilizados substratos de ouro (dimensões 10 x 10 mm e 1 mm de espessura) com pureza > 99,95%, produzido pela empresa PGM Vectra do Brasil e adquiridos pela Nanogreen, como apoio a essa pesquisa. Como meio líquido para o processo de ablação foi utilizada água deionizada proveniente do deionizador próprio do Laboratório de Processamento Cerâmico (PROCER), do Departamento de Engenharia Química da UFSC, modelo SP-050C e SP-0100C – SPLABOR - condutividade: 0,7 a 4,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Cloreto de sódio P.A.-A.C.S. da marca Synth, foi utilizado para preparação de soluções também empregadas como meio líquido para o processo de ablação.

Para a etapa de aplicação das AuNPs produzidas no desenvolvimento do sensor eletroquímico, um agente formador de filme se faz necessário para garantir a fixação das nanopartículas no eletrodo modificado. Para esta finalidade, utilizou-se o copolímero Nafion<sup>®</sup> 117 ( $\text{C}_7\text{HF}_{13}\text{O}_5\text{S}\cdot\text{C}_2\text{F}_4$ ) (~ 5% em uma mistura de álcoois alifáticos inferiores e água) da marca Sigma-Aldrich.

O eletrólito de suporte utilizado para as medidas eletroquímicas foi uma solução tampão fosfato-salino (PBS - do inglês, *phosphate buffer saline*) pH 7,4 1x (0,01 M) do fabricante Gibco<sup>™</sup>. Os valores de pH foram ajustados com soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 6 M e ácido clorídrico (HCl) 2 M, quando necessário.

Como analito, utilizou-se cloridrato de dopamina ( $(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ ) da marca Sigma-Aldrich. Soluções de dopamina ( $7,0\times 10^{-3}$  M) foram previamente preparadas em água ultrapura do sistema Milli-Q<sup>®</sup> da empresa Millipore (Bedford, MA, USA) com resistividade de 18,2  $\text{M}\Omega\text{ cm}$  a 25 °C, e mantidas sob refrigeração a -15 °C.

AuNPs (diâmetro de 25 nm - determinado por microscopia eletrônica de transmissão (TEM - do inglês, *transmission electron microscopy*)) obtidas por rota química de redução e

estabilizadas em citrato foram produzidas pelo grupo de pesquisa dos Laboratórios de Simulação Numérica de Sistemas Químicos e de Transferência de Massa (LABSIN-LABMASSA), do Departamento de Engenharia Química da UFSC, e recebidas como forma de doação para estudo comparativo de aplicação no sensor. Da mesma forma, foram recebidas como doação AuNPs (diâmetro de 5 nm - determinado por TEM) obtidas por rota química de redução e estabilizadas em cloreto de 3-*n*-propil-(4-metilpiridínio)silsesquioxano produzidas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Plataformas Eletroquímicas (AMPERE), do Departamento de Química da UFSC.

## 3.2 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

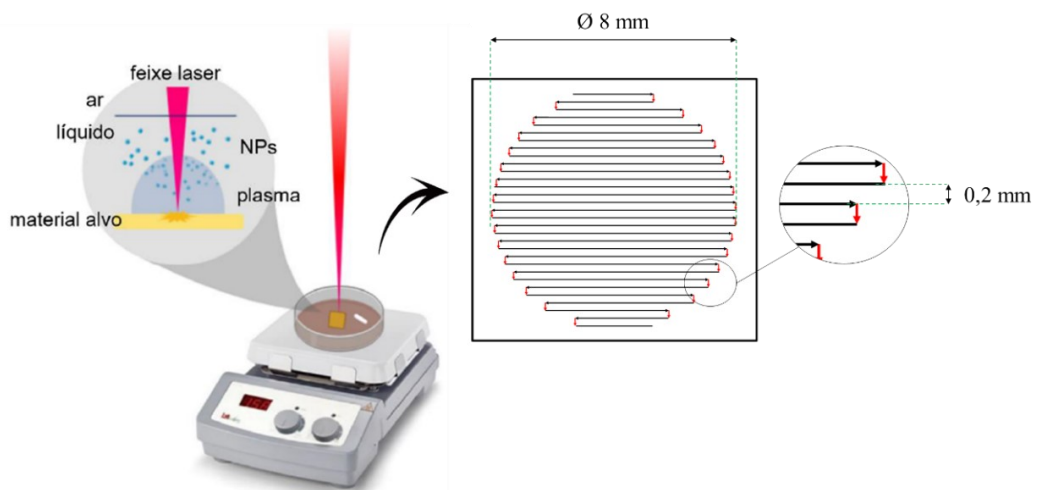
### 3.2.1 Produção das nanopartículas de ouro

O processo de ablação a laser para produção das nanopartículas de ouro foi realizado utilizando um laser de fibra nanopulsado IPG YLPN-1-1x120-50-M (*high power nanosecond pulsed ytterbium fiber laser*), com comprimento de onda de 1064 nm e fator de qualidade do feixe laser ( $M^2$ ) de 1,8, pertencente ao Laboratório de Mecânica de Precisão (LMP), do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. Um scanner galvanométrico Aerotech AGV-14HPO com lente f- $\theta$  ( $c = 170$  mm) de dois espelhos foi utilizado para o foco e movimentação do feixe laser permitindo a utilização de altas velocidades de varredura do feixe sem a necessidade de movimentação da mesa. O diâmetro do feixe de laser no foco é de aproximadamente 58  $\mu\text{m}$ .

A utilização de uma superfície polida nos alvos de ouro contribui para o aumento da reflexão da radiação eletromagnética e conseqüentemente interfere na capacidade de absorção da energia do laser para geração das partículas. Dessa forma, o procedimento de preparação dos alvos de ouro envolveu uma etapa de lixamento manual da amostra usando uma lixa de papel de 2500 mesh, também com o objetivo de manter o aspecto de todas as superfícies semelhante antes de cada processamento. Em seguida, os alvos foram imersos em uma solução 1:1 v/v de água destilada e álcool etílico para uma etapa de limpeza em banho ultrassônico por 10 minutos. Por fim, os alvos de ouro foram pesados em uma balança analítica Gehaka modelo AG200 para registrar a massa antes do processamento. A massa após cada processo de ablação também foi registrada com o objetivo de obter a diferença de massa e conseqüentemente uma estimativa teórica da concentração de ouro nas amostras.

A Figura 8 ilustra o setup experimental, onde o alvo de ouro é colocado em uma placa de Petri contendo 15 mL de água deionizada. Esse conjunto é colocado sob agitação utilizando um agitador magnético com rotação fixada em 500 rpm. A agitação durante todo o processo de ablação facilita a movimentação das partículas por todo o volume líquido, impedindo que estas permaneçam muito tempo sobre o alvo logo após sua formação. Ao lado, observa-se o desenho projetado que determina o caminho que o feixe laser segue para a ablação do alvo. As setas pretas representam o caminho que o laser segue ligado, já as setas vermelhas mostram o caminho que o laser segue desligado, o que significa que não há ablação entre linhas. Após a produção, as dispersões são imediatamente transferidas para frascos com tampa e armazenadas à temperatura ambiente, sem incidência direta de luz.

Figura 8 – Ilustração esquemática do setup de ablação a laser em meio líquido.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

É importante salientar que as especificações do laser utilizado neste trabalho, como o regime de operação em nanosegundos e comprimentos de onda na região do infravermelho configuram um sistema relativamente mais econômico (um investimento de aproximadamente R\$ 100 mil, scanner + laser + integrador + software) quando comparado a lasers em pico e femtosegundos (> R\$ 380 mil, scanner + laser + integrador + software), atualmente preferíveis para produção de nanopartículas (valores segundo cotação realizada com a IPG photonics em agosto de 2021 para fontes com potência de 50 W).

A máquina utilizada nessa pesquisa é geralmente empregada para gravação de materiais, principalmente metálicos e cerâmicos, bem como para decoração, criação de texturas ou controle de qualidade, por exemplo. Dessa forma, a otimização do processo de



produção de nanopartículas por ablação a laser utilizando essa máquina apresenta também um atrativo econômico, em viabilizar esta produção de modo a obter dispersões de nanopartículas de ouro com propriedades físico-químicas semelhantes a nanopartículas comerciais, sem a necessidade de lasers sofisticados ou processos químicos dispendiosos.

Em todos os experimentos foram utilizadas condições idênticas de foco, onde a distância da lente até a superfície do alvo e a espessura de 3 mm do filme de água sobre o alvo foram mantidos fixos. Parâmetros intrínsecos da fonte laser como potência, largura de pulso e frequência foram definidos como variáveis de estudo do processo de ablação e geração das nanopartículas. Além desses, após a definição do melhor conjunto de parâmetros intrínsecos do laser, parâmetros extrínsecos como a velocidade de varredura do feixe e o tempo de ablação foram variados com o objetivo otimizar o processo.

Para melhor compreensão, os procedimentos experimentais do estudo de produção das nanopartículas foram divididos em 4 etapas. Na etapa 1, para uma avaliação inicial do processo de ablação, os modos definidos pelo fabricante do equipamento (Tabela 3) foram testados. Utilizou-se a frequência nominal de cada modo e uma velocidade de 1000 mm/s foi fixada, com tempo total de processo de 60 s. O modo T1 não foi avaliado devido à baixa energia de pulso associada, insuficiente para uma remoção significativa de material. Já os modos T7 e T8 não foram avaliados devido ao alto nível energético, podendo ser muito agressivo ao alvo de ouro considerando sua espessura de 1 mm. Possivelmente, estes parâmetros levariam a um grande efeito de fusão e risco de danificação e/ou perda do alvo.

Tabela 3 – Codificação dos modos definidos pelo fabricante do equipamento e seus respectivos parâmetros (em cinza, os modos testados nesse estudo).

<b>Modo</b>	<b>Largura de pulso (ns)</b>	<b>Potência nominal (W)</b>	<b>Frequência nominal (kHz)</b>	<b>Faixa de frequência estendida (kHz)</b>
T1	1	50	5000	120-5000
T2	2	50	3000	60-5000
T3	4	50	1500	30-5000
T4	8	50	750	15-5000
T5	16	50	400	8-5000
T6	30	50	220	4-2200
T7	50	50	150	3-1500
T8	120	50	50	2-505

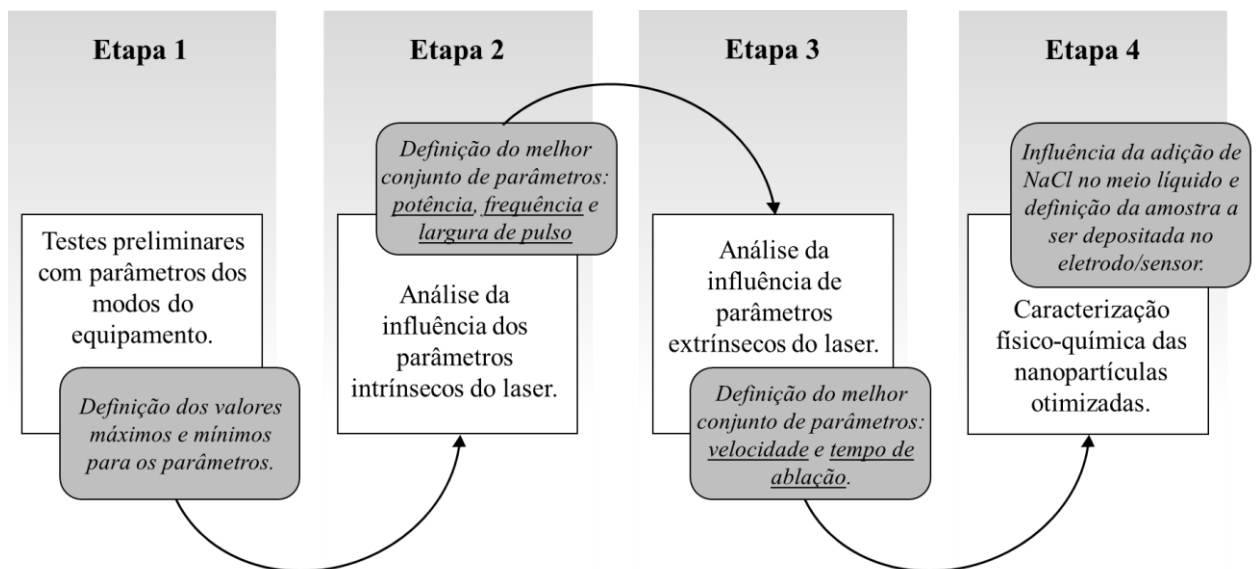
Fonte: IPG LASER (2017).

Essa avaliação inicial permitiu definir quais seriam os valores máximos e mínimos de frequência e largura de pulso a serem utilizados na etapa 2. Com essa definição, a etapa 2 consistiu em uma análise experimental fatorial completa com dois níveis e três fatores ( $2^3 = 8$  combinações) tendo como fatores: frequência, potência e largura de pulso. Os dados obtidos nessa análise foram tratados utilizando o software Statistica. O estudo permitiu definir a combinação mais promissora dos três parâmetros de entrada a ser utilizada na etapa 3.

Com o objetivo de otimizar a produção das nanopartículas de ouro buscando coloides mais homogêneos e concentrações mais altas, diferentes valores de velocidade (500 e 2000 mm/s) e tempo (120 e 500 s) foram testados na etapa 3.

Na etapa 4, com os parâmetros de produção definidos, as nanopartículas otimizadas passaram por uma caracterização físico-química mais aprofundada e a influência da adição de NaCl ao meio líquido da ablação também foi avaliada. Foram produzidos coloides em soluções de 100  $\mu\text{M}$  de NaCl previamente preparadas com auxílio de um agitador magnético. A Figura 9 apresenta, em fluxograma, as 4 etapas anteriormente descritas.

Figura 9 – Fluxograma das etapas experimentais empregadas para otimização da produção de nanopartículas de ouro neste trabalho.



Fonte: elaborada pela autora (2021)

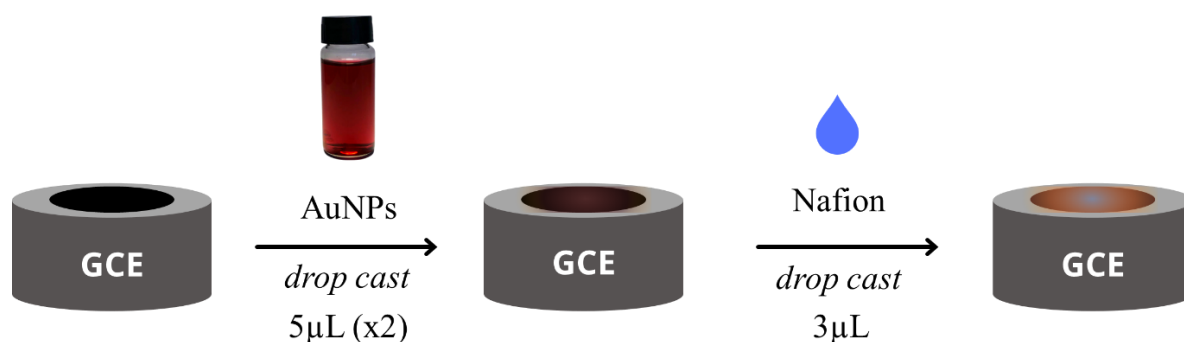
### 3.2.2 Modificação dos eletrodos

Para preparação dos eletrodos modificados, a superfície do GCE (diâmetro de 2 mm) foi cuidadosamente polida com pasta de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de granulometria 0,3  $\mu\text{m}$  e posteriormente 0,05  $\mu\text{m}$ , sendo em seguida lavada com água destilada e etanol e sonicada em banho ultrassom por 5 min. Após secagem do eletrodo, uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  da dispersão de AuNPs produzida por LAL, previamente sonicada em banho ultrassom por 20 min, foi depositada com o auxílio de uma micropipeta. O solvente foi evaporado em uma estufa à 80  $^\circ\text{C}$  por aproximadamente 5 min. Em seguida, o processo foi repetido para uma segunda deposição de AuNPs. Para evitar a lixiviação das AuNPs e garantir a fixação na superfície do eletrodo, uma solução de Nafion 0,15% em etanol e água foi preparada e uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  dessa solução foi depositada sobre o eletrodo. Um filme foi formado após evaporação do solvente em uma estufa à 80  $^\circ\text{C}$  por aproximadamente 5 min, obtendo-se o sensor denominado GCE/AuNPs/Nafion.

Similarmente, foram preparados os eletrodos sem modificação (GCE) e o modificado apenas com Nafion (GCE/Nafion) para realização de medidas comparativas. Da mesma forma, foram preparados eletrodos modificados com as AuNPs produzidas por rota química estabilizadas em citrato (GCE/AuNPs.QMC1/Nafion) e em 3-*n*-propil-(4-metilpiridínio)silsesquioxano (GCE/AuNPs.QMC2/Nafion). Para garantir que todos os eletrodos apresentavam a mesma massa de Au (70  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), a concentração de todas as amostras foi determinada por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) (como descrito na seção 3.3.1.6) e ajustadas para uma mesma concentração.

A Figura 10 ilustra o processo acima descrito para modificação do eletrodo.

Figura 10 – Esquema da preparação dos eletrodos de carbono vítreo modificados com AuNPs.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

### 3.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

#### 3.3.1 Análise superficial dos alvos e caracterização das nanopartículas de ouro

##### 3.3.1.1 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Após os processos de ablação realizados nas etapas 1 e 2, as superfícies dos alvos de ouro foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura permitindo a visualização dos efeitos da interação do laser com o material e o entendimento da influência dos parâmetros variados em cada produção. Essa análise permite visualizar efeitos térmicos sobre o alvo, como a fusão localizada do material, ou ainda quando o conjunto de parâmetros utilizados não possibilita uma ablação eficiente. Foi utilizado um microscópio de bancada Hitachi modelo TM3030 com filamento de tungstênio, pertencente ao grupo CERMAT (EMC/UFSC). Os alvos foram analisados com potencial de aceleração de 15 kV.

##### 3.3.1.2 Análise de Espectroscopia UV-Vis

As dispersões de nanopartículas de ouro obtidas foram analisadas em um espectrofotômetro Hitachi U-1900 UV-Vis pertencente ao Laboratório PROCER (EQA/UFSC) a fim de determinar o espectro de absorção das amostras entre comprimentos de onda de 380 – 800 nm. Nessa faixa, as nanopartículas de ouro apresentam o pico de absorção máximo, também chamado de SPR (do inglês, *surface plasmon resonance*), como já abordado na revisão bibliográfica. Esse pico é dependente do tamanho, forma e concentração das nanopartículas e, portanto, permite obter informações importantes a respeito da qualidade dos coloides produzidos.

As amostras das etapas 1 e 2 desse trabalho foram analisadas 4 dias após a produção. As amostras finais, definidas na etapa 4, foram analisadas após a produção e armazenadas em 3 diferentes condições: 1) ao abrigo de luz à temperatura ambiente; 2) expostas à luz à temperatura ambiente; e 3) ao abrigo de luz e refrigeradas em aprox. 4 °C. O espectro das dispersões foi analisado a cada 4 semanas durante 12 semanas para conhecimento da estabilidade da dispersão com o tempo.

Estas análises também permitem uma estimativa do diâmetro das partículas por meio das equações propostas por Haiss *et al.* A Equação (4) é indicada para cálculo do diâmetro de

partículas (d) entre 35 e 100 nm, onde  $\lambda_{spr}$  corresponde ao comprimento de onda no pico de SPR, enquanto a Equação (5) é indicada para o cálculo do diâmetro de partículas menores, entre 5 e 35 nm, onde  $A_{spr}$  corresponde a absorção no pico SPR e  $A_{450}$  corresponde à absorção em 450 nm.

$$d = \frac{\ln\left(\frac{\lambda_{spr} - 512}{6,53}\right)}{0,0216} \quad (4)$$

$$d = \exp\left(3 \frac{A_{spr}}{A_{450}} - 2,2\right) \quad (5)$$

Haiss *et al.* também propuseram a utilização da Equação (6) para cálculo do número de densidade de partículas (N) que leva em conta o diâmetro das partículas (d) anteriormente calculado e a absorção em 450 nm ( $A_{450}$ ):

$$N = \frac{A_{450} \times 10^{14}}{d^2 \left[ -0,295 + 1,36 \exp\left(-\left(\frac{d - 96,8}{78,2}\right)^2\right)\right]} \quad (6)$$

### 3.3.1.3 Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta ( $\zeta$ )

Após a produção, as amostras de nanopartículas foram caracterizadas por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS – do inglês, *dynamic light scattering*) com o intuito de determinar a distribuição do tamanho de partícula e o Potencial Zeta ( $\zeta$ ) das dispersões.

Essa análise permite determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas e/ou dos aglomerados considerando a intensidade da luz espalhada quando um laser é incidido na dispersão. Partículas grandes se difundem mais lentamente do que partículas pequenas, e o equipamento de DLS mede a dependência do tempo em função da luz espalhada para gerar uma correlação que pode ser matematicamente ligada a um tamanho de partícula. Os resultados dessa análise são curvas de distribuição de tamanho de partícula, e a largura dessa distribuição pode ser analisada pelo índice de polidispersividade (PDI).

A distribuição de intensidade descreve a quantidade de luz que é espalhada pelas partículas em grupos de diferentes tamanhos estando, portanto, intimamente relacionada às medições brutas do instrumento. Nesse caso, é importante salientar que o resultado obtido apresenta uma forte dependência da intensidade de luz espalhada em relação ao diâmetro da partícula. Por exemplo, uma partícula de 100 nm espalha um milhão de vezes mais luz do que uma partícula de 10 nm. Dessa forma, partículas maiores dominam o sinal, deslocando o diâmetro obtido para maiores valores (MENÉNDEZ-MANJÓN; BARCIKOWSKI, 2011).

Considerando as propriedades ópticas do material em análise, especialmente o índice de refração e absorção em 633 nm, o equipamento fornece a distribuição por número. Essa distribuição mostra o número de partículas em grupos de diferentes tamanhos e, portanto, assemelha-se a uma distribuição obtida a partir de uma técnica de contagem de partículas, como a realizada por meio de imagens de microscopia. Nesse caso, temos uma relação direta entre o tamanho da partícula e a sua contribuição na distribuição, onde uma partícula de 100 nm terá a mesma contribuição de uma partícula de 10 nm. Dessa forma, resultados típicos de DLS de boa qualidade geralmente apresentam uma diminuição no diâmetro ao passar de intensidade para número (NANOCOMPOSIX, 2015).

O Potencial Zeta é uma medida que indica o potencial eletrocinético próximo à superfície da partícula sendo um bom indicador da estabilidade eletrostática da dispersão. Dispersões com alto valor (em módulo) de  $\zeta$  são consideradas estáveis, pois garantem uma força repulsiva eletrostática entre as partículas. Por outro lado, valores próximos a 0, denominado ponto isoelétrico, são instáveis e tendem a se aglomerar rapidamente. Normalmente, valores em torno de  $\pm 25$  mV são considerados eletrostaticamente estáveis (IVANOV, 2011).

As análises foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN), do Departamento de Engenharia Química da UFSC, utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nanosizer com uma fonte laser He-Ne a 633,3 nm e arranjo óptico a 173°. A preparação das amostras foi efetuada dispersando-as em banho ultrassônico por 5 min. As amostras foram analisadas em triplicata. Em todas as condições experimentais, a viscosidade da suspensão foi assumida como igual à da água e para os cálculos da distribuição do tamanho ponderados em número, para o comprimento de onda 633 nm, o componente real do índice de refração do ouro adotado foi 0,18344, enquanto valor médio de absorção foi 3,4362. Os resultados foram obtidos e tratados utilizando o software Zetasizer.

Adicionalmente, as amostras produzidas apenas em água e na solução de NaCl 100  $\mu\text{m}$ , obtidas após etapa de otimização, foram analisadas comparativamente com relação a variação do potencial zeta em diferentes pH. Essas análises foram conduzidas 5 meses após a produção das amostras, no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio), do Departamento de Química da UFSC, utilizando também o equipamento Malvern Zetasizer Nanosizer conectado ao software Zetasizer. O pH das dispersões foi ajustado adicionando-se soluções de HCl 0,01 M e NaOH 0,01 M e medidos por meio de um pHmetro Orion Research Expandable Ion Analyzer EA 920. As medidas foram realizadas em triplicata.

#### 3.3.1.4 *Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)*

As amostras obtidas na etapa 4 foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão com o objetivo de visualizar o formato e tamanho das nanopartículas produzidas. As suspensões coloidais foram dispersas em banho ultrassom por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram depositadas em grids de cobre 200 mesh revestidos com filme carbono com o auxílio de uma micropipeta.

As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) com o microscópio Jeol JEM-1011 operando com voltagem de aceleração de 100 kV. As imagens obtidas foram analisadas no software ImageJ, permitindo a medição do diâmetro de 400 partículas de cada amostra para a construção de histogramas distribuição do tamanho de partícula. A análise de difração de elétrons de área selecionada (SAED - do inglês, *selected area electron diffraction*) também foi realizada nas mesmas condições para conhecimento da estrutura cristalina das partículas.

#### 3.3.1.5 *Análise de Difração de Raios X (XRD)*

As amostras obtidas após a etapa 3 de otimização do processo foram caracterizadas por difração de raios X (XRD - do inglês, *X-ray diffraction*) com objetivo de confirmar a obtenção de AuNPs metálicas a partir da identificação de picos referentes a estrutura cristalina típica do ouro metálico ou se haveria a formação de espécies de óxidos no meio. As análises foram conduzidas utilizando o difratômetro Rigaku MiniFlex600 pertencente ao LINDEN (UFSC), com intervalo de medida de  $5^\circ - 90^\circ 2\theta$ , tamanho de digitalização de passo de  $0,05^\circ$  e velocidade  $10^\circ/\text{min}$ . A radiação Cu-K $\alpha$  foi fixada em  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ . Este equipamento analisa

apenas amostras em pó, dessa forma, devido a pouca quantidade de material por amostra, um procedimento alternativo foi necessário. As dispersões coloidais foram centrifugadas a 4500 rpm por 5 min e o sobrenadante foi separado. A dispersão concentrada foi depositada diretamente no porta-amostra de vidro do equipamento e submetidas a secagem a 50 °C por 2 horas. Esse procedimento foi repetido até obter a formação de filme suficiente para permitir a leitura. Os difratogramas obtidos foram analisados por meio do software X'Pert High Score Plus para identificação da estrutura cristalina presente.

### 3.3.1.6 *Análise de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)*

A concentração de ouro nas amostras otimizadas foi quantificada utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica AAnalyst 100 (Perkin Elmer) pertencente ao Laboratório de Espectroscopia Atômica e de Massa (LEMA/LARES), do Departamento de Química da UFSC. A análise foi conduzida utilizando tubos de grafite aquecidos longitudinalmente, sem plataforma e sem modificador químico. Foram utilizadas temperaturas de pirólise e atomização de 600 °C e 2000 °C, respectivamente, e injeção de 10 ou 20 µL. Para análise, as amostras foram diluídas 4000 x em água ultrapura a fim de obter leituras na ordem de ng/mL. As amostras foram analisadas em quintuplicata (n = 5) e os resultados são reportados como média ± desvio padrão.

### 3.3.2 **Medidas eletroquímicas**

O desempenho dos eletrodos de carbono vítreo modificados e sem modificação foi analisado por meio de medidas eletroquímicas conduzidas em uma célula eletrolítica com volume total de 10 mL. O eletrodo de referência utilizado foi do tipo Ag/AgCl,KCl(sat) e o contra eletrodo constituído por um fio de platina.

As medidas foram realizadas no Laboratório de Plataformas Eletroquímicas (AMPERE), do Departamento de Química da UFSC, com o uso do potenciostato PalmSens 4 (Palm Instruments BV – Holanda) conectado a um computador contendo o software PSTrace (versão 5.5).

Para os estudos iniciais de caracterização do sensor, a dopamina (DA) foi adicionada ao eletrólito de suporte (PBS 0,01 M) em uma concentração final de 70 µM. A fim de garantir a homogeneidade da solução do eletrólito e analito, um agitador magnético da marca Hanna



Instrument HI 190M foi utilizado para agitação da solução por 10 segundos antes de todas as medidas.

A técnica de voltametria cíclica foi aplicada em um intervalo de potencial de -0,2 V a 0,7 V, seguido de uma varredura reversa de 0,7 V a -0,2 V. Os estudos comparativos do eletrodo com e sem modificação foram realizados em triplicada em solução PBS pH 7,4 com uma velocidade de varredura de potencial ( $v$ ) de 50 mV/s.

Medidas em diferentes pH (3, 4, 5, 6, 7,4 e 8) e diferentes velocidades de varredura (50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mV/s) foram realizadas para conhecimento do mecanismo da reação. O pHmetro Ohaus (Modelo ST3100-F) foi utilizado para verificação do pH do eletrólito.

Por fim, para construção da curva de calibração do sensor desenvolvido, as medidas eletroquímicas foram realizadas com a adição de alíquotas sucessivas de dopamina permitindo a obtenção da variação da corrente em função da concentração de DA.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo são apresentados os resultados alcançados em cada etapa desta pesquisa. A primeira parte traz uma discussão dos resultados referentes as etapas 1, 2 e 3, (conforme apresentado anteriormente no fluxograma da Figura 9) abordando a investigação da produção das AuNPs pelo método proposto. Na segunda parte tem-se uma caracterização físico-química mais aprofundada das AuNPs otimizadas. E por fim, são apresentados os resultados de aplicação das AuNPs produzidas por ablação a laser em líquido em um sensor eletroquímico para determinação da dopamina.

### 4.1 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO POR LAL

#### 4.1.1 Testes preliminares com parâmetros dos modos do equipamento

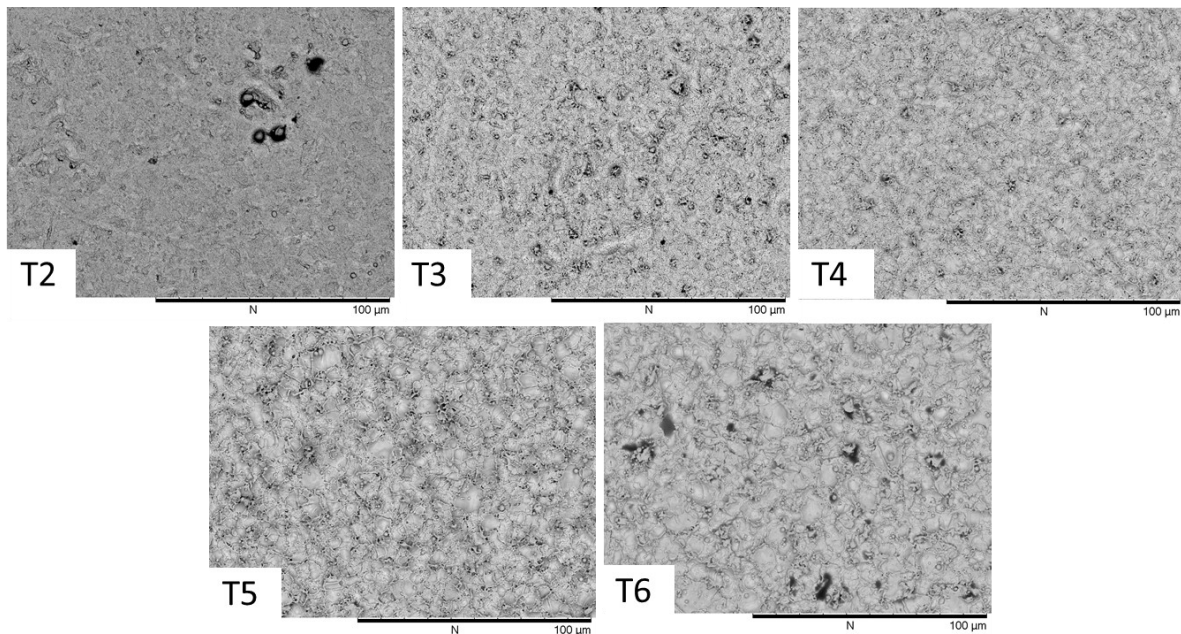
Os modos de operação definidos pelo fabricante do laser (IPG LASER, 2017) foram analisados para produção de nanopartículas, permitindo um conhecimento preliminar do efeito causado nos alvos de ouro e da capacidade de geração de AuNPs. Como apresentado anteriormente na Tabela 3, cada largura de pulso está associada a uma frequência nominal na qual o fabricante garante que o perfil temporal do pulso está de acordo com o especificado na ficha técnica do equipamento. Da mesma forma, os modos são definidos considerando a potência máxima de 50 W.

Devido a diferença do nível energético de cada modo, a interação do laser com o alvo de ouro durante o processo de LAL resulta em diferentes efeitos na superfície do alvo como pode ser observado nas micrografias realizadas nos alvos de ouro apresentadas na Figura 11. Nota-se que todos os modos apresentaram um efeito térmico de ablação, com sinais de fusão em algumas regiões e arrancamento de material. No entanto, esse efeito de derretimento torna-se mais pronunciado conforme aumenta-se o modo (maiores larguras de pulso, menores frequências).

Pelas micrografias não é possível distinguir crateras individuais dos pulsos e nem o caminho do feixe laser. Devido à alta frequência de operação, na ordem de kHz, e a velocidade de 1000 mm/s empregada, todos os conjuntos de parâmetros testados levam a níveis de sobreposição de pulsos similares, sempre > 90% (calculado segundo a Equação (1) considerando um *spot size* de aproximadamente 58  $\mu\text{m}$  referente ao diâmetro do feixe). Além

disso, a geração de partículas no meio líquido contribui para a difração do laser quando este interage com as partículas presentes em dispersão. Essa interação provoca um desvio do feixe que passa a atingir outras regiões do alvo fora do caminho inicialmente projetado para seu percurso, aumentando a área total afetada da superfície. Esse efeito se mostra bastante presente nas condições aqui avaliadas, de modo que toda a superfície do alvo foi termicamente afetada.

Figura 11 – Micrografias de varredura dos alvos de ouro após o processo de LAL usando os modos nominais T2 (2 ns, 3000 kHz), T3 (4 ns, 1500 kHz), T4 (8 ns, 750 kHz), T5 (16 ns, 400 kHz) e T6 (30 ns, 220 kHz) do equipamento



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O modo T2 (2 ns, 3000 kHz) resultou em pouca agressão no alvo comparado aos demais já que a utilização de altas frequências reduz a energia do pulso, conforme mostra a Equação (2). Já no modo T6 (30 ns, 220 kHz) pode-se observar maiores regiões de fusão, indicando um efeito térmico mais agressivo devido a maior energia de pulso associada a baixas frequências.

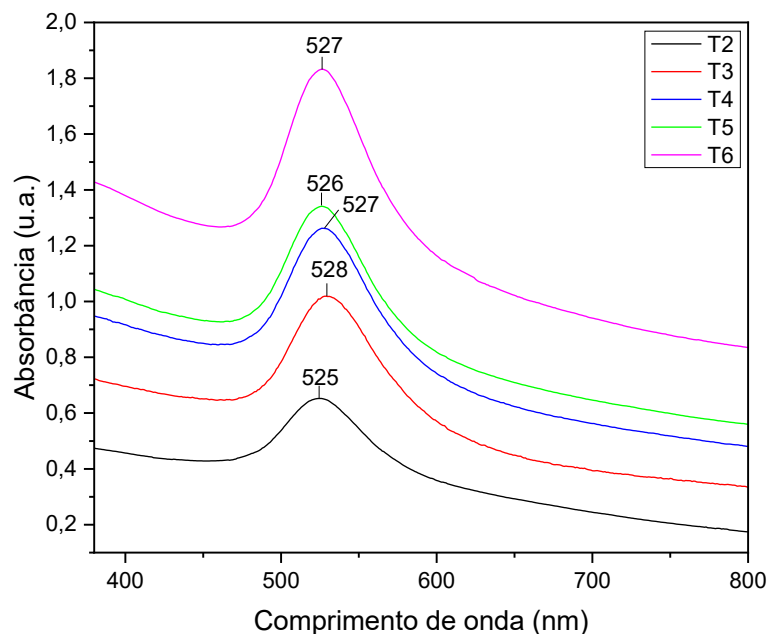
A capacidade de remoção de material do alvo e geração de nanopartículas também está associada à energia de pulso, de modo que a produtividade aumenta quase que linearmente com a energia de pulso, desde que o mecanismo dominante de remoção de material permaneça o mesmo. No entanto, o aumento da energia de pulso está geralmente

associado à geração de partículas maiores e com uma distribuição de tamanho mais larga (TORRISI; TORRISI, 2018).

A Figura 12 apresenta o espectro UV-Vis das dispersões obtidas nesses testes iniciais. Nota-se que todas as curvas apresentam pico de ressonância de *plasmons* de superfície em torno de 525 – 528 nm, sendo típico de dispersões de nanopartículas de ouro com cerca de 30 – 40 nm de diâmetro, conforme a Equação (4) proposta por Haiss *et al.* (2007).

No espectro de absorção é observado um aumento da linha base em toda faixa de comprimento de onda conforme aumenta-se o modo. Esse aumento da linha base indica um maior espalhamento característico de suspensões onde há sólidos com dimensões maiores que as nanopartículas plasmônicas, i.e. aglomerados de partículas. Além disso, de acordo com Muto, Miyajima e Mafune (2008), em 380 nm o espectro de absorção é determinado principalmente por transições entre bandas nos átomos de ouro, sendo independente do tamanho das partículas. Por esse motivo, a absorbância em 380 nm pode estar diretamente relacionada à concentração de átomos de ouro no líquido, indicando que na medida que o pulso aumenta, dispersões mais concentradas são obtidas (MENÉNDEZ-MANJÓN; BARCIKOWSKI, 2011; MUTO; MIYAJIMA; MAFUNÉ, 2008).

Figura 12 – Espectro de absorção UV-Vis das dispersões de AuNPs produzidas nos testes preliminares.



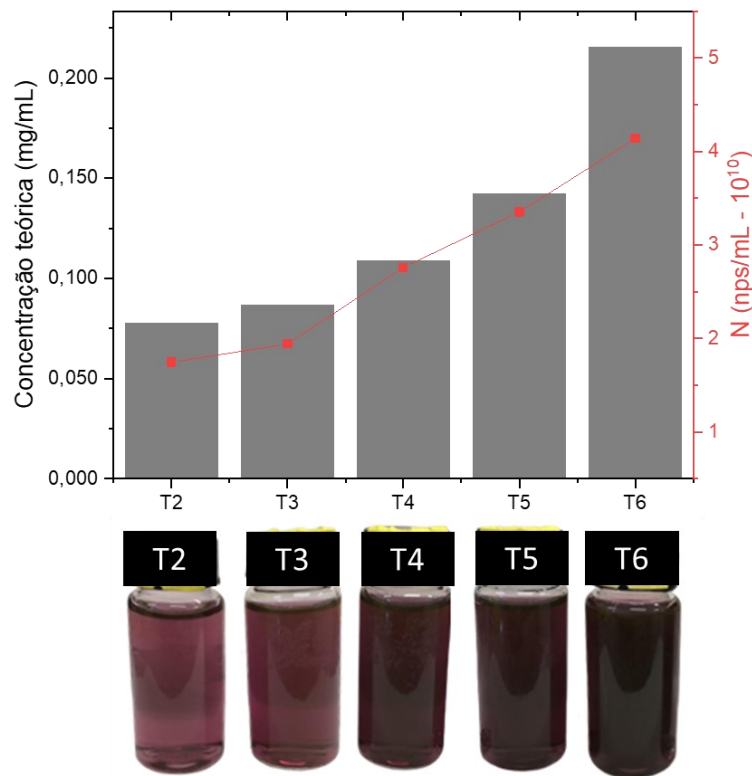
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Dessa forma, a análise de espectroscopia indica que indo do modo T2 ao T6 tem-se uma maior geração de partículas, porém aponta a presença de partículas maiores junto às nanopartículas plasmônicas. O aumento da concentração com o modo também pode ser observado analisando os valores de concentração teórica (mg/mL), calculados a partir da diferença de massa do alvo antes e após o processo de ablação, como apresenta a Figura 13.

O gráfico da Figura 13 apresenta também o número de partículas/mL (N) obtidos por meio das equações propostas por Haiss, descritas na seção 3.3.1.2, e mostra, portanto, uma correlação direta com a concentração teórica.

Além disso, analisando o aspecto visual das dispersões, é evidente o aumento da concentração pela obtenção de dispersões mais escuras. A coloração com tons bordô-rosa também evidencia a obtenção de partículas com diâmetros  $> 30$  nm e aglomeradas.

Figura 13 – Correlação entre concentração teórica e número de partículas por mL das amostras obtidas nos testes preliminares. Abaixo, o aspecto visual das dispersões obtidas.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Os estudos preliminares permitiram definir os parâmetros que seriam mais promissores para otimização da produção. Considerando que o modo T2 apresentou baixa

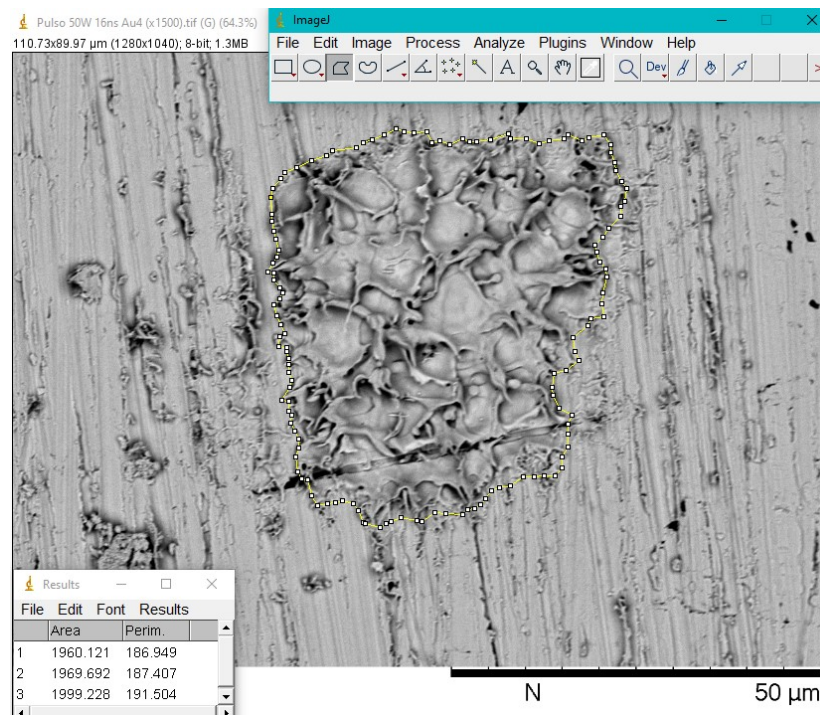
geração de partículas e um efeito de ablação pouco evidente no alvo, decidiu-se desconsiderá-lo para os estudos posteriores. Da mesma forma, foi desconsiderado o modo T6 devido ao seu elevado aporte térmico que ocasionou um efeito de fusão agressivo no alvo, levando à geração de uma dispersão com alta concentração de grandes partículas, evidenciada pela alta absorção em comprimentos de onda acima de 600 nm.

Portanto, para a etapa seguinte de análise da influência dos parâmetros intrínsecos do laser (Etapa 2), optou-se por utilizar como valor mínimo a largura de pulso de 4 ns do modo T3, e como valor máximo a largura de pulso de 16 ns do modo T5. Para conhecimento da influência da potência no processo de geração de partículas, foram definidos 2 níveis para os testes: 20 W e 50 W. Ainda, com o intuito de observar a influência de variações da frequência, foram realizados testes utilizando as duas frequências nominais de cada modo. Assim, escolheu-se os valores de frequência nominal de 400 kHz, como valor mínimo, e 1500 kHz, como valor máximo, os quais estão incluídos na faixa de frequência estendida de ambos os modos, conforme determinado pelo fabricante do laser utilizado (IPG LASER, 2017). Dessa forma, montou-se o planejamento fatorial  $2^3$ , discutido na sequência.

#### **4.1.2 Análise da influência dos parâmetros intrínsecos do laser**

Conforme abordado na seção 2.2.1 deste trabalho, o efeito do processo de ablação em um alvo não depende apenas dos parâmetros do feixe de radiação eletromagnética, mas sim da interação laser-matéria. Dessa forma, para uma determinação mais aproximada da fluência, um teste de uma única passagem do feixe laser com frequência de 120 kHz e velocidade de varredura de 7000 mm/s foi conduzido para visualização do efeito de único pulso nas duas larguras de pulso escolhidas, 4 ns e 16 ns, e nas potências de 20 e 50 W. A área afetada por um único pulso, pode ser visualizada por meio de SEM (área delimitada pelo pontilhado amarelo) e medida com auxílio do software ImageJ pelo método de determinação do perímetro, conforme ilustra a Figura 14. A partir do valor obtido para a área foi estimado um diâmetro equivalente para cálculo aproximado da sobreposição de pulso por meio da Equação (1). Foram realizadas 3 medidas independentes das imagens e os resultados estão reportados como média  $\pm$  desvio padrão na Tabela 4. Nota-se que o diâmetro equivalente se mostrou relativamente próximo do *spot size* de 58  $\mu\text{m}$  referente ao diâmetro do feixe fornecido pelo fabricante.

Figura 14 – Método empregado para medida aproximada da área afetada por um único pulso usando o Software ImageJ, a partir de uma imagem de microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 4 – Valores da área do alvo afetada pelo laser e diâmetro equivalente, obtidos por meio do Software ImageJ.

<b>Largura de pulso (ns)</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Área afetada (<math>\mu\text{m}^2</math>) *</b>	<b>Diâmetro equivalente (<math>\mu\text{m}</math>) *</b>
<b>4</b>	20	$2479 \pm 4$	$56 \pm 2$
	50	$1810 \pm 14$	$48 \pm 4$
<b>16</b>	20	$2407 \pm 4$	$55 \pm 2$
	50	$1976 \pm 20$	$50 \pm 5$

\*Média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A Tabela 5 apresenta os conjuntos de parâmetros testados nessa etapa. A energia de pulso teórica foi estimada a partir da Equação (2), enquanto a fluência aproximada foi calculada utilizando a Equação (3), onde o valor médio da área afetada está apresentado na Tabela 4. Nota-se que dentro dessas configurações, todos os conjuntos de parâmetros levaram a uma sobreposição consideravelmente alta, acima de 90%.

Tabela 5 – Parâmetros testados na etapa de planejamento fatorial

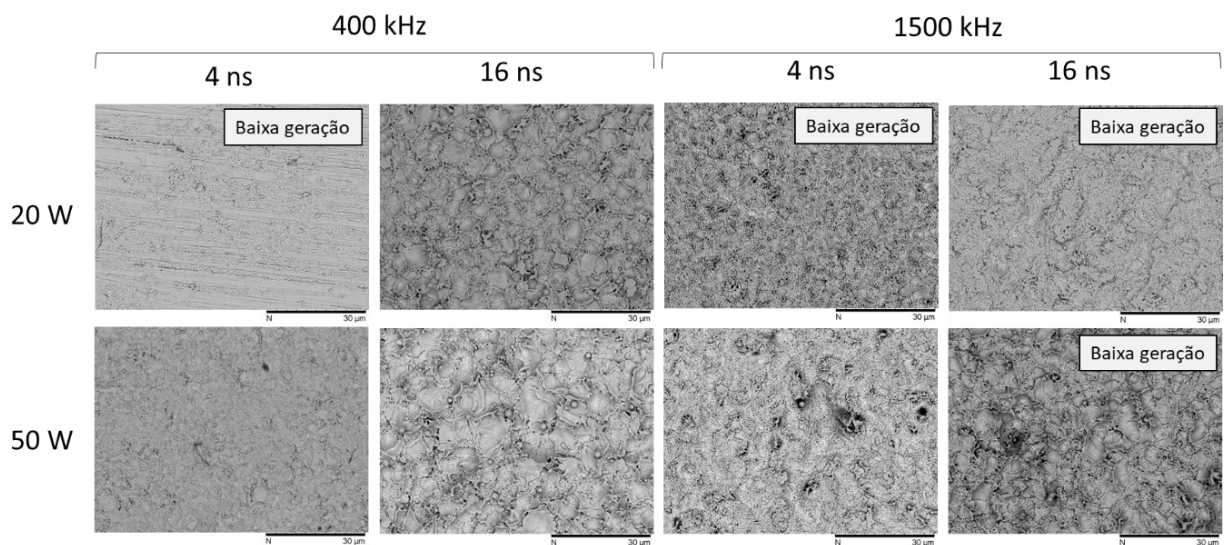
Amostra	Largura de pulso (ns)	Frequência (kHz)	Potência (W)	Velocidade (mm/s)	Energia de pulso (mJ)*	Fluência (J/cm <sup>2</sup> )*	SP (%)*
Au.4.400.20	4	400	20	1000	0,05	2,02	95,5
Au16.400.20	16	400	20	1000	0,05	2,08	95,4
Au.4.1500.20	4	1500	20	1000	0,01	0,54	98,8
Au.16.1500.20	16	1500	20	1000	0,01	0,55	98,8
Au.4.400.50	4	400	50	1000	0,12	6,91	94,8
Au.16.400.50	16	400	50	1000	0,12	6,32	95,0
Au.4.1500.50	4	1500	50	1000	0,03	1,84	98,6
Au.16.1500.50	16	1500	50	1000	0,03	1,69	98,7

\* Valores aproximados.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na Figura 15 são apresentadas as micrografias obtidas por SEM dos alvos de ouro após o processo de ablação para geração das nanopartículas utilizando os parâmetros descritos na Tabela 5. Nota-se, mais uma vez, que os parâmetros testados resultaram em efeitos de fusão na superfície, os quais se mostraram mais agressivos com o aumento da potência. Na imagem estão indicados os parâmetros que resultaram em uma baixa geração de partículas.

Figura 15 – SEM dos alvos de ouro após o processo de LAL na etapa de testes experimentais fatoriais.



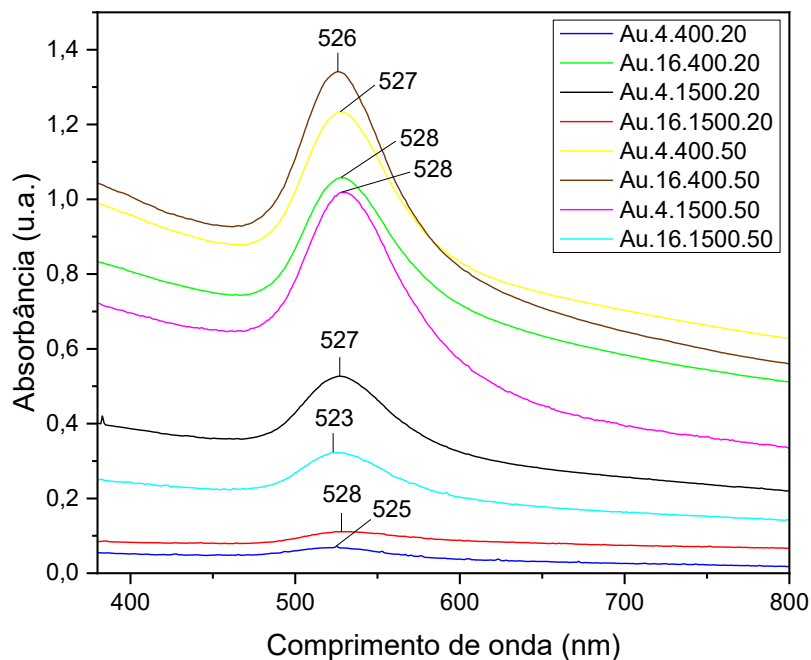
Fonte: Elaborada pela autora (2021).



Como discutido anteriormente, para cada material e sistema de ablação, existe um limiar de fluência no qual apenas acima deste, ocorre geração de nanopartículas (ZHANG; GÖKCE; BARCIKOWSKI, 2017). A fluência que chega até o alvo é diretamente influenciada pelo *setup* do processo, o que inclui aspectos como características da superfície do alvo, meio líquido, espessura de líquido acima do alvo e agitação do meio líquido, a qual também pode provocar oscilações da espessura do líquido e, conseqüentemente, variações na fluência.

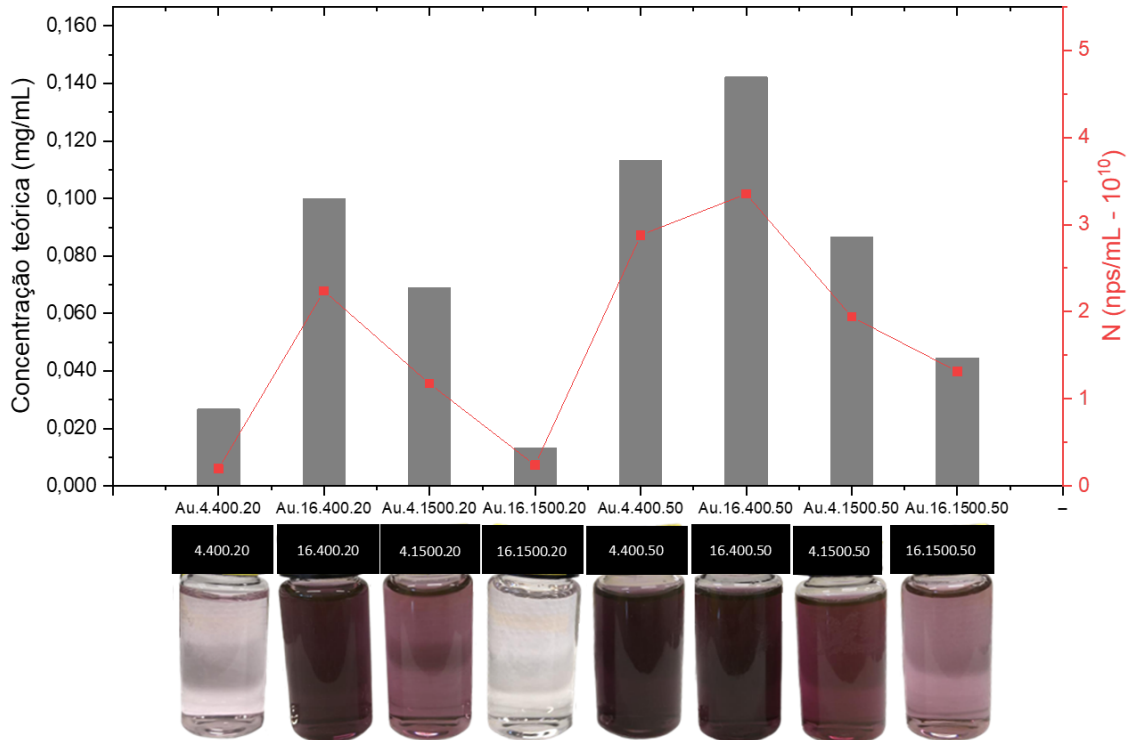
Os conjuntos de parâmetros associados as menores fluências teóricas ( $\sim 0,5 \text{ J/cm}^2$ ) resultaram em baixa ou insignificante geração de partículas. Por outro lado, ao utilizar parâmetros associados as maiores fluências ( $> 6 \text{ J/cm}^2$ ) foram produzidas as dispersões com as mais elevadas concentrações de ouro. Tais resultados podem ser observados pelo espectro de absorção, apresentado na Figura 16, e pela concentração estimada, apresentada na Figura 17.

Figura 16 – Espectro de absorção UV-Vis das dispersões de AuNPs produzidas nos testes fatoriais.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

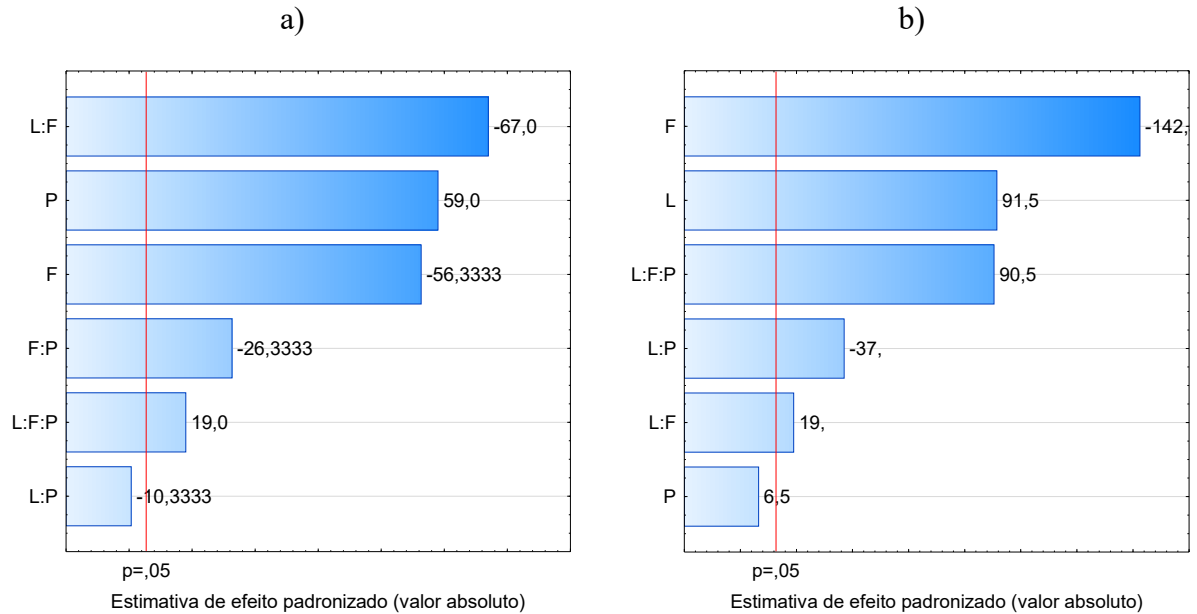
Figura 17 – Correlação entre concentração teórica e número de partículas por mL das amostras obtidas nos testes fatoriais. Abaixo, o aspecto visual das dispersões obtidas.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Em todos os casos, ao aumentar somente a potência tem-se uma maior geração de AuNPs como esperado. No entanto, os resultados apontaram que a influência da largura de pulso combinada com a frequência se sobrepõe a influência da potência, de modo que, quando ambas aumentam, uma diminuição da geração de partículas foi observada. A Figura 18a mostra esse efeito a partir do gráfico de Pareto das influências dos fatores analisados. Do mesmo modo, a Figura 18b mostra os efeitos dos parâmetros avaliados no índice de polidispersividade (PDI) das dispersões produzidas. Nota-se que a frequência apresentou o maior efeito no PDI, de modo que um maior valor de frequência se mostrou mais apropriado para a redução da polidispersividade.

Figura 18 – Gráfico de Pareto para a influência dos parâmetros largura de pulso (L), frequência (F) e potência (P) na a) concentração ( $R^2 = 0,99992$ ; Adj: 0,99943) e b) no PdI dos coloides produzidos ( $R^2 = 0,99997$ ; Adj: 0,99982).



\*Aplicação do modelo de redução de coeficientes de regressão conforme detalhado no APÊNDICE A.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

À medida em que se aumenta a largura de pulso, o tempo de interação de um pulso com o alvo se torna maior e, portanto, ao aumentar a frequência, maior será a sobreposição dos pulsos, e a energia do laser é menos aproveitada para geração de novas NPs a partir do alvo. Esse pode ser um dos motivos pelos quais a interação L:F apresentou a maior influência negativa na concentração. Além disso, observa-se que com L e F no nível alto, tem-se uma combinação de parâmetros que foge da frequência nominal do modo (T5). Apesar de estar incluída na faixa de frequência estendida informada pela fabricante da fonte laser, os resultados apontaram que existe uma dependência desses fatores para maximizar a concentração de NPs na dispersão.

Com o objetivo de identificar a melhor condição de parâmetros testados, a função desejabilidade foi aplicada, a qual representa o compromisso entre as variáveis respostas que estão sendo avaliadas, nesse caso, concentração e PdI. A desejabilidade individual (*di*) foi calculada conforme método proposto por Derringer & Suich (1980), onde as respostas medidas experimentalmente são convertidas em valores entre 0 e 1, sendo que quanto mais próxima de 1, mais desejável é a resposta (PEREIRA FILHO, 2015). Para a concentração,

como o objetivo é maximizar a resposta, foi utilizada a Equação (7), onde  $y$  é a resposta que está sendo monitorada,  $R_{min}$  e  $R_{max}$  são a menor e maior resposta obtida, respectivamente.

$$di = \left( \frac{y - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \right) \quad (7)$$

Já para o PdI, como objetivo é minimizar a resposta, foi utilizada a Equação (8).

$$di = \left( \frac{R_{max} - y}{R_{max} - R_{min}} \right) \quad (8)$$

Após obter a desejabilidade individual para as todas as condições de parâmetros avaliadas, a desejabilidade global (D) pode ser calculada pela raiz quadrada da multiplicação da  $di$  da concentração e da  $di$  do PdI. Os resultados obtidos apontaram que a maior desejabilidade global foi encontrada para o conjunto de parâmetros Au.4.1500.50, como mostra a Tabela 6.

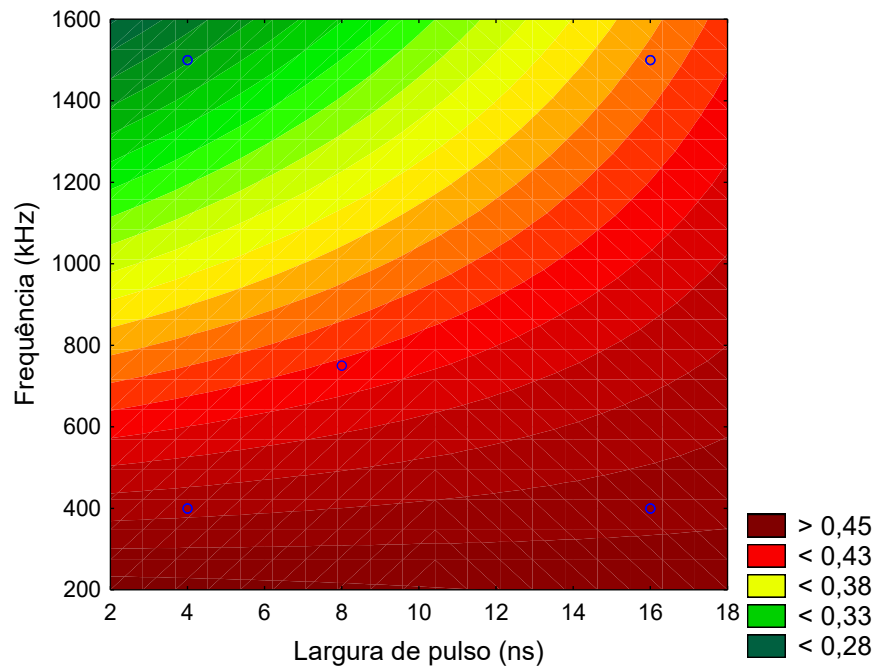
Tabela 6 – Desejabilidade individual da concentração e PdI e desejabilidade global calculadas para cada conjunto de parâmetros testados (em verde, a maior desejabilidade global obtida).

<b>L</b> <b>(ns)</b>	<b>F</b> <b>(kHz)</b>	<b>P</b> <b>(W)</b>	<b><i>di</i> Concentração</b>	<b><i>di</i> PdI</b>	<b>D</b>
4	400	20	0,1085	0,6289	0,2613
16	400	20	0,6744	0,0000	0,0000
4	1500	20	0,4341	0,8491	0,6071
16	1500	20	0,0000	0,6698	0,0000
4	400	50	0,7752	0,2044	0,3981
16	400	50	1,0000	0,3774	0,6143
4	1500	50	0,5736	1,0000	0,7574
16	1500	50	0,2403	0,4843	0,3411

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A Figura 19 apresenta um gráfico de contorno do PdI para potência fixa de 50 W indicando graficamente que um menor valor de polidispersividade é alcançado com o uso da menor largura de pulso e maior frequência.

Figura 19 – Gráfico de Superfície de Resposta do PDI considerando a potência fixa de 50 W.



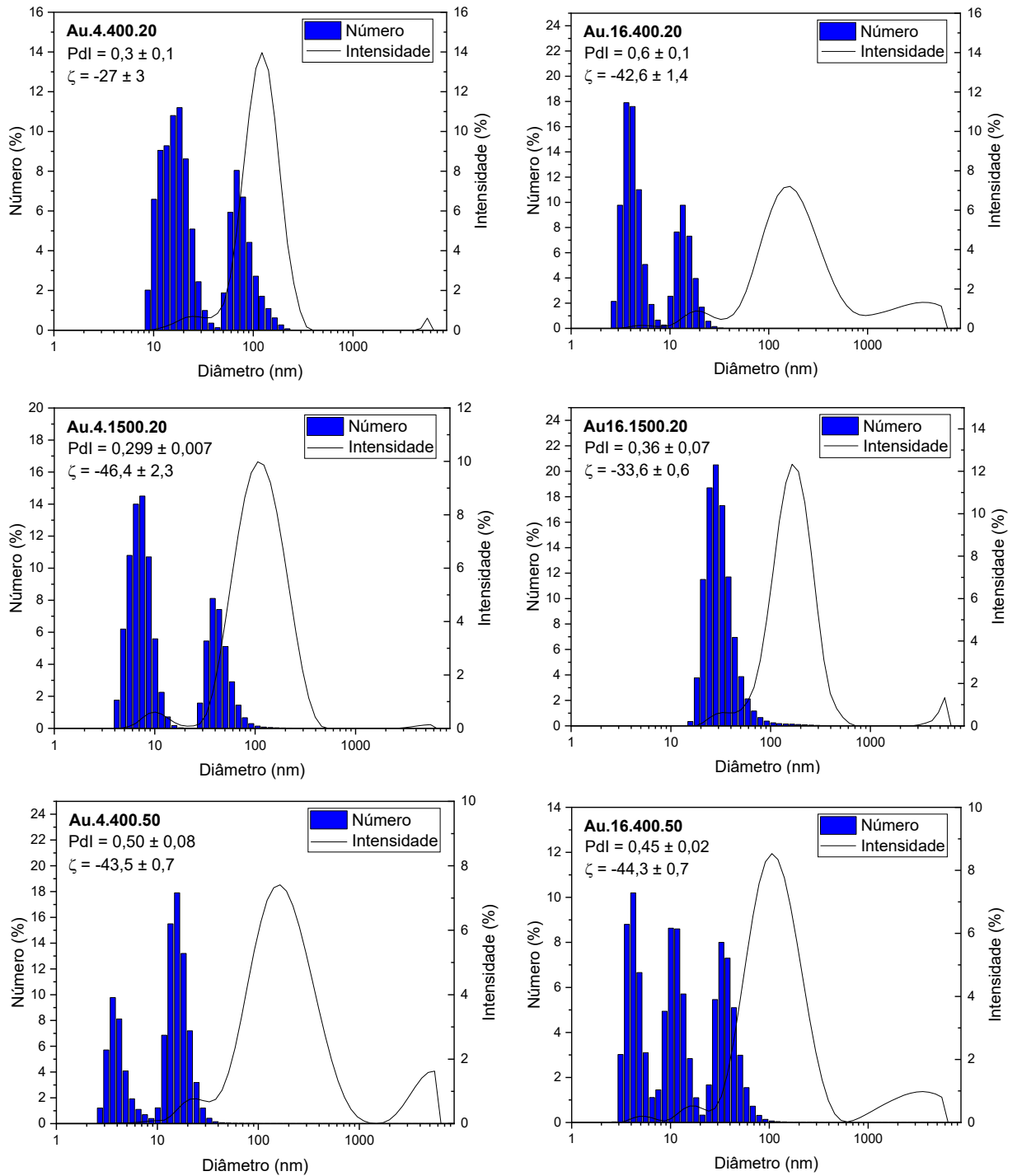
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

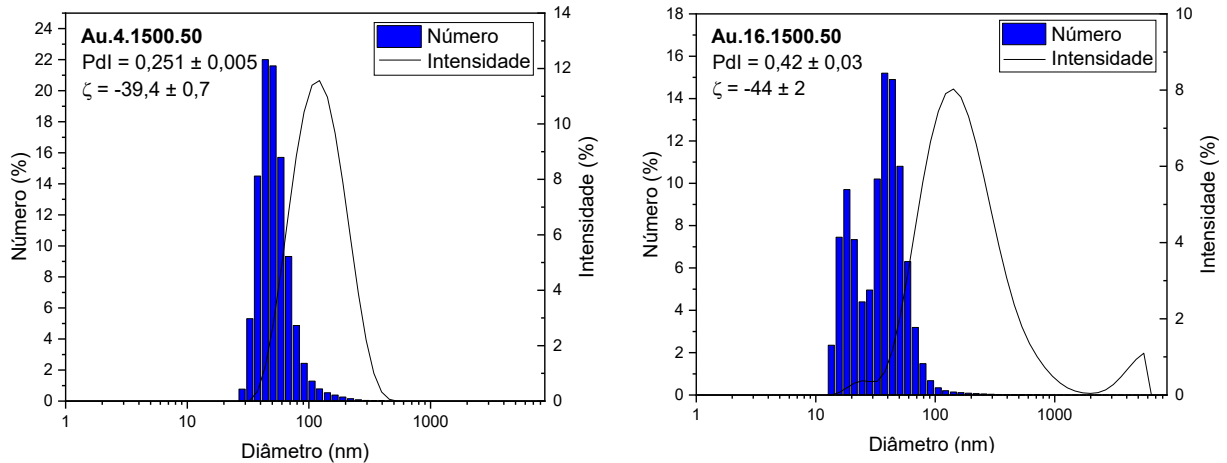
Esses resultados estão de acordo com os espectros de absorção da luz visível apresentados anteriormente na Figura 16, onde a amostra Au.4.1500.50 apresentou um pico SPR mais estreito, com uma queda mais acentuada da absorção em comprimentos de onda  $> 520$  nm, associado a uma distribuição de tamanho de partículas mais estreita.

A fim de determinar a distribuição de tamanho de partícula, o diâmetro hidrodinâmico foi obtido por DLS. A Figura 20 apresenta as distribuições expressas por intensidade de espalhamento e por número. Nota-se que partículas/aglomerados  $> 100$  nm dominam o sinal por intensidade em todas as amostras, de modo que a distribuição por intensidade indica majoritariamente o estado de aglomeração das partículas, como observado por Menéndez-Manjón e Barcikowski (2011). No entanto, ao converter para a distribuição por número, percebe-se que tais partículas/aglomerados estão presentes em menor quantidade, indicando que a maioria das partículas apresentam diâmetros  $< 100$  nm.

Analisando as curvas de distribuição de tamanho de partículas por número, nota-se que a amostra Au.4.1500.50 apresentou a curva mais estreita, sendo, portanto, a amostra mais monodispersa, como indicado pelo valor de PDI apresentado anteriormente. Todas as amostras produzidas apresentaram  $\zeta > 25$  mV em módulo, indicando uma boa estabilidade eletrostática.

Figura 20 – Curvas de distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento (linha preta) e por número (barras azuis) obtidas por DLS na etapa de testes fatoriais (identificação da amostra no canto superior esquerdo).





Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Menéndez-Manjón e Barcikowski (2011), apontaram que elevadas frequências levam a um melhor controle do tamanho de partículas na produção de AuNPs devido ao efeito de LFL decorrente da irradiação interpulsos. Os autores concluíram que em taxas de repetição acima de 500 Hz, a eficiência da fragmentação é constante, porque o movimento de nanopartículas é insignificante com relação a intervalos de tempo tão curtos entre pulsos. No entanto, esse estudo não foi estendido para frequências na ordem de grandeza de kHz, como empregados no sistema a laser utilizado nesse trabalho.

Nas condições aqui avaliadas, além do efeito de LFL, a alta frequência leva também à uma alta sobreposição de pulsos, onde o pulso subsequente atinge o plasma e a bolha de cavitação anterior, elevando a temperatura e caracterizando um processo de múltiplos pulsos.

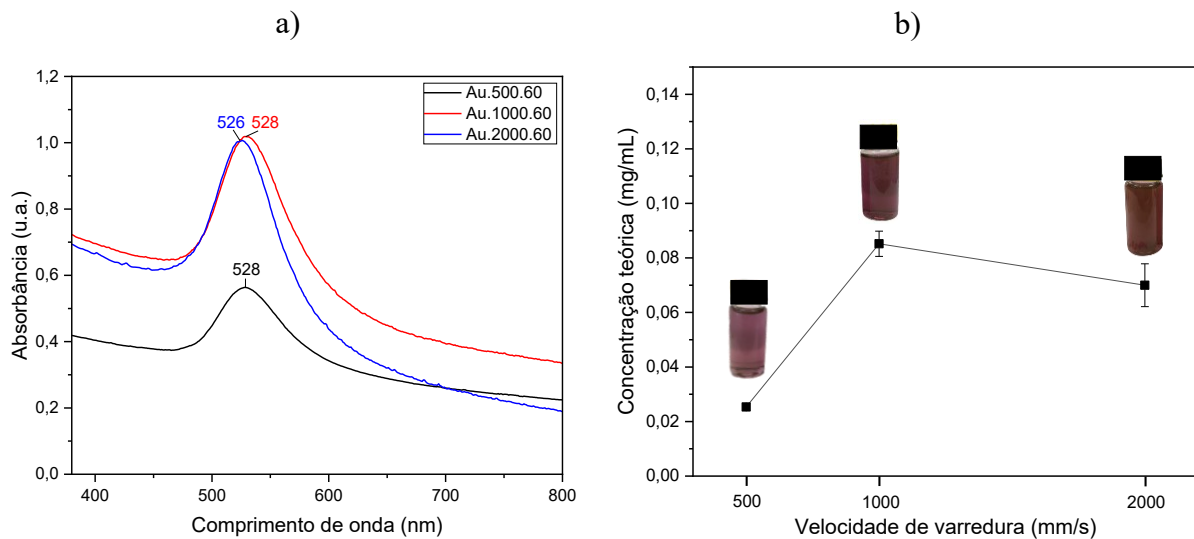
A abordagem de pulsos múltiplos para controle de tamanho de partícula de AuNPs foi utilizada pela primeira vez por Yu *et al.* (2017), citada anteriormente na revisão desse trabalho. Nessa situação, os autores apontaram que uma condição de sobreposição de pulsos pode ocasionar uma diferente dinâmica na formação das AuNPs, onde os materiais dispersos na pluma são atomizados e homogeneizados por pulsos subsequentes antes da nucleação e, conseqüentemente, NPs monodispersas e com menor tamanho médio podem ser obtidas. Em decorrência desses dois efeitos, os resultados desse trabalho apontaram que um regime de alta frequência e alta sobreposição de pulsos pode ser uma forma eficiente de reduzir a polidispersividade do coloide produzido. No entanto, essas condições levaram a uma redução da concentração, de modo que um equilíbrio deve ser encontrado entre a quantidade (produtividade e concentração) e qualidade (distribuições de tamanho estreitas) das AuNPs

produzidas por LAL. Dessa forma, com base da desejabilidade global, definiu-se o conjunto de parâmetros mais apropriado para os testes subsequentes: 4 ns, 1500 kHz e 50 W.

#### 4.1.3 Análise da influência de parâmetros extrínsecos do laser

A velocidade na qual o feixe de laser percorre o caminho projetado no alvo influencia na distância entre pulsos juntamente com a frequência. Dessa forma, uma velocidade maior garante mais espaçamento entre pulsos e, conseqüentemente, um número maior de ciclos, i.e., o laser percorre o caminho mais vezes. No entanto, a velocidade de varredura não altera a quantidade total de pulsos dentro de um determinado tempo de processo. A Figura 21a apresenta o espectro de absorção de dispersões produzidas em diferentes velocidades (500, 1000 e 2000 mm/s) com um tempo total de processo de 60 s. Na Figura 21b observa-se a influência da velocidade na concentração teórica dos coloides obtidos.

Figura 21 – a) Espectro de absorção UV-Vis das dispersões produzidas em diferentes velocidades de varredura do laser e b) Influência da velocidade de varredura na concentração das dispersões obtidas (resultados de produção em triplicata).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A absorção em 380 nm e a concentração teórica indicam que ao reduzir a velocidade para 500 mm/s tem-se uma significativa redução da concentração de partículas. Já nas velocidades de 1000 e 2000 mm/s não foi observada uma diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).



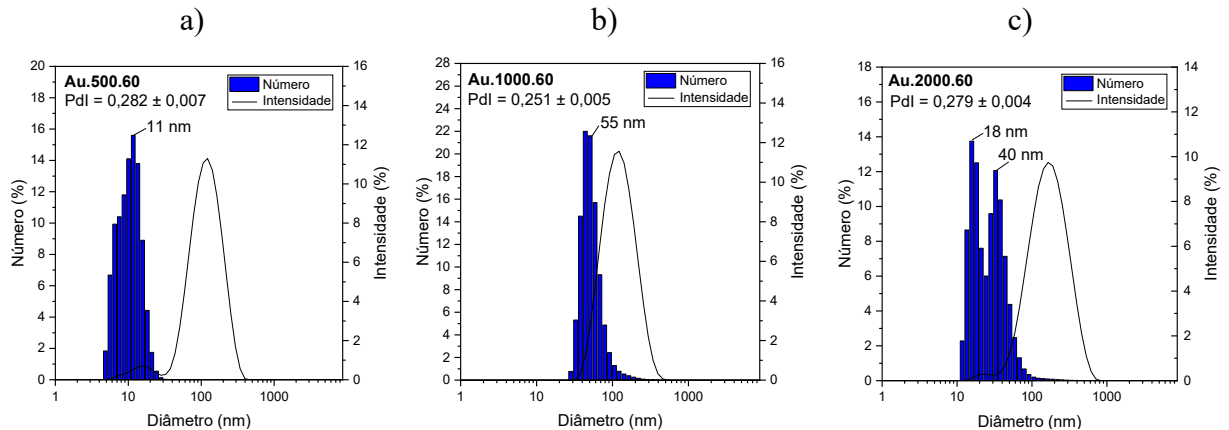
Nas três velocidades testadas, a sobreposição de pulsos é bastante alta, sendo levemente menor à medida que a velocidade aumenta de 500 até 2000 mm/s (99,3%, 98,6% e 97,2%, respectivamente). Como a diferença é bastante pequena, dificilmente a sobreposição seria a única responsável pelo aumento da geração de partículas observado com a utilização das velocidades maiores. No entanto, a velocidade determina um outro aspecto importante do processo, a quantidade de ciclos, i.e., quantas vezes o laser percorre o caminho projetado no alvo. Como o desenho projetado no alvo é o mesmo para todos os experimentos, a distância percorrida em cada ciclo também é a mesma. Sabendo que a velocidade é diretamente proporcional à distância total percorrida, ao dobrar a velocidade, dobra-se a quantidade de ciclos. Dessa forma, quando o laser se movimenta de maneira mais rápida sobre o alvo, maior a área total ablacionada em um mesmo intervalo de tempo bem como, maior a probabilidade de as partículas geradas serem atingidas pelo feixe laser novamente (FACHIN, 2020).

O aumento da concentração das partículas com o aumento da velocidade de 500 mm/s para 1000 mm/s, indica que a maior quantidade de passagens do laser impactou de maneira significativa a taxa de remoção de partículas do alvo. Ao aumentar de 1000 mm/s para 2000 mm/s esse mesmo efeito não foi observado, podendo ser um indicativo de que o efeito de absorção de energia pelas partículas formadas se torna mais pronunciado. Essa hipótese é apoiada ao observar o estreitamento do pico SPR da dispersão produzida com velocidade de 2000 mm/s, que indica a obtenção de um coloide mais monodisperso, assim como pela coloração mais avermelhada da dispersão, indicando a predominância de partículas com diâmetro inferior a 100 nm. Para melhor avaliar esse efeito, as dispersões foram analisadas por DLS e a Figura 22 apresenta as distribuições de tamanho de partícula obtidas.

As distribuições apontam que ao utilizar a velocidade de 500 mm/s, apesar da baixa concentração, partículas menores foram obtidas, possivelmente decorrente de um efeito de pulsos múltiplos pronunciado, onde pulsos subsequentes atomizam materiais presentes na pluma de plasma e/ou bolha de cavitação anterior, levando a homogeneização e redução de tamanho de partícula. Aumentando a velocidade para 1000 mm/s, esse efeito é minimizado e além de uma concentração mais elevada, maiores partículas são obtidas. Ao aumentar a velocidade de 1000 mm/s para 2000 mm/s foi observada a formação de uma nova população de partículas com diâmetro médio de  $18 \pm 4$  nm. Os resultados tratados pelo software Zetasizer indicaram que 48% da população possui diâmetro médio de 18 nm, enquanto os outros 52% apresentam diâmetro médio de 40 nm. Apesar da análise ter indicado a presença de duas populações de tamanho de partícula, os diâmetros médio e máximo foram reduzidos,

enquanto a concentração não apresentou alteração significativa, corroborando com a hipótese de predominância do efeito de fragmentação das partículas pela absorção do laser.

Figura 22 – Curvas de distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento (linha preta) e por número (barras azuis) obtidas por DLS de dispersões produzidas em diferentes velocidades de varredura do laser: a) 500, b) 1000 e c) 2000 mm/s.

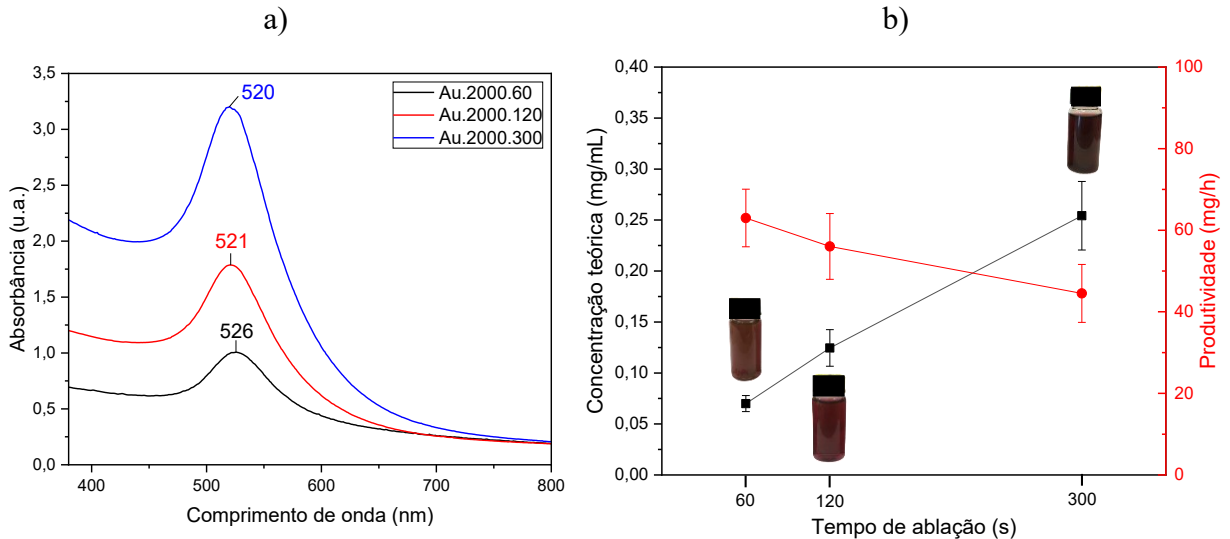


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Sabe-se que esse efeito de LFL afeta diretamente a produtividade do processo pois reduz a energia que chega ao alvo, de modo que a taxa de ablação e, consequentemente, a produtividade, diminui continuamente com o tempo, mas, competitivamente, partículas menores e mais monodispersas podem ser obtidas. Dessa forma, o tempo total do processo de ablação afeta características importantes da dispersão, como tamanho de partícula, polidispersividade e concentração. A Figura 23a apresenta o espectro de absorção de dispersões produzidas por diferentes tempos, 60, 120 e 300 s com a velocidade fixada de 2000 mm/s (onde o efeito de LFL se mostrou presente). Na Figura 23b, observa-se a influência do tempo de ablação na concentração das dispersões obtidas e na produtividade do processo.

As curvas de absorção da luz visível indicaram uma redução do comprimento de onda do pico SPR, de 526 para 521 e 520 nm para as amostras produzidas em 120 e 300 s, respectivamente. Essa redução é um indicativo de uma diminuição do tamanho de partícula, conforme estabelece as equações propostas por Haiss *et al.* (2007) abordadas anteriormente nesse trabalho. Observa-se também um pico SPR mais estreito, considerando a largura a meia altura do pico, o que é um indicativo positivo que uma redução da polidispersividade, levando a formação de coloides mais monodispersos. O aumento da absorção em 380 nm já indica que maiores concentrações de AuNPs foram obtidas conforme aumenta-se o tempo do processo.

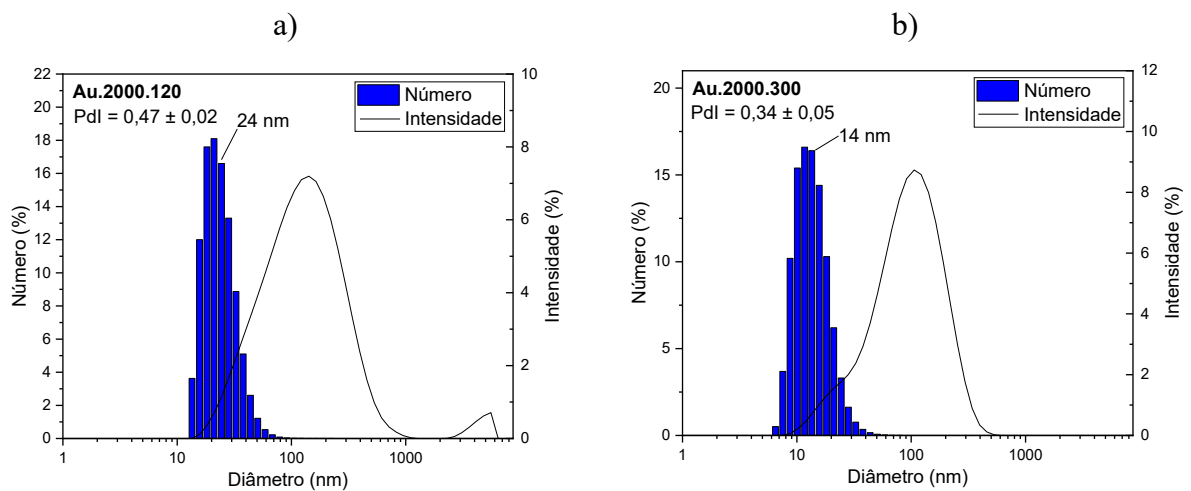
Figura 23 – a) Espectro de absorção UV-Vis das dispersões produzidas em diferentes tempos de processo (60, 120 e 300 s) e b) Influência do tempo do processo na concentração das dispersões obtidas (resultados de produção em triplicata).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na Figura 23b, o efeito do aumento da concentração teórica de AuNPs em função do tempo se torna bem evidente. No entanto, uma redução de produtividade do processo foi observada, indicando a ocorrência do efeito de absorção da energia do laser pelas partículas. Para entender a influência desse efeito no diâmetro das partículas, as dispersões foram analisadas por DLS, e os resultados estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Curvas de distribuição de tamanho de partícula por intensidade (linha preta) e por número (barras azuis) obtidas por DLS de dispersões produzidas em a) 120 e b) 300 s.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A distribuição de tamanho de partícula obtida por DLS comprova uma redução do diâmetro da partícula com o aumento do tempo e, portanto, evidencia a predominância do processo de LFL nas condições de processamento aqui empregadas. Essa observação vai ao encontro da redução da produtividade citada anteriormente, uma vez que, conforme a concentração de NPs na dispersão aumenta, maior é o percentual da energia do laser absorvido pelas NPs e utilizado para o processo de fragmentação.

Dessa forma, com base nos resultados alcançados até aqui, concluiu-se que as amostras produzidas com a velocidade de 2000 mm/s e nos tempos de 120 e 300 s apresentaram as características mais promissoras para viabilização do processo de LAL para produção de AuNPs utilizando a máquina a laser disponível para execução desse trabalho. Apesar da queda da produtividade com o aumento do tempo do processo, dispersões mais concentradas puderam ser obtidas o que otimiza o tempo total de preparação para produção e ocupação da máquina. Além disso, o espectro de absorção dessas amostras indica a presença de partículas menores (pico SPR em menor comprimento de onda) e mais uniformes (menor largura a meia altura do pico SPR). Esse resultado é um forte indicativo de uma distribuição mais estreita de tamanho de partícula.

Apesar dos resultados de distribuição por número obtidos por DLS elucidarem a redução de tamanho de partícula das amostras produzidas em 120 e 300 s com relação às amostras produzidas em 60 s, maiores valores de PDI foram observados, devido à identificação de partículas e/ou aglomerados significativamente grandes que influenciaram na distribuição por intensidade. Sabe-se que a técnica de DLS mede o diâmetro hidrodinâmico das partículas com base na movimentação browniana. Dessa forma, a técnica nem sempre é capaz de discriminar partículas em contato próximo, logo, o diâmetro reportado pode ser influenciado pela leitura de aglomerados. Portanto, para melhor entender esses efeitos, essas nanopartículas foram selecionadas para uma caracterização físico-química mais aprofundada.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS OTIMIZADAS

### 4.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

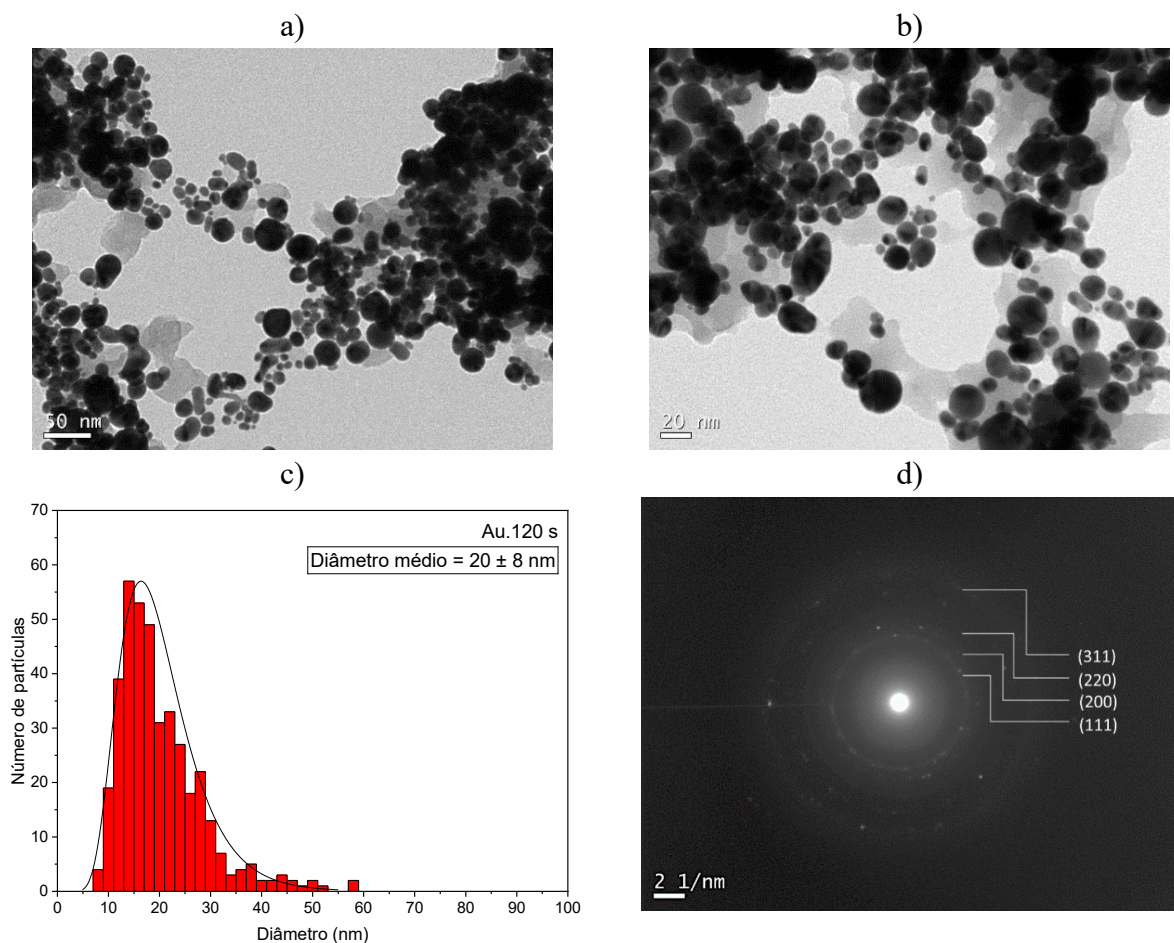
A morfologia e a distribuição de tamanho das AuNPs produzidas em 120 e 300 s foram analisadas por TEM. As Figuras 25 e 26 mostram a morfologia das AuNPs acompanhadas do histograma de distribuição de tamanho correspondente a análise de 400

partículas, bem como do padrão de difração obtido por SAED onde pode-se observar a cristalinidade das AuNPs.

De modo geral, as NPs produzidas em água deionizada por 120 segundos apresentam morfologia esférica com um tamanho médio de  $20 \pm 8$  nm, mas também existem algumas formas irregulares e aglomeradas. Aumentando o tempo do processo para 300 segundos, confirma-se uma redução do tamanho das partículas e uma distribuição de tamanho mais estreita, com um diâmetro médio de  $15 \pm 5$  nm.

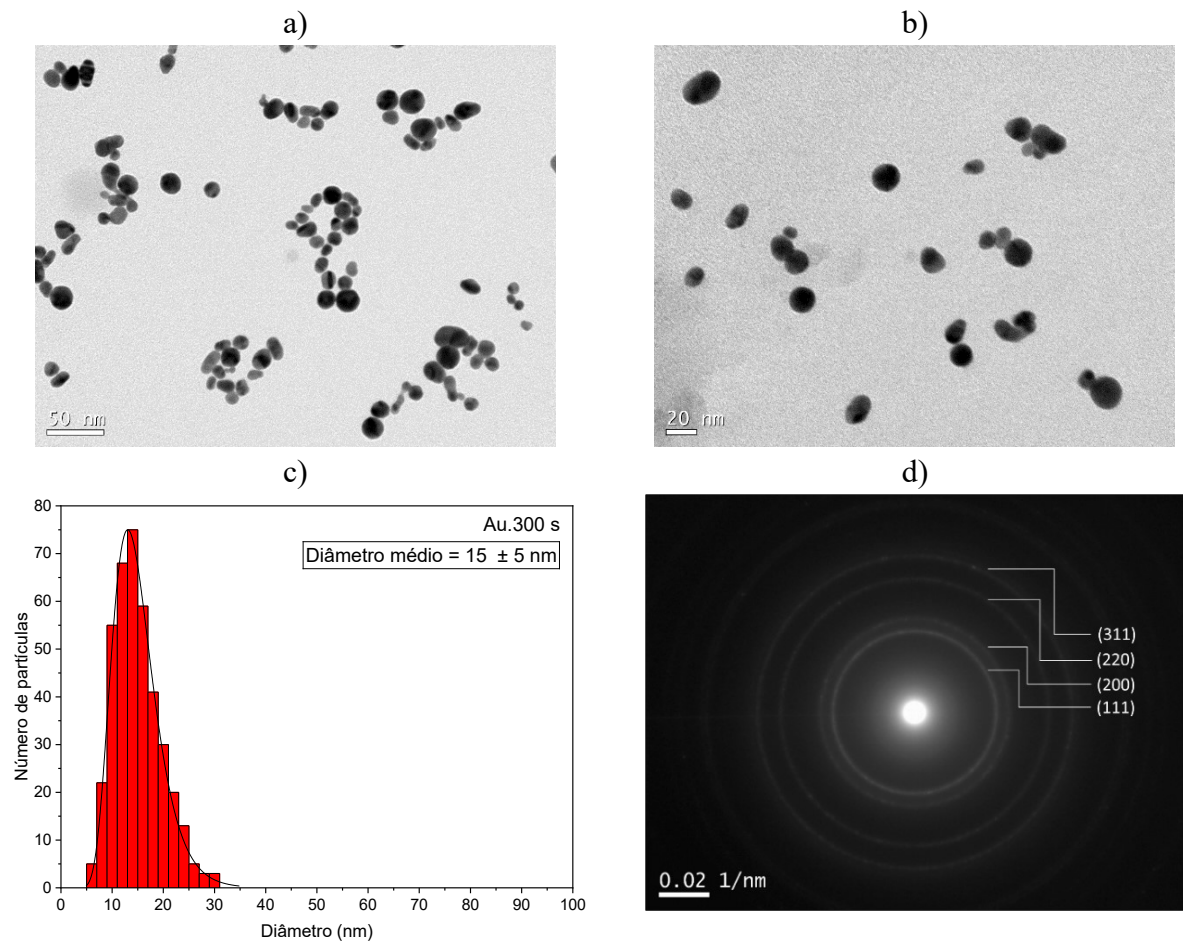
As amostras analisadas se mostraram altamente cristalinas, com os padrões de difração de SAED condizentes para o ouro metálico. Nas Figuras 25d e 26d estão indicados os planos (111), (200), (220) e (311) correspondentes aos anéis circulares característicos da estrutura cúbica de face centrada do ouro (SIERRA *et al.*, 2016).

Figura 25 – a) e b) Micrografias obtidas por TEM; c) histograma de distribuição do tamanho; e d) Padrão de difração obtido por SAED das AuNPs produzidas em 120 s.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

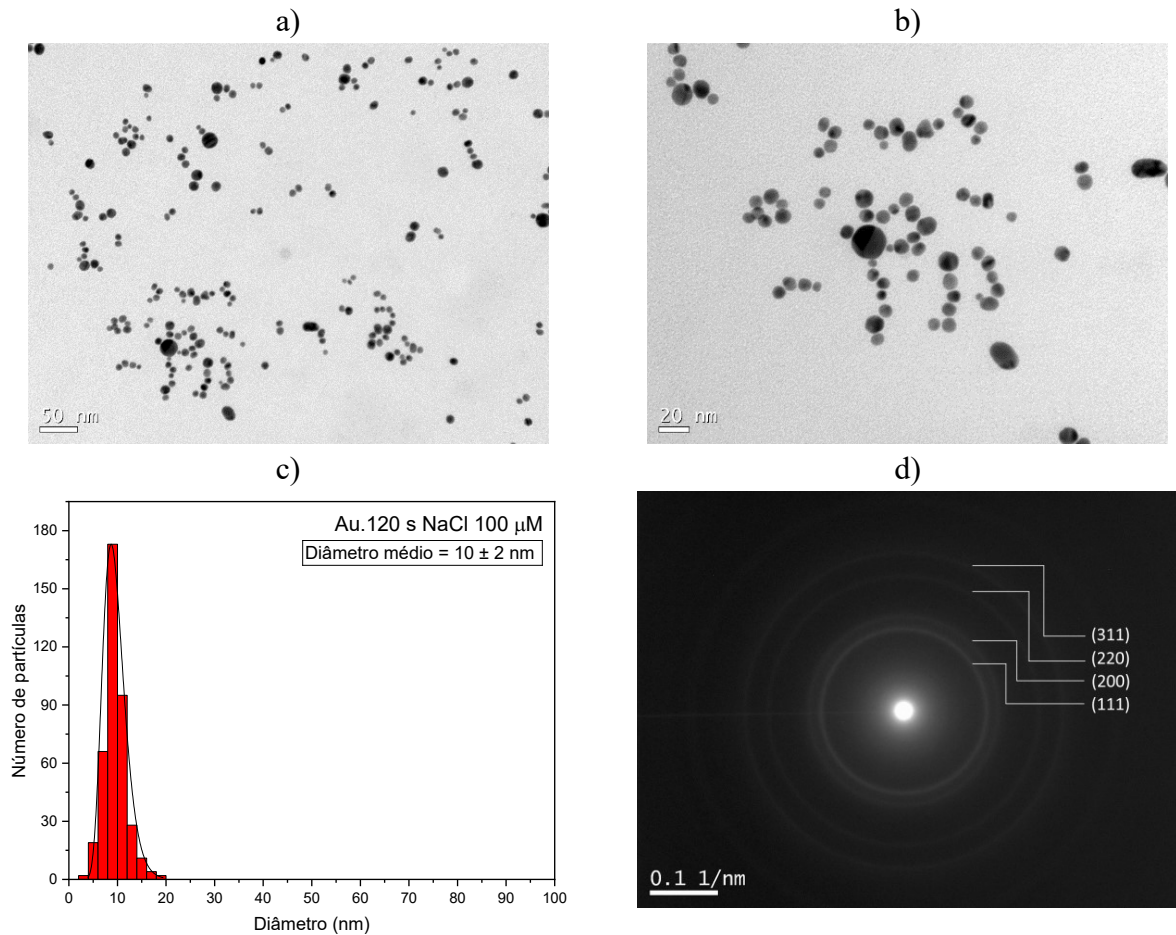
Figura 26 – a) e b) Micrografias obtidas por TEM; c) histograma de distribuição do tamanho; e d) padrão de difração obtido por SAED das AuNPs produzidas em 300 s.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Com o objetivo de reduzir ainda mais o tamanho de partícula, foi avaliada a influência de íons  $\text{Na}^+$  no meio líquido da ablação. Dessa forma, o mesmo processo de LAL em 120 s foi realizado em uma solução aquosa contendo  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{NaCl}$ . O  $\text{NaCl}$  foi escolhido como um aditivo redutor de tamanho de partículas devido seu baixo custo, alta disponibilidade e compatibilidade biológica. A amostra foi nomeada como Au.120 s  $\text{NaCl}$   $100\mu\text{M}$ . A Figura 27 apresenta a morfologia, distribuição de tamanho e o padrão de difração obtido a partir de SAED das AuNPs partículas produzidas. A análise comprova que um efeito de redução de tamanho e de distribuição de tamanho de partículas foi obtido quando comparado as partículas produzidas em água deionizada na ausência do sal, pelo mesmo tempo de processo, alcançando um diâmetro médio de  $10 \pm 2$  nm. Assim como nas amostras anteriores, o padrão de difração indica a obtenção de AuNPs altamente cristalinas.

Figura 27 – a) e b) Micrografias obtidas por TEM; c) histograma de distribuição do tamanho; e d) padrão de difração obtido por SAED das AuNPs produzidas em 120 s na solução aquosa de 100  $\mu\text{M}$  de NaCl.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

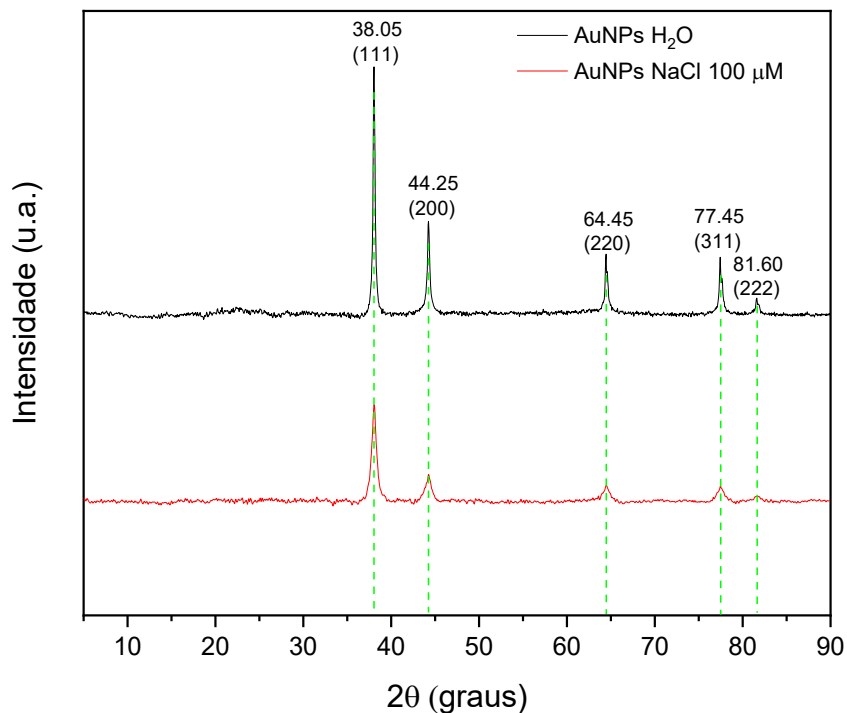
Esse efeito é devido à capacidade do NaCl de reduzir o tamanho das nanopartículas já dentro da fase gasosa da bolha de cavitação. Por meio de análises pontuais de espalhamento de raios X de pequeno ângulo (SAXS) no interior das bolhas de cavitação, Letzel *et al.* (2017) concluíram que a interação nanopartícula-íon começa nos primeiros microssegundos após o impacto do laser no alvo de metal e a redução de tamanho por íons durante o processo de LAL é baseada em uma reação de fase gasosa dentro da bolha de cavitação. Entende-se que os íons estabilizadores penetram a bolha de cavitação e afetam a formação de partículas recém-formadas uma vez que entregam cargas superficiais adicionais às partículas e, portanto, reduzem o grau de aglomeração, permitindo a produção de uma fração maior de nanopartículas estáveis (LETZEL *et al.*, 2017). Ou seja, o volume de ouro ejetado da

superfície forma uma maior quantidade de núcleos para geração de NPs e, conseqüentemente, um menor crescimento destas é observado.

#### 4.2.2 Difração de Raios X

As AuNPs produzidas em água deionizada e na solução de NaCl 100  $\mu\text{M}$  foram caracterizadas por difração de raios X (XRD) para verificar se houve a formação de alguma outra estrutura na dispersão devido a presença do sal. A Figura 28 apresenta os difratogramas obtidos, onde observa-se os cinco picos correspondentes às reflexões de Bragg atribuídas aos planos hkl (111), (200), (220), (311) e (222) da rede cristalina cúbica de face centrada.

Figura 28 – Difratograma de raios X das AuNPs produzidas apenas em H<sub>2</sub>O e na solução contendo 100  $\mu\text{M}$  de NaCl.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Os picos de difração estão localizados em posições consistentes com as esperadas para o ouro metálico, conforme indicado pelo Powder Diffraction File™ (PDF®) 00-004-0784. Esta indicação comprova que nenhuma outra estrutura cristalina foi formada e sugere que as AuNPs produzidas por LAL não estão oxidadas (BARRY *et al.*, 2014). Além disso, a



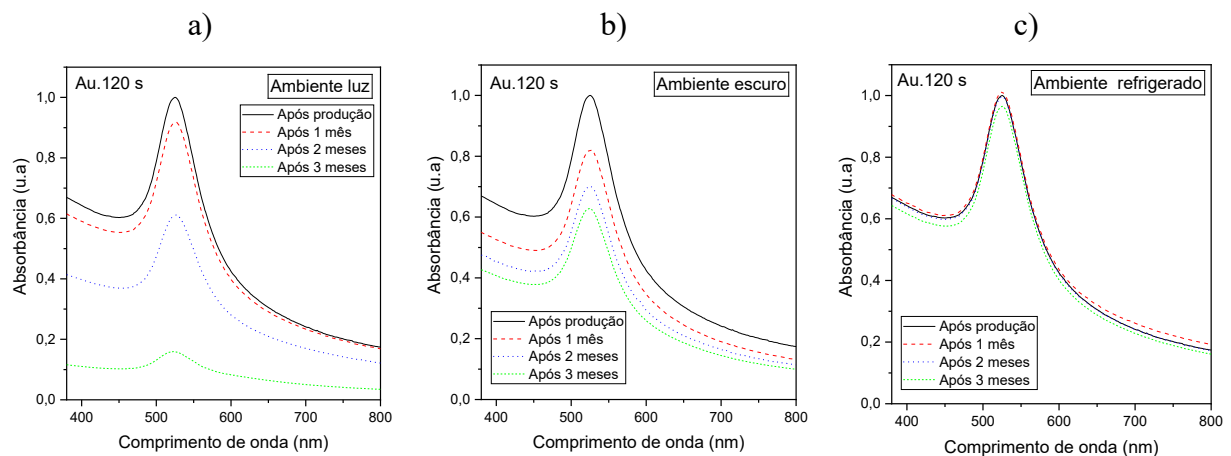
maior intensidade observada no plano (111) indica uma orientação de crescimento preferencial nesse plano conforme observado também pelas análises de SAED.

#### 4.2.3 Estabilidade dos coloides

As Figuras 29, 30 e 31 apresentam um estudo de estabilidade das dispersões com relação a sua durabilidade por meio do acompanhamento do espectro de absorção (absorbância normalizada com relação ao espectro após produção) por 3 meses em três diferentes condições de armazenamento. Observa-se que a condição refrigerada e na ausência de luz se mostrou a melhor condição para armazenamento das AuNPs produzidas por LAL, de modo que os espectros apresentaram nenhuma ou insignificante alteração com o tempo, mantendo a estabilidade do pico de SPR. Esta maior durabilidade está possivelmente relacionada a uma diminuição do efeito do movimento browniano das partículas nessa condição avaliada.

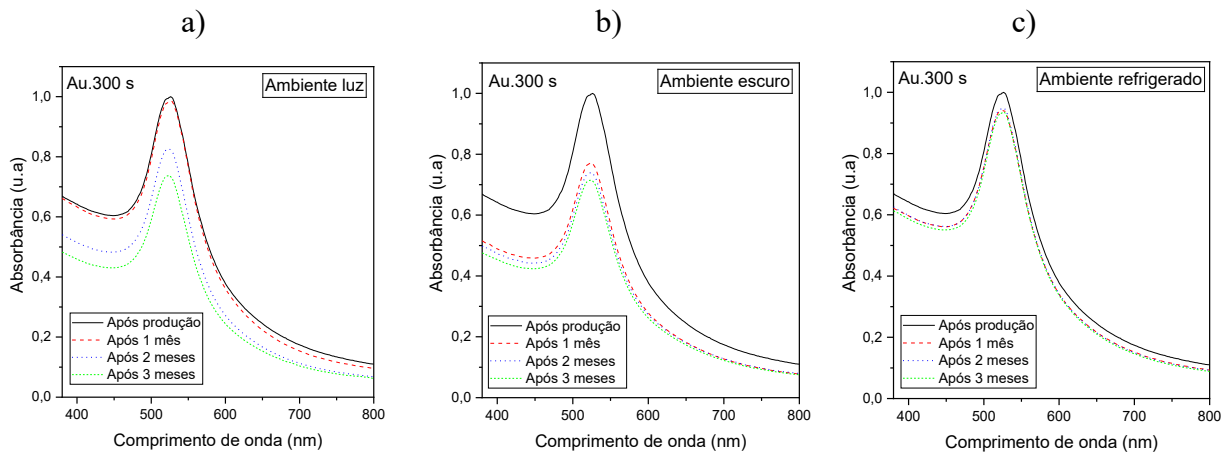
A adição de uma concentração micromolar (100  $\mu\text{M}$ ) de NaCl resultou em uma melhor estabilidade dos coloides com o tempo em todas as condições avaliadas, comprovando que a concentração empregada foi ideal para promover estabilização eletrostática das AuNPs, além de promover o efeito de redução de tamanho anteriormente discutido.

Figura 29 – Espectros de absorção obtidos para estudo de estabilidade a longo prazo da dispersão de AuNPs produzida em água deionizada por 120 s a) sob incidência de luz à temperatura ambiente, b) na ausência de luz à temperatura ambiente e c) na ausência de luz e refrigeradas a aprox. 4 °C.



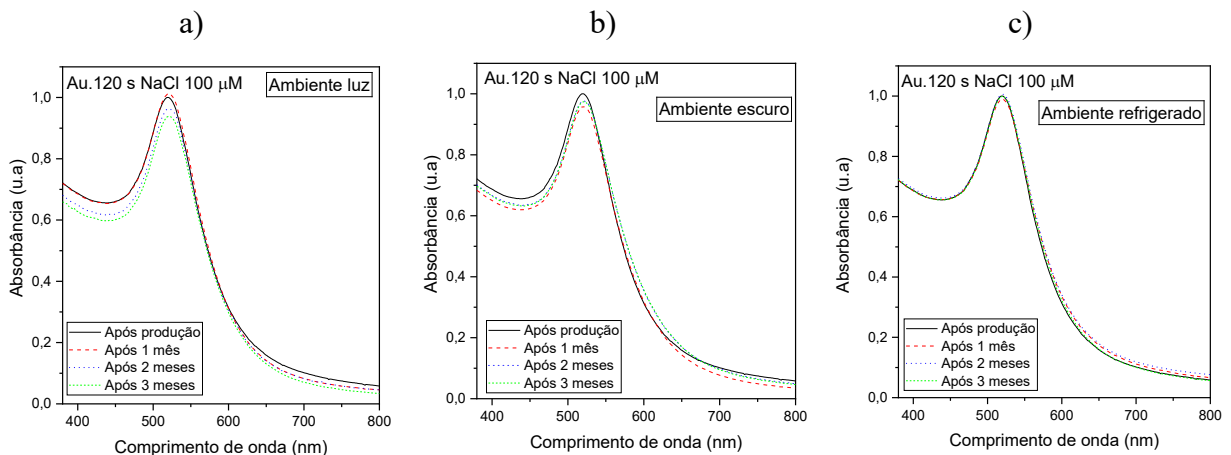
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Figura 30 – Espectros de absorção obtidos para estudo de estabilidade a longo prazo da dispersão de AuNPs produzida em água deionizada por 300 s a) sob incidência de luz à temperatura ambiente, b) na ausência de luz à temperatura ambiente e c) na ausência de luz e refrigeradas a aprox. 4 °C.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Figura 31 – Espectros de absorção obtidos para estudo de estabilidade a longo prazo da dispersão de AuNPs produzida na solução aquosa de 100  $\mu\text{M}$  de NaCl por 120 s a) sob incidência de luz à temperatura ambiente, b) na ausência de luz à temperatura ambiente e c) na ausência de luz e refrigeradas a aprox. 4 °C.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Em dispersões coloidais estabilizadas eletrostaticamente, as partículas com superfícies carregadas são rodeadas por íons. Íons com carga igual são repelidos devido à força de Coulomb, enquanto íons com carga oposta são atraídos (HEINRICH; GOMES, 2014). Dessa forma, pela atração das cargas, os contra-íons se ajustam muito próximos à

superfície das partículas e uma dupla camada elétrica difusa é formada, onde um gradiente de concentração de contra-íons é observado à medida que se distancia da superfície da partícula. Essa carga é responsável pelo princípio de estabilização eletrostática das partículas, observado nas amostras produzidas nesse trabalho, onde uma repulsão entre as partículas mantém as mesmas afastadas.

Nessas condições, ao modificar a concentração ou a valência dos contra-íons, por exemplo, a espessura da dupla camada elétrica pode ser variada, influenciando na estabilização das NPs (HEINRICH; GOMES, 2014). Em água deionizada, as partículas formadas com superfície parcialmente oxidada, sofrem uma hidroxilação seguida de uma perda de prótons que resulta em uma superfície  $\text{Au-O}^-$  (SYLVESTRE *et al.*, 2004). Dessa forma, as cargas negativas formadoras da dupla camada elétrica, são responsáveis pela estabilização observada nas amostras Au.120 e Au.300, produzidas apenas em água.

Ao adicionar NaCl, a superfície parcialmente oxidada reage de forma eficiente com íons  $\text{Cl}^-$  disponíveis no meio. Essa reação, além de limitar o crescimento das partículas, favorece a repulsão eletrostática, aumentando a carga negativa responsável pela estabilização. Essa melhora da estabilidade a longo prazo observada para a amostra Au.120 s NaCl 100 $\mu\text{M}$  contraria alguns resultados reportados na literatura, onde uma maior tendência à desestabilização foi observada na presença de NaCl, quando comparado à ablação realizada apenas em água (BAE; NAM; PARK, 2002; PROCHÁZKA *et al.*, 1997; REHBOCK *et al.*, 2013).

Merk *et al.* (2014), no entanto, mostraram que a estabilização de AuNPs sem ligantes, utilizando íons, é dependente da concentração e do tipo de íon utilizado, sendo diretamente proporcional à polarizabilidade e inversamente proporcional à hidratação de ânions. Dessa forma, o  $\text{Cl}^-$  proporciona uma estabilização intermediária, enquanto  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$  proporcionam uma forte estabilização. No entanto, um menor diâmetro de partícula e uma distribuição de tamanho mais estreita foi obtida ao utilizar NaCl como aditivo no processo de LAL, quando comparado a NaBr e NaI, em mesma concentração (100  $\mu\text{M}$ ) (MERK *et al.*, 2014).

A estabilização coloidal citada pelos autores foi mensurada a partir do índice de partículas primárias (PPI – do inglês, *primary particle index*). Esse índice é utilizado para avaliar tendências de agregação das partículas, e é calculado a partir do espectro de absorção da dispersão, sendo a razão entre a absorção em 380 nm e em 800 nm. Dessa forma, quanto maior o valor do PPI, maior a estabilidade dos coloides, i.e., menor a presença de partículas

agregadas. Os autores monitoraram esse índice por 24h e não observaram nenhuma alteração para dispersões produzidas em soluções de NaCl de 3 até 100  $\mu\text{M}$ .

Todavia, para uma melhor compreensão da estabilidade dos coloides após a síntese, o acompanhamento da estabilidade a longo prazo deve ser realizado. Nesta dissertação, o PPI pode ser calculado após a síntese e após 3 meses, apresentando pouca variação, como mostra a Tabela 7, o que indica que uma boa estabilidade da dispersão foi atingida.

Tabela 7 – Valores de  $\zeta$  após produção e índice de partículas primárias (PPI) após a produção e após 3 meses das amostras armazenadas na ausência de luz e refrigeradas a aprox. 4 °C.

	$\zeta$ (mV)*	PPI após a produção	PPI após 3 meses
<b>Au.120 s</b>	- 32 $\pm$ 3	3,850	3,997
<b>Au.300 s</b>	- 32 $\pm$ 2	6,101	6,914
<b>Au.120 s NaCl 100<math>\mu\text{M}</math></b>	- 40 $\pm$ 1	12,368	12,897

\*Média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

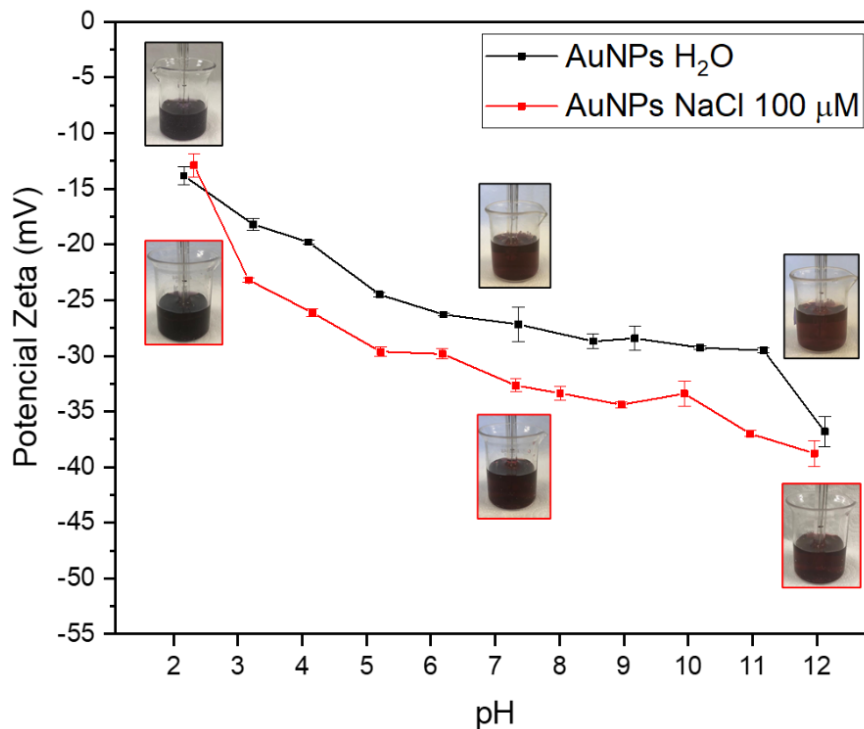
Nota-se que o maior valor de PPI foi obtido para a amostra estabilizada com íons  $\text{Cl}^-$ , como esperado pela observação dos espectros de absorção. O valor obtido se mostrou muito próximo do valor inicial reportado por Merk *et al.* (2014) para NaCl 100  $\mu\text{M}$  (~10-12) e um pequeno aumento foi observado após 3 meses, o que indica que não houve a formação de agregados com o tempo.

Essa observação também vai de encontro dos valores de potencial zeta das dispersões logo após as sínteses, reportados na Tabela 7, onde a amostra Au.120 s NaCl 100 $\mu\text{M}$  apresentou um maior valor em módulo. Portanto, conclui-se que, nas condições utilizadas nesse trabalho, ocorre uma acumulação ou adsorção específica dos ânions  $\text{Cl}^-$  na superfície das AuNPs que entregam cargas adicionais que contribuem para a estabilização eletrostática da dispersão, aumentando a carga eletrocinética superficial.

O potencial zeta da partícula também sofre influência do pH do meio. Portanto, a estabilidade das dispersões em diferentes valores de pH é um importante aspecto para definição de condições de aplicação das nanopartículas. Em alguns sistemas de diagnóstico, a estabilidade das AuNPs frente a variações de pH é explorada como método sensorial, onde um resultado qualitativo é obtido a partir de alterações de cor advindas da aglomeração das nanopartículas em certas condições (ZHU; XUE; WANG, 2008). Portanto, determinar o ponto isoelétrico das AuNPs é crucial para compreender condições de desestabilização da

dispersão. A Figura 32 apresenta a curva do potencial zeta em função do pH para as AuNPs produzidas por 120 s em água deionizada e na solução de NaCl 100  $\mu\text{M}$ . As amostras de partida possuíam pH em torno de 7-7,5. Os valores do potencial zeta são um pouco menores (em módulo) do que aqueles apresentados na Tabela 7, pois esta análise foi realizada 5 meses após a produção das AuNPs.

Figura 32 – Potencial zeta em função do pH da dispersão para as AuNPs produzidas em água deionizada e na solução de NaCl 100  $\mu\text{M}$  por 120 s.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Como já citado anteriormente, consideram-se estáveis os coloides que mostram um valor de potencial zeta fora do intervalo de -25 a +25 mV, e uma forte aglomeração ocorre quando o potencial zeta aproxima-se ao ponto de carga zero, onde a atração entre nanopartículas excede as forças de repulsão (IVANOV, 2011). As AuNPs produzidas na presença de NaCl mostraram-se mais estáveis em praticamente todo o intervalo de pH avaliado (com exceção do pH 2, onde uma desestabilização total foi observada para ambas as amostras). Os resultados apontaram que, aproximadamente, abaixo do pH 5 inicia-se um processo de desestabilização das forças repulsivas e uma aglomeração das NPs é evidenciada pela alteração da cor de vermelho escuro para roxo/azul. Por outro lado, em meio básico, as

amostras apresentaram-se estáveis e um aumento da carga negativa da superfície foi observado, possivelmente atribuído à adsorção de íons  $\text{OH}^-$  advindos da base adicionada na titulação (NaOH).

#### 4.2.4 Reprodutibilidade e Produtividade do processo

Com o objetivo de melhor avaliar a reprodutibilidade do processo, novos lotes das partículas otimizadas foram produzidos e caracterizados seguindo o mesmo procedimento experimental para cada grupo de amostras. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos por meio de análises de UV-Vis, DLS e cálculo da concentração teórica como média e desvio padrão. Os resultados foram comparados através da Análise de Variância One-WAY (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ .

Tabela 8 – Reprodutibilidade do processo considerando resultados de análises de UV-Vis, DLS e concentração teórica de diferentes lotes de produção das AuNPs nos parâmetros otimizados (Au.120 s, Au.300 s e Au.120 s NaCl 100  $\mu\text{M}$ ).

	SPR (nm)	Diâmetro médio (nm)	PdI	$\zeta$ (mV)	Concentra- ção teórica (mg/mL)
<b>Au.120 s*</b>	521 $\pm$ 1	21 $\pm$ 7	0,42 $\pm$ 0,04	-35 $\pm$ 6	0,12 $\pm$ 0,02
<b>Au.300 s*</b>	522 $\pm$ 3	17 $\pm$ 9	0,4 $\pm$ 0,1	-36 $\pm$ 6	0,25 $\pm$ 0,03
<b>Au.120 s NaCl 100 <math>\mu\text{M}</math>**</b>	520 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2	0,32 $\pm$ 0,03	-41 $\pm$ 5	0,16 $\pm$ 0,02

\*Média  $\pm$  desvio padrão de n=10; \*\* Média  $\pm$  desvio padrão de n=5;

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Todas as amostras apresentaram boa reprodutibilidade com relação ao pico de SPR. Todos os resultados ficaram em torno de 520 nm, como esperado para AuNPs na faixa de tamanho de partícula obtida, portanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre as amostras. O diâmetro médio das partículas obtido por DLS apresentou alta variabilidade para as amostras Au.120 s e Au.300 s, i.e., aquelas produzidas apenas em água. Devido essa alta variabilidade, não foi possível observar uma diferença significativa entre os valores de diâmetro. Assim como o diâmetro, o PdI também é obtido por DLS, e nesse caso observa-se uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) para amostras produzidas na presença de NaCl, como

esperado. Já os valores de potencial zeta não apresentaram diferença significativa entre as amostras, estando todas as médias acima de 35 mV em módulo, indicando uma boa estabilidade eletrostática. Por fim, analisando a concentração teórica, as amostras produzidas em 120 s, tanto em água quanto na presença de NaCl, não apresentaram diferença significativa, somente quando comparadas com as amostras produzidas por 300 s, onde a concentração de AuNPs quase dobrou.

Analisando os valores de desvio padrão, observa-se que a reprodutibilidade do processo se mostrou promissora com relação aos aspectos relacionados ao espectro UV-vis de absorção e concentração. O potencial zeta se mostrou razoavelmente reprodutível, no entanto, os parâmetros obtidos por DLS como diâmetro de partícula e PDI apontaram uma variabilidade maior entre lotes.

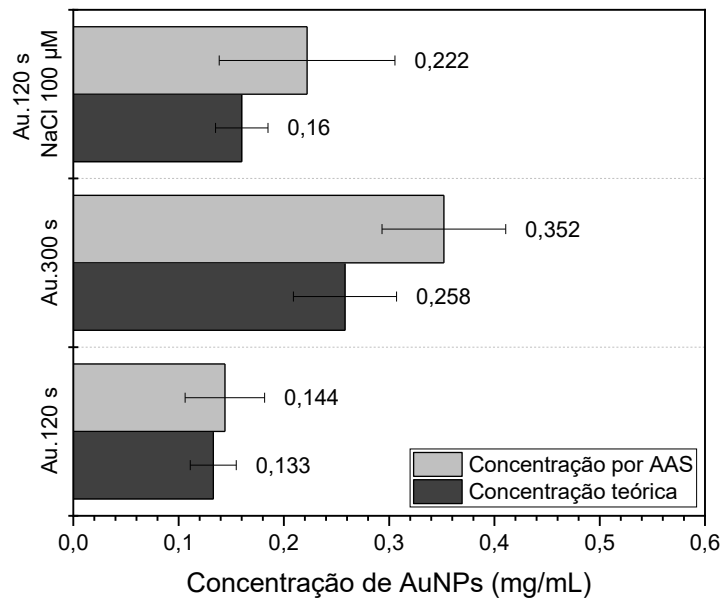
As principais fontes de variação podem estar relacionadas à própria complexidade mecanismo de síntese, principalmente por envolver altas temperaturas no plasma e agitação do meio líquido que pode gerar alterações na espessura de líquido acima do alvo, afetando diretamente a energia que chega no mesmo. Além disso, a instabilidade do sistema laser e a falta de monitoramento contínuo das condições reais da energia do feixe geram certa incerteza nos parâmetros de entrada. No entanto, a análise de DLS por si só pode apresentar certa variabilidade entre as medidas, devido à alta sensibilidade da análise com relação ao seu princípio de leitura. A ocorrência de qualquer sedimentação, a presença de impurezas do ambiente, como partículas do ar, e amostras mais polidispersas tendem a afetar a leitura, aumentando os erros na análise.

De modo geral, a análise da reprodutibilidade do processo considerando a variabilidade de diferentes lotes de produção, apontou que a adição de NaCl resultou em amostras mais reprodutíveis fornecendo dados mais consistentes e um menor desvio padrão entre as amostras. Observa-se também que os resultados de DLS ( $18 \pm 2$  nm) indicaram um diâmetro de partícula maior do que aquele observado anteriormente por TEM ( $10 \pm 2$  nm). Essa diferença pode estar associada à presença dos íons  $\text{Cl}^-$  ao redor da partícula, que proporcionam um aumento do diâmetro hidrodinâmico da partícula, já que se movimentam no meio junto com a partícula. Alternativamente, pode estar relacionado à um problema de resolução técnica da análise, que não discrimina partículas em contato próximo, de modo que é muito comum observar maiores valores de diâmetro por DLS quando comparado a técnicas de microscopia (RESTREPO, 2015).

#### 4.2.4.1 Espectrometria de Absorção atômica

Para uma análise mais criteriosa da concentração de ouro nas dispersões produzidas, 5 amostras foram selecionadas para quantificação por meio de espectroscopia de absorção atômica (AAS). A Figura 33 apresenta os resultados da concentração em mg/mL comparados aos valores de concentração teórica calculados para as respectivas amostras analisadas. O valor médio da concentração é apresentado ao lado de cada barra.

Figura 33 – Gráfico da concentração das AuNPs obtida por AAS (barra cinza claro) *versus* concentração teórica (barra cinza escuro). n=5.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

De modo geral, a concentração experimental obtida por AAS se mostrou superior àquela teórica calculada com base na diferença de massa do alvo. Essa diferença pode estar associada à precisão da balança analítica utilizada ou ainda a possíveis efeitos de oxidação da superfície do alvo, levando a um ganho de massa. No entanto, a mesma tendência foi observada com os dois métodos.

Devido a maior precisão dos resultados obtidos por AAS, eles foram utilizados para o cálculo da produtividade do processo considerando as três condições otimizadas. A produtividade alcançada para as amostras produzidas apenas em água por 120 s e 300 s foram próximas, sendo 64,8 mg/h e 63,3 mg/h, respectivamente. A amostra produzida na solução de NaCl alcançou uma maior produtividade, chegando a um valor de 99,9 mg/h.



Esse aumento da produtividade também foi observado por Prochazka *et al.* (1997) onde a presença de íons  $\text{Cl}^-$  no meio líquido ocasionou um aumento da eficiência do processo de ablação para produção de NPs de prata quando comparado ao processo realizado apenas em água. Considerando que o íon  $\text{Cl}^-$  age já dentro da fase gasosa da bolha de cavitação induzida pelo laser, ocorre uma interação com a massa de Au recém ablacionada que leva à formação e estabilização de uma maior quantidade de NPs em tamanhos menores (LETZEL *et al.*, 2017, 2019). Portanto, entende-se que a presença de NaCl acelera a formação de AuNPs, maximizando a quantidade de átomos de ouro liberados do alvo que são utilizados para a formação de NPs e, conseqüentemente, minimiza-se o efeito de deposição de partículas novamente na superfície do alvo durante o colapso da bolha de cavitação (DE GIACOMO *et al.*, 2013).

Comparando esses valores com as produtividades encontradas na literatura reportadas anteriormente na Tabela 1, conclui-se que os valores alcançados nesse trabalho se mostraram promissores, considerando o sistema a laser utilizado, i.e., uma máquina convencional de laser pulsado em nanosegundos economicamente mais acessível, como discutido anteriormente (seção 3.2.1). É importante ressaltar que nesse trabalho foram priorizados curtos tempos de processo, de modo a otimizar o tempo total de uso e ocupação do equipamento. Percebe-se que, na literatura, concentrações semelhantes de AuNPs foram alcançadas, porém é comum observar tempos de processamento muito maiores, de dezenas de minutos (BARRY *et al.*, 2014; KUCHERIK *et al.*, 2017; SOBHAN; WITHFORD; GOLDS, 2010; VINOD; JAYASREE; GOPCHANDRAN, 2017).

Entende-se que a produtividade desse método de fabricação de NPs é ainda uma barreira a ser superada. O processo de LAL tem grande potencial para se tornar mais econômico que as rotas químicas de síntese, no entanto, somente quando uma produtividade na ordem de g/h for atingida (JENDRZEJ *et al.*, 2017).

#### 4.3 APLICAÇÃO DAS AuNPs EM SENSORES ELETROQUÍMICOS

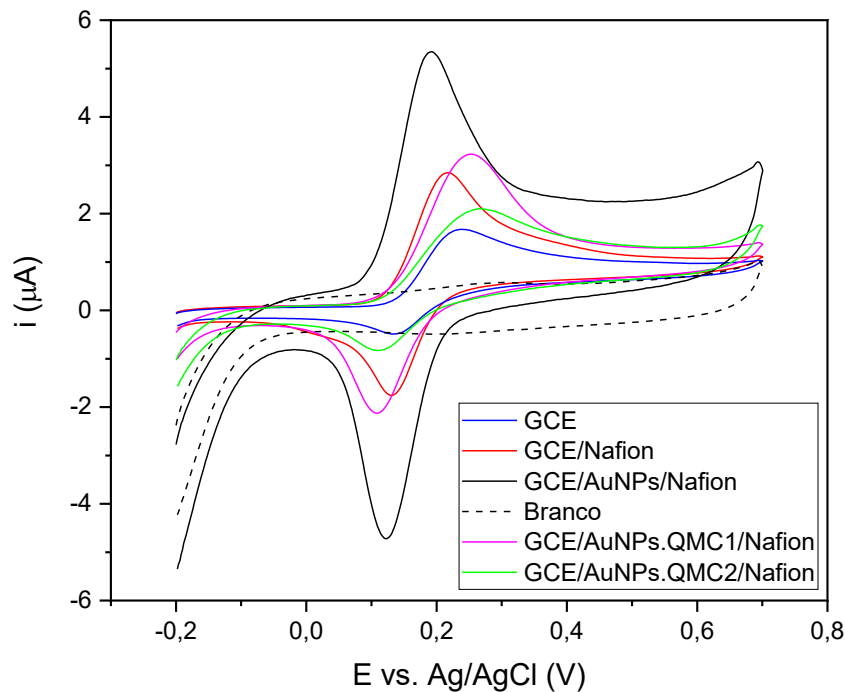
##### 4.3.1 Comportamento eletroquímico do sensor modificado com AuNPs

Devido a maior estabilidade, reprodutibilidade e menor tamanho de partícula, as AuNPs produzidas em solução aquosa de NaCl 100  $\mu\text{M}$  foram selecionadas para avaliação do seu potencial de aplicação em sensores eletroquímicos. Dessa forma, avaliou-se, pela primeira

vez, o desempenho de AuNPs produzidas por LAL estabilizadas com NaCl como agentes modificadores de eletrodos de carbono vítreo para determinação da dopamina.

A Figura 34 traz os voltamogramas cíclicos obtidos para a dopamina (DA) 70  $\mu\text{M}$  em eletrólito de suporte PBS 0,01 M (pH 7,4) utilizando o eletrodo de carbono vítreo sem modificação (GCE), e os modificados (GCE/Nafion, GCE/AuNPs/Nafion, GCE/AuNPs.QMC1/Nafion e GCE/AuNPs.QMC2/Nafion). A leitura do branco, i.e., na ausência de DA, relativo ao eletrodo modificado GCE/AuNPs/Nafion também é apresentada.

Figura 34 – a) Voltamogramas cíclicos para DA 70  $\mu\text{M}$  em solução tampão PBS 0,01 M (pH 7,4) para o GCE, GCE/Nafion, GCE/AuNPs/Nafion, GCE/AuNPs.QMC1/Nafion e GCE/AuNPs.QMC2/Nafion.  $v = 50 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para todos os eletrodos, os voltamogramas apresentam picos anódicos e catódicos relativos à oxidação quase-reversível da dopamina para dopamina quinona, a qual é reduzida na varredura reversa (CHUMILLAS *et al.*, 2013). O eletrodo sem modificação apresentou sinais característicos da dopamina, porém em uma baixa corrente de oxidação ( $i_p = 1,61 \pm 0,04 \mu\text{A}$ ) e redução ( $i_p = -0,72 \pm 0,01 \mu\text{A}$ ). Um aumento da intensidade de pico de ambas as correntes de oxidação ( $i_p = 2,72 \pm 0,03 \mu\text{A}$ ) e redução ( $i_p = -2,01 \pm 0,01 \mu\text{A}$ ) pôde ser observado para o eletrodo modificado com o polímero Nafion. Isso ocorre pois o Nafion é um

polímero de troca catiônica e, portanto, forma uma membrana seletiva a cátions, capaz de evitar a aproximação de ânions na interface eletrodo/eletrólito. Essa característica é extremamente interessante para determinação da DA, visto que esta geralmente existe na forma catiônica em pH fisiológico, e espécies aniônicas de interferentes, tais como o ácido ascórbico e o ácido úrico, podem ser fortemente repelidas da superfície do eletrodo (JANG *et al.*, 2019), melhorando a seletividade do sensor.

Já para o eletrodo modificado com as AuNPs produzidas por LAL, percebe-se um significativo aumento da intensidade das correntes, tanto de oxidação ( $i_p = 4,67 \pm 0,06 \mu\text{A}$ ), quanto de redução ( $i_p = -4,30 \pm 0,02 \mu\text{A}$ ), em comparação com os demais, comprovando que a presença dessas AuNPs na superfície do eletrodo aumenta os sítios ativos disponíveis para a reação, beneficiando a transferência eletrônica. Nota-se também um deslocamento do pico de oxidação para potenciais mais baixos, indicando que tais AuNPs contribuem para eletrocatalise da reação redox. Além disso, um perfil voltamétrico mais definido foi obtido com o eletrodo modificado, o que contribui para uma melhor seletividade analítica do sensor.

Analisando comparativamente o desempenho do eletrodo modificado com as AuNPs produzidas por LAL e dos eletrodos modificados com AuNPs produzidas via rota química de síntese, percebe-se uma significativa queda de corrente para os sensores contendo essas últimas nanopartículas, além de um deslocamento do pico de oxidação para potenciais mais altos, apresentando, portanto, um menor efeito eletrocatalítico. As AuNPs estabilizadas em citrato (GCE/AuNPs.QMC1/Nafion) apresentaram corrente de pico de  $3,15 \pm 0,11 \mu\text{A}$  para oxidação e  $-1,94 \pm 0,2 \mu\text{A}$  para redução. Já as AuNPs estabilizadas em cloreto de 3-*n*-propil-(4-metilpiridínio)silsesquioxano (GCE/AuNPs.QMC2/Nafion), mesmo possuindo um diâmetro significativamente menor (5 nm, medido por TEM), o que impacta em um aumento na sua área superficial específica, apresentaram valores de corrente de pico ainda menores, sendo  $1,94 \pm 0,04 \mu\text{A}$  para oxidação e  $-0,75 \pm 0,03 \mu\text{A}$  para redução. Esse resultado é possivelmente devido ao fato de que o estabilizante utilizado nessa síntese possui uma molécula ainda maior que o anterior (citrato), ocupando mais sítios ativos da superfície e influenciando ainda mais na transferência eletrônica.

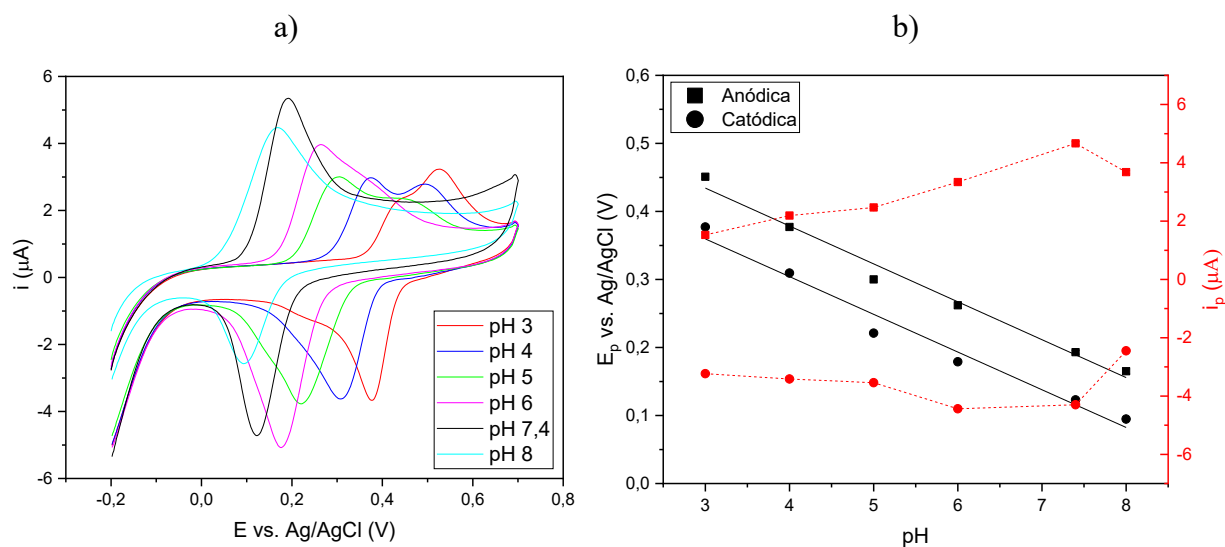
Tais resultados corroboram com a hipótese levantada de que AuNPs produzidas por LAL possuem mais sítios ativos para processo de eletrocatalise/eletroxidação devido à ausência de moléculas de estabilizantes na sua superfície.

### 4.3.2 Efeito do pH

Um estudo de variação do pH do eletrólito de suporte foi conduzido com o objetivo de compreender o mecanismo da reação da DA sobre o sensor GCE/AuNPs/Nafion. A Figura 35 apresenta os voltamogramas obtidos para DA 70  $\mu\text{M}$  em tampão PBS (pH de 3, 4, 5, 6, 7,4 e 8). É possível observar que o pico de oxidação se desloca para menores potenciais com o aumento do pH, indicando que prótons participam da reação eletroquímica.

A Figura 35 mostra a correlação entre a variação do pH e os valores de potenciais ( $E_p$ ) e corrente de pico ( $i_p$ ), anódicos e catódicos, obtidos. Nota-se que o maior valor da corrente de oxidação se dá em pH 7,4 sendo esta, uma característica bastante positiva do sensor visto que 7,4 é o pH típico de amostras biológicas em condições fisiológicas normais.

Figura 35 – a) Voltamogramas cíclicos para DA 70  $\mu\text{M}$  em PBS 0,01 M (pH 3, 4, 5, 6, 7,4 e 8) utilizando o eletrodo GCE/AuNPs/Nafion.  $v = 50 \text{ mV/s}$ . b) correlação entre a variação do pH e os valores de  $E_p$  e  $i_p$  anódico e catódico ( $n = 3$ ).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A variação do potencial anódico e catódico com o pH apresentou um comportamento linear, com coeficiente angular de  $-0,0557 \text{ V/pH}$  ( $R^2 = 0,9843$ ) e  $-0,0554 \text{ V/pH}$  ( $R^2 = 0,9746$ ), respectivamente. Conforme mostra a Equação (9), a inclinação dessa reta é relacionada com o valor teórico de  $-0,0592 \text{ V/pH}$  proveniente da equação de Nernst, indicando que um número igual de mols de elétrons ( $n$ ) e prótons ( $m$ ) estão envolvidos em ambas as reações de oxidação

e redução, sendo este um mecanismo já reportado por outros autores (CHUMILLAS *et al.*, 2013; JANG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2021).

$$\text{coeficiente angular} = -\frac{0,0592 m}{n} \quad (9)$$

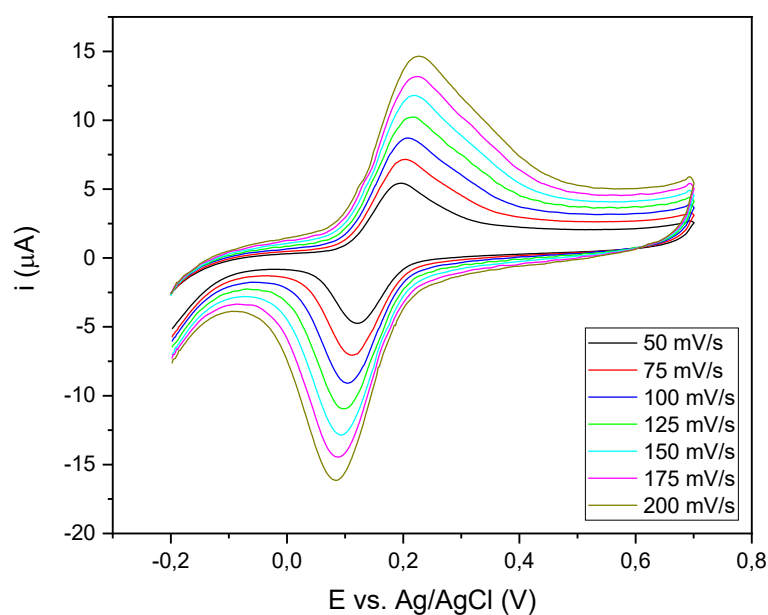
$$Na \text{ oxi.}: \frac{m}{n} = -\frac{0,0557}{-0,0593} = 0,94 \sim 1 \quad Na \text{ red.}: \frac{m}{n} = -\frac{0,0554}{-0,0593} = 0,94 \sim 1$$

### 4.3.3 Efeito da velocidade de varredura

O estudo da variação da velocidade de varredura permite compreender aspectos cruciais do mecanismo da reação e funcionamento do sensor, além de permitir identificar a melhor condição de leitura para determinação da DA.

A Figura 36 apresenta os voltamogramas cíclicos para a DA 70  $\mu\text{M}$  em PBS 0,01 M (pH 7,4) utilizando o eletrodo GCE/AuNPs/Nafion variando a velocidades de varredura de 50 a 200 mV/s. Nota-se que na medida em que a velocidade aumenta, maiores valores de corrente anódica e catódica são alcançados. No entanto, o perfil torna-se gradualmente menos definido, com o alargamento dos picos de corrente de oxidação e redução.

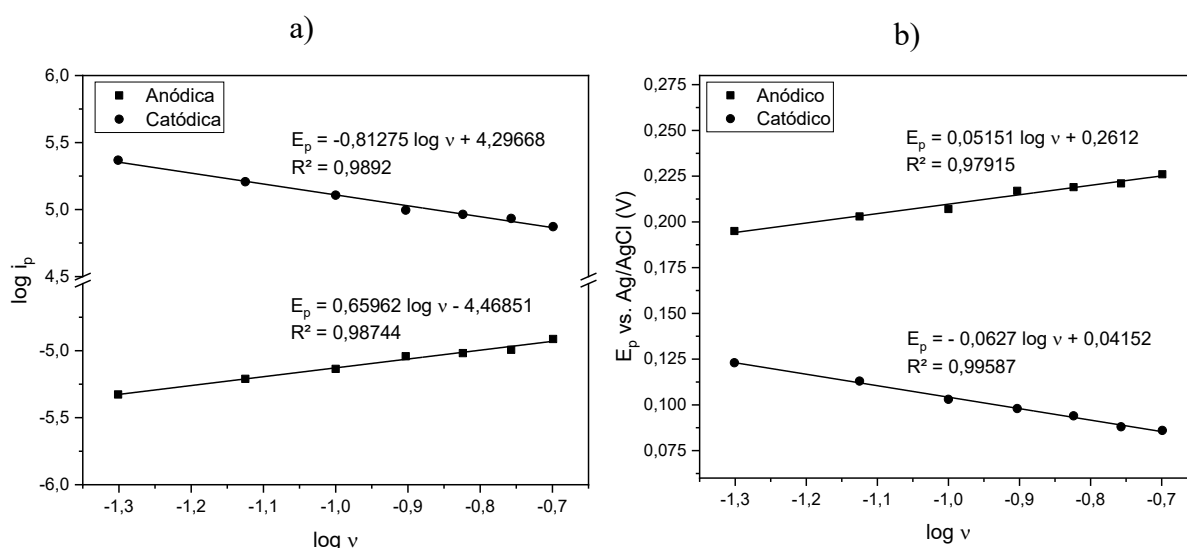
Figura 36 – a) Voltamogramas cíclicos para DA 70  $\mu\text{M}$  em PBS 0,01 M (pH 7,4) utilizando o eletrodo GCE/AuNPs/Nafion em diferentes velocidades de varredura.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A correlação entre o logaritmo da corrente de pico ( $\log i_p$ ) e o logaritmo da velocidade de varredura ( $\log v$ ) obtidos pelo estudo de variação da velocidade de varredura está reportada na Figura 37a. Segundo a literatura, quando o coeficiente angular dessa reta se aproxima de 0,5, tem-se um processo controlado por difusão, por outro lado, quando o coeficiente angular se aproxima de 1, tem-se um processo controlado por adsorção (GOSSER, 1993). A regressão linear obtida na redução ( $R^2 = 0,9892$ ) apresentou coeficiente angular igual a  $-0,81275$ , já na regressão linear da oxidação ( $R^2 = 0,98744$ ), o coeficiente angular obtido foi de  $0,65962$ . Dessa forma, percebe-se que, enquanto o processo de oxidação é majoritariamente difusional, o processo de redução apresenta uma maior contribuição adsortiva.

Figura 37 – Correlação entre a)  $\log i_p$  e  $\log v$  e b)  $E_p$  vs.  $\log v$ , obtidas a partir do estudo de variação da velocidade de varredura.

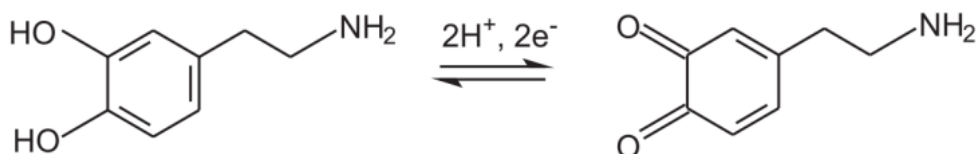


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A Figura 37b mostra que a variação dos valores de  $E_p$  com  $\log v$  apresentaram um comportamento linear, tanto nos picos anódicos, quanto catódicos. O coeficiente angular obtido nas retas foi utilizado na equação de Laviron (LAVIRON, 1979) (detalhes do cálculo do APÊNDICE B) para cálculo do número de mols de elétrons envolvidos ( $n$ ) nas reações. Os resultados apontam que o número de mols de elétrons transferidos entre a DA e o sensor GCE/AuNPs/Nafion desenvolvido é igual a 2,3 (oxidação) e 1,9 (redução), valores estes que podem ser aproximados à 2. Dessa forma, conclui-se que houve o envolvimento 2 mols de elétrons para 2 mol de prótons nas reações, corroborando com a razão encontrada

anteriormente no estudo de pH e com o mecanismo reportado por diversos autores na literatura e apresentado na Figura 38 (CHUMILLAS *et al.*, 2013; JANG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2021).

Figura 38 – Mecanismo de oxidação da dopamina.



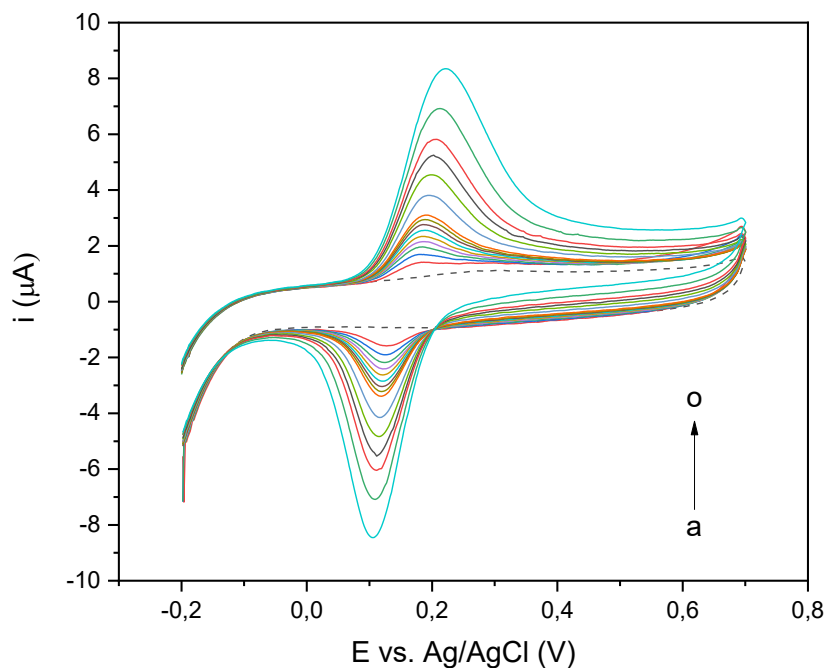
Fonte: Adaptado de (JANG *et al.*, 2019).

Por fim, esse estudo permitiu selecionar a velocidade de varredura mais apropriada para quantificação da DA. A velocidade de 100 mV/s foi selecionada por apresentar um aumento significativo da corrente e manter a definição do perfil, sem um alargamento considerável do pico, além de possibilitar a aquisição mais rápida do resultado.

#### 4.3.4 Construção da curva de calibração externa para a dopamina

Com o intuito de avaliar a capacidade de atuação do eletrodo modificado GCE/AuNPs/Nafion desenvolvido nesse trabalho como um sensor eletroquímico para determinação da DA, varreduras de potencial foram realizadas em diferentes concentrações do analito onde um aumento proporcional da corrente de pico pôde ser observado a medida em que a concentração de DA na célula aumentava. A Figura 39 apresenta os voltamogramas cíclicos para as diferentes concentrações de DA.

Figura 39 – Voltamogramas cíclicos para diferentes concentrações de DA em PBS 0,01 M (pH 7,4) utilizando o eletrodo GCE/AuNPs/Nafion.  $v = 100$  mV/s. a) branco; b) 2,8; c) 4,2; d) 5,6; e) 7; f) 8,4; g) 9,8; h) 11,2; i) 12,6; j) 14; k) 20,9; l) 27,9; m) 34,8; n) 48,7; o) 69,3  $\mu$ M.



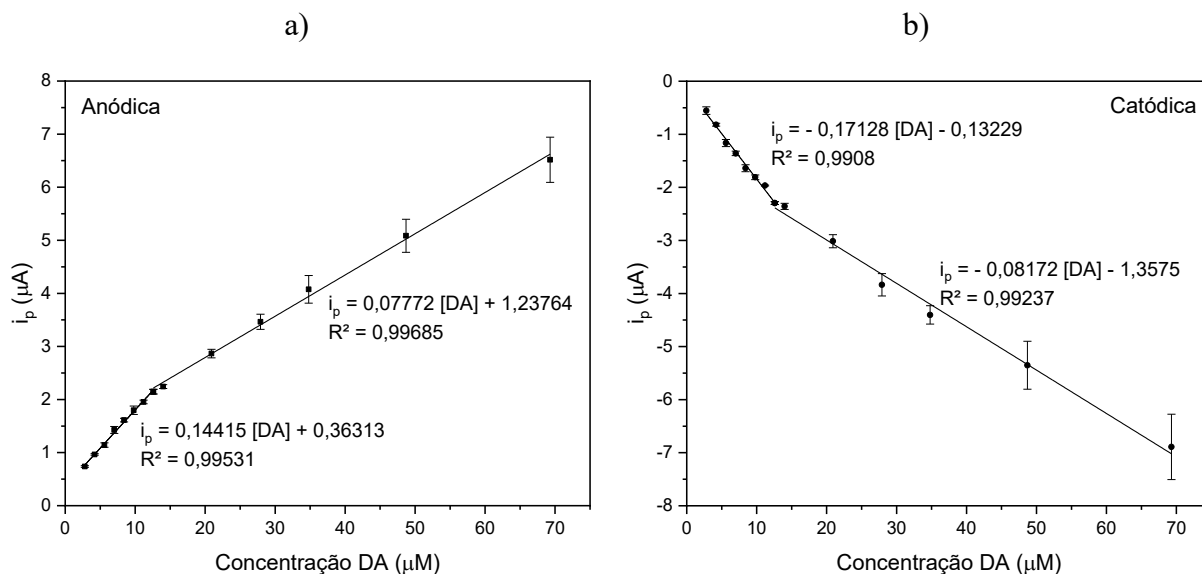
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A partir dos voltamogramas obtidos, uma curva de calibração ( $n=3$ ) pôde ser construída relacionando os valores de corrente de pico associados a oxidação da DA com a concentração deste analito, apresentada na Figura 40a. Do mesmo modo, uma curva de calibração ( $n=3$ ) pode ser construída com base no sinal de redução, apresentada na Figura 40b.

Para ambos os sinais, de oxidação e redução, pode-se observar que o sensor aqui desenvolvido apresenta duas regiões lineares de determinação, sendo capaz de quantificar baixas concentrações de DA ( $< 10 \mu$ M) mais próximas à concentração de dopamina no organismo humano, até concentrações maiores ( $10 \mu$ M  $< [DA] < 70 \mu$ M) como aquelas encontradas em fármacos.



Figura 40 – Curvas de calibração externa para DA (n=3) a) sinal anódico e b) sinal catódico



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A partir do primeiro trecho linear das curvas de calibração, pode-se calcular o limite de detecção (do inglês, limit of detection – LoD) que representa a mais baixa concentração em que a substância pode ser detectada pelo sensor, assim como o limite de quantificação (do inglês, limit of quantitation – LoQ) que, por sua vez, representa a mais baixa concentração em que a substância pode ser quantificada. Estes parâmetros foram calculados utilizando as seguintes expressões (SANTANA, 2017):

$$LoD = 3,3 \frac{SD}{a} \qquad LoQ = 10 \frac{SD}{a}$$

Onde SD corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear da reta e  $a$  se refere ao coeficiente angular da reta. Para a curva anódica, os valores obtidos para LoD e LoQ foram 0,77  $\mu\text{M}$  e 2,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Já para a curva catódica, o LoD e o LoQ alcançados foram de 1,08  $\mu\text{M}$  e 3,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Portanto, ambos os sinais podem ser utilizados para o desenvolvimento de um sensor, sendo que uma maior sensibilidade foi alcançada considerando o sinal de oxidação da dopamina.

Os resultados obtidos mostraram-se promissores quando comparado aos valores reportados na literatura apresentados na Tabela 2. Importante destacar que a voltametria cíclica é a técnica mais comum para estudos iniciais de um sensor eletroquímico, no entanto é

um modo de varredura de potencial relativamente menos sensível quando comparado à voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês differential pulse voltammetry) e à voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês square wave voltammetry) que trabalham com o aumento progressivo de pulsos de potencial. Nos trabalhos reportados na Tabela 2, esses dois últimos modos citados são aplicados, contribuindo, portanto, para uma melhora nos limites de detecção alcançados. Dessa forma, entende-se que os resultados alcançados pelo sensor desenvolvido neste trabalho podem ser aprimorados por meio de uma otimização da técnica eletroanalítica de determinação, explorando parâmetros de leitura que resultem em maiores valores de corrente e, conseqüentemente, sensibilidade, melhorando inclusive o LoD e o LoQ.

Por último, avaliou-se a estabilidade do sensor desenvolvido com relação ao número de leituras que o eletrodo suporta sem apresentar lixiviação das AuNPs depositadas ou significativa saturação da superfície e/ou redução de desempenho. Após 20 ciclos sequenciais de leitura, uma queda de apenas 4,5% e um aumento de 10% no valor da corrente de pico e potencial anódico foram apresentados, respectivamente.

Portanto, os resultados alcançados demonstram que as AuNPs produzidas por ablação a laser em solução de aquosa de NaCl 100  $\mu$ M apresentam potencial como partículas modificadoras de eletrodos para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para determinação de dopamina, contribuindo com a transferência eletrônica de maneira mais efetiva do que AuNPs produzidas por rotas químicas de síntese.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados alcançados nesse trabalho de mestrado demonstram o potencial da técnica de ablação a laser em meio líquido para produção de nanomateriais utilizando um sistema a laser comercial que é convencionalmente utilizado para marcação e texturização de superfícies. Em atendimento ao objetivo geral desta pesquisa, nanopartículas de ouro de alta pureza foram produzidas em meio aquoso utilizando um laser de fibra de alta frequência pulsado em nanosegundos na ausência de ligantes e estabilizantes.

Os experimentos de produção de nanopartículas realizados, permitiram compreender as influências de parâmetros intrínsecos (largura de pulso, frequência e potência) e extrínsecos (velocidade de varredura e tempo de ablação) do laser na concentração e polidispersividade das dispersões obtidas. Os resultados apontaram que o uso de altos valores de frequência do laser se mostrou favorável para obtenção de coloides mais monodispersos, favorecendo um efeito de fragmentação das partículas. Também foi observado que o efeito de fragmentação se torna mais evidente com o uso de alta velocidade de varredura do laser e maiores tempo de processo devido ao aumento da interação das partículas formadas com o feixe laser. A análise por TEM das amostras comprovou a morfologia esférica com um diâmetro médio de  $20 \pm 8$  nm para AuNPs produzidas em água deionizada por 120 segundos e  $15 \pm 5$  nm para AuNPs produzidas em 300 segundos, atendendo ao objetivo desse trabalho de obter AuNPs esféricas, com diâmetros  $< 100$  nm e estreita distribuição de tamanho.

Os resultados permitiram concluir também que a utilização de NaCl ( $100 \mu\text{M}$ ) no meio aquoso da ablação melhora significativamente as propriedades das AuNPs produzidas, obtendo partículas mais estáveis, monodispersas e alcançando um diâmetro médio de  $10 \pm 2$  nm. Além disso, a reprodutibilidade e a produtividade do processo foram melhoradas, chegando a  $99,9$  mg/h.

Por fim, a aplicação das AuNPs produzidas na solução aquosa contendo  $100 \mu\text{M}$  de NaCl em um sensor eletroquímico para determinação da dopamina, se mostrou bastante promissora, alcançando valores de  $\text{LoD} = 0,77 \mu\text{M}$  e  $\text{LoQ} = 2,3 \mu\text{M}$ , considerando-se o sinal de oxidação, e  $\text{LoD} = 1,08 \mu\text{M}$  e  $\text{LoQ} = 3,4 \mu\text{M}$ , considerando-se o sinal de redução. O desempenho dos eletrodos modificados com AuNPs produzidas por ablação se mostrou superior ao de eletrodos modificados por AuNPs produzidas por rota química. Esse resultado corrobora com a hipótese levantada de que AuNPs produzidas por LAL possuem mais sítios

ativos para processo de electrocatálise/electroxidação devido à ausência de moléculas de estabilizantes na sua superfície.

Conclui-se, portanto, que a ablação a laser em meio líquido é um processo limpo e promissor para produção de AuNPs livres de ligantes, sendo este, um aspecto de interesse para aplicações electroquímicas. Nesse sentido, esforços devem ser mantidos para um refinamento do controle da técnica com relação à reprodutibilidade das partículas obtidas, partindo de um monitoramento mais rigoroso das condições e estabilidade da fonte laser utilizada. Tais avanços podem estar diretamente relacionados com o desenvolvimento de sensores electroquímicos mais sensíveis e seletivos, tendo visto que superfícies de alta pureza favorecem o acesso dos reagentes aos sítios ativos de NPs metálicas.

## 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados alcançados nesse trabalho de mestrado abrem portas para o desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa no grupo, como já em andamento, por meio de bolsas de iniciação científica com pesquisa focada na produção de AuNPs por LAL utilizando diferentes meios líquidos e na produção de nanocompósitos de AuNPs com Grafeno e seus derivados. Ainda nessa temática, o potencial de produção desse nanocompósitos *in situ* foi validado por meio de um projeto com apoio do CNPq em parceria com a *startup* Nanogreen. Nesse projeto, os nanocompósitos AuNPs/GO foram aplicados em sistemas electrocatalíticos para catálise do glicerol e aplicação em células a combustível, mostrando mais um potencial de aplicação. Dessa forma, as linhas de pesquisas originárias desse trabalho são diversas e apontam como sugestões de trabalhos futuros:

- Realização de estudos de variação da sobreposição de pulsos de um nível baixo até um nível alto, avaliando de maneira isolada os efeitos de absorção do feixe laser pelo plasma e bolha de cavitação no tamanho de partícula, polidispersividade e produtividade do processo - quando houver disponibilidade de uma máquina para tal (uma vez que a fonte laser utilizada nessa pesquisa encontra-se inoperante desde março de 2021);
- Estudar a possibilidade do emprego de lasers contínuos, disponíveis na estrutura dos laboratórios parceiros, para produção de nanomateriais;
- Avaliar o potencial de produção de nanocompósitos AuNPs/GO em lasers de alta potência também disponíveis na estrutura dos laboratórios parceiros;

- Avaliar a citotoxicidade das AuNPs produzidas por LAL comparadas com AuNPs obtidas por rota química para explorar o potencial de desenvolvimento de biomateriais. Segundo CRACIUN *et al.*, (2017), biovidros contendo AuNPs apresentam ótima proliferação de células como queratinócitos;
- Explorar novas formas de imobilização das AuNPs no GCE e avaliar o desempenho do sensor frente a outros analitos e interferentes;
- Desenvolver um método eletroanalítico para quantificação da dopamina em amostras reais tais como urina, soro sanguíneo e saliva, utilizando eletrodos modificados com AuNPs produzidas por LAL.

## REFERÊNCIAS

360IRESEARCH. **Gold Nanoparticle Market Research Report by End User, by Region - Global Forecast to 2025 - Cumulative Impact of COVID-19**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/4904568/gold-nanoparticle-market-research-report-by-end>>.

AFFANDI, M. S. *et al.* In situ measurement of gold nanoparticle production. **Journal of Nanophotonics**, v. 9, n. 1, fev. 2015.

ALI, B.; LITVINYUK, I. V.; RYBACHUK, M. Femtosecond laser micromachining of diamond: Current research status, applications and challenges. **Carbon**, v. 179, p. 209–226, jul. 2021.

AMANS, D.; CAI, W.; BARCIKOWSKI, S. Status and demand of research to bring laser generation of nanoparticles in liquids to maturity. **Applied Surface Science**, v. 488, p. 445–454, set. 2019.

AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Controlled size manipulation of free gold nanoparticles by laser irradiation and their facile bioconjugation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 44, p. 4705–4710, 2007.

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

ANU MARY EALIA, S.; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 263, n. 3, nov. 2017.

BAE, C. H.; NAM, S. H.; PARK, S. M. Formation of silver nanoparticles by laser ablation of a silver target in NaCl solution. **Applied Surface Science**, v. 197–198, p. 628–634, set. 2002.

BANERJEE, S. *et al.* Electrochemical Detection of Neurotransmitters. **Biosensors**, v. 10, n. 8, p. 101, ago. 2020.

BARCHANSKI, A. *et al.* Design of Bi-functional Bioconjugated Gold Nanoparticles by Pulsed Laser Ablation with Minimized Degradation. **Journal of Laser Micro/Nanoengineering**, v. 6, n. 2, p. 124–130, set. 2011.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2 nd ed. New York: Ed. Wiley, 2001.

BARRY, M. *et al.* Pulsed nanosecond laser ablation of gold in deionized water and aqueous chitosan solution. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 55, p. 59–68, abr. 2014.

BESNER, S. *et al.* Ultrafast laser based “green” synthesis of non-toxic nanoparticles in aqueous solutions. **Applied Physics A**, v. 93, n. 4, p. 955–959, dez. 2008.

BESNER, S. *et al.* Synthesis of size-tunable polymer-protected gold nanoparticles by femtosecond laser-based ablation and seed growth. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 22, p. 9526–9531, 2009.

BUENO-ALEJO, C. J. *et al.* Ultraclean derivatized monodisperse gold nanoparticles through laser drop ablation customization of polymorph gold nanostructures. **Langmuir**, v. 28, n. 21, p. 8183–8189, 2012.

CALIL, S. S.; DA SILVA, R. P. Q. **Biossensores: estrutura , funcionamento e aplicabilidade**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/15563761-Biossensores-estrutura-funcionamento-e-aplicabilidade.html>>. Acesso em: 27 maio. 2021.

CHUMILLAS, S. *et al.* Study of dopamine reactivity on platinum single crystal electrode surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 577–586, out. 2013.

CONNOR, E. E. *et al.* Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. **Small**, v. 1, n. 3, p. 325–327, mar. 2005.

CRACIUN, A. M. *et al.* Surface Plasmon Resonance or Biocompatibility—Key Properties for Determining the Applicability of Noble Metal Nanoparticles. **Materials**, v. 10, n. 7, p. 836, 21 jul. 2017.

DA SILVA, T. R. **Desenvolvimento de eletrodos nanoestruturados para a determinação de dopamina e levodopa em fármacos**. 2018. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

DA SILVA, W.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Gold nanoparticle decorated multiwalled carbon nanotube modified electrodes for the electrochemical determination of theophylline. **Analytical Methods**, v. 10, n. 47, p. 5634–5642, 2018.

DE BARROS, M. R. *et al.* Au-on-Pd bimetallic nanoparticles applied to the voltammetric determination and monitoring of 4-nitroaniline in environmental samples. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, 105821, 2021.

DE GIACOMO, A. *et al.* Cavitation dynamics of laser ablation of bulk and wire-shaped metals in water during nanoparticles production. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 9, p. 3083–3092, 2013.

DELL'AGLIO, M. *et al.* Mechanisms and processes of pulsed laser ablation in liquids during nanoparticle production. **Applied Surface Science**, v. 348, p. 4–9, set. 2015.

DITTRICH, S. *et al.* Comparison of the productivity and ablation efficiency of different laser classes for laser ablation of gold in water and air. **Applied Physics A**, v. 125, 432, jun. 2019.

DITTRICH, S.; BARCIKOWSKI, S.; GÖKCE, B. Plasma and nanoparticle shielding during pulsed laser ablation in liquids cause ablation efficiency decrease. **Opto-Electronic Advances**, v. 4, n. 1, 200072, 2021.

ELGRISHI, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 2006.

EVOQNANO. **Evoqnano**. Disponível em: <<https://evoqnano.com/>>. Acesso em: 13 jul.

2021.

FACHIN, L. B. **Green synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by laser ablation in water**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

FERAPONTOVA, E. E. Electrochemical Analysis of Dopamine: Perspectives of Specific In Vivo Detection. **Electrochimica Acta**, v. 245, p. 664–671, ago. 2017.

GOSSER, K. D. **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**. Nova York: VCH Publishers, 1993.

GRAND VIEW RESEARCH. **Gold Nanoparticles Market Size, Share & Trends Analysis Report By End Use (Medical & Dentistry, Electronics, Catalysis), By Region, And Segment Forecasts, 2019 - 2025**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/3450694/gold-nanoparticles-market-size-share-and-trends>>.

GUERRA-BALCÁZAR, M. *et al.* Glassy Carbon Electrode-Supported Au Nanoparticles for the Glucose Electrooxidation: On the Role of Crystallographic Orientation. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, n. Special Issue, p. 1–8, 2012.

HAISS, W. *et al.* Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, jun. 2007.

HEINRICH, G. J.; GOMES, M. C. **Introduction to Ceramics Processing**. 1. ed. Clausthal-Zellerfeld: Fakultät für Natur - und Materialwissenschaften, Institut für Nichtmetallische Werkstoffe, 2014.

INJEYAN, H.; GOODNO, G. D. **High-Power Laser Handbook**. 1. ed. New York: Mc Graw-Hill, 2011.

ISAEVA, E. I.; KIRYUKHINA, S. N.; GORBUNOVA, V. V. Photochemical synthesis of silver and gold nanoparticles in polyhydric alcohols. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 619–623, abr. 2013.

IVANOV, M. R. **Covalently functionalized gold nanoparticles: synthesis, characterization, and integration into capillary electrophoresis**. 2011. Thesis (Doctor of Philosophy degree in Chemistry) - Graduate College of The University of Iowa, Iowa City, 2011.

JANG, H.-S. *et al.* Nafion coated Au nanoparticle-graphene quantum dot nanocomposite modified working electrode for voltammetric determination of dopamine. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 105, p. 174–181, jul. 2019.

JENDRZEJ, S. *et al.* How Size Determines the Value of Gold: Economic Aspects of Wet Chemical and Laser-Based Metal Colloid Synthesis. **ChemPhysChem**, v. 18, n. 9, p. 1012–1019, maio 2017.

KABASHIN, A. V. *et al.* Nanofabrication with Pulsed Lasers. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, n. 3, p. 454–463, mar. 2010.



KABASHIN, A. V; MEUNIER, M. Synthesis of colloidal nanoparticles during femtosecond laser ablation of gold in water. **Journal of Applied Physics**, v. 94, n. 12, p. 7941–7943, 2003.

KALUS, M.-R. *et al.* Colloids created by light: Laser-generated nanoparticles for applications in biology and medicine. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, p. S93–S100, 2017.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, nov. 2019.

KHUMAENI, A.; BUDI, W. S.; SUTANTO, H. Synthesis and characterization of high-purity gold nanoparticles by laser ablation method using low-energy Nd:YAG laser 1064 nm. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 909, n. 1, 012037, nov. 2017.

KIM, K. K. *et al.* Stability of uncapped gold nanoparticles produced by laser ablation in deionized water: The effect of post-irradiation. **Chemical Physics Letters**, v. 588, p. 167–173, 2013.

KIM, M. *et al.* Synthesis of nanoparticles by laser ablation: A review. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 2017, n. 34, p. 80–90, 2017.

KRUUSING, A. Underwater and water-assisted laser processing: Part 1—general features, steam cleaning and shock processing. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 41, n. 2, p. 307–327, fev. 2004.

KUCHERIK, A. O. *et al.* Cavitation-Free Continuous-Wave Laser Ablation from a Solid Target to Synthesize Low-Size-Dispersed Gold Nanoparticles. **ChemPhysChem**, v. 18, n. 9, p. 1185–1191, 2017.

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 19–28, 1979.

LETZEL, A. *et al.* Size Quenching during Laser Synthesis of Colloids Happens Already in the Vapor Phase of the Cavitation Bubble. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 9, p. 5356–5365, mar. 2017.

LETZEL, A. *et al.* Time and Mechanism of Nanoparticle Functionalization by Macromolecular Ligands during Pulsed Laser Ablation in Liquids. **Langmuir**, v. 35, n. 8, p. 3038–3047, 2019.

LEWIS, L. J.; PEREZB, D. Computer Models of Laser Ablation in Liquids. In: **Laser Ablation in Liquids**. 1. ed. New York: Pan Stanford Publishing, 2012. p. 111–156.

LI, J. *et al.* Graphene–Au nanoparticles nanocomposite film for selective electrochemical determination of dopamine. **Analytical Methods**, v. 4, n. 6, p. 1725, 2012.

LI, M. *et al.* Ultrasensitive Determination of Dopamine and Uric Acid Based on Gold Nanoparticles@Carbon Dots/Electrochemical Reduced Graphene Oxide modified glassy carbon electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 16, 21084, ago. 2021.

MADHURANTAKAM, S. *et al.* “Nano”: An Emerging Avenue in Electrochemical Detection of Neurotransmitters. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 24, p. 4024–4047, dez. 2020.

MAFUNÉ, F. *et al.* Full Physical Preparation of Size-Selected Gold Nanoparticles in Solution: Laser Ablation and Laser-Induced Size Control. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 31, p. 7575–7577, ago. 2002.

MARKETS AND MARKETS. **Point of Care/Rapid Diagnostics Market by Product (Glucose, Infectious Disease (Hepatitis C, Influenza), Coagulation), Platform (Microfluidics, Immunoassay), Mode of Purchase (Prescription, OTC), Enduser (Hospital, e-comm, Home Care) - Global Forecast to .** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://www.researchandmarkets.com/reports/5292861/point-of-carerapid-diagnostics-market-by-product?utm\\_source=GNOM&utm\\_medium=PressRelease&utm\\_code=cb2zqr&utm\\_campaign=1507625+-+Global+Point+of+Care%2FRapid+Diagnostics+Market+\(2020+to+2025\)+-+Increasing+>](https://www.researchandmarkets.com/reports/5292861/point-of-carerapid-diagnostics-market-by-product?utm_source=GNOM&utm_medium=PressRelease&utm_code=cb2zqr&utm_campaign=1507625+-+Global+Point+of+Care%2FRapid+Diagnostics+Market+(2020+to+2025)+-+Increasing+>)>.

MATTOS, V. L. D. DE; BARBETTA, P. A.; SAMOHYL, R. W. **Identificação De Efeitos De Dispersão Em Experimentos Fatoriais Dos Tipos 2k E 2k-P: Um Estudo De Caso.** XXII Encontro Nacional de Engenharia de Produção. **Anais...** Curitiba: 2002

MENÉNDEZ-MANJÓN, A.; BARCIKOWSKI, S. Hydrodynamic size distribution of gold nanoparticles controlled by repetition rate during pulsed laser ablation in water. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 9, p. 4285–4290, 2011.

MERK, V. *et al.* In Situ Non-DLVO Stabilization of Surfactant-Free, Plasmonic Gold Nanoparticles: Effect of Hofmeister's Anions. **Langmuir**, v. 30, n. 15, p. 4213–4222, abr. 2014.

MODY, V. *et al.* Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282–289, 2010.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2009.

MOURA, C. G. *et al.* Effects of laser fluence and liquid media on preparation of small Ag nanoparticles by laser ablation in liquid. **Optics and Laser Technology**, v. 97, p. 20–28, 2017.

MUTO, H.; MIYAJIMA, K.; MAFUNÉ, F. Mechanism of Laser-Induced Size Reduction of Gold Nanoparticles As Studied by Single and Double Laser Pulse Excitation. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 15, p. 5810–5815, abr. 2008.

NAHARUDDIN, N. Z. A. *et al.* Laser ablation synthesis of gold nanoparticles in tetrahydrofuran. **Optical Materials Express**, v. 10, n. 2, p. 323, fev. 2020.

NANO IMRA. **IMRA NanoBio Division.** Disponível em: <<https://nano.imra.com/>>. Acesso em: 13 jul. 2021a.

NANO IMRA. **Pure, Stable i-colloid Production by Pulsed-Laser Ablation.** Disponível em: <<https://nano.imra.com/wp-content/uploads/2019/08/TN11v1-Pure-colloid-production.pdf>>. Acesso em: 3 abr. 2021b.

NANOCOMPOSIX. **Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis.** Disponível em: <<https://nanocomposix.com/pages/protocols-white-papers>>. Acesso

em: 10 jun. 2020.

NEHL, C. L.; HAFNER, J. H. Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 2415, 2008.

NOTARIANNI, M. *et al.* Plasmonic effect of gold nanoparticles in organic solar cells. **Solar Energy**, v. 106, p. 23–37, ago. 2014.

OKO, D. N. *et al.* Dopamine and ascorbic acid electro-oxidation on Au, AuPt and Pt nanoparticles prepared by pulse laser ablation in water. **Electrochimica Acta**, v. 159, p. 174–183, 2015.

PALAZZO, G. *et al.* On the stability of gold nanoparticles synthesized by laser ablation in liquids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 489, p. 47–56, mar. 2017.

PAN, J. *et al.* Overoxidized poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–gold nanoparticles–graphene-modified electrode for the simultaneous detection of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, set. 2021.

PANDIKUMAR, A. *et al.* Graphene and its nanocomposite material based electrochemical sensor platform for dopamine. **RSC Adv.**, v. 4, n. 108, p. 63296–63323, 2014.

PARTICULAR. **Particular GmbH**. Disponível em: <<https://particular.eu/>>. Acesso em: 13 jul. 2021.

PASCHOTTA, R. **Fiber Lasers**. In: **RP Photonics Encyclopedia**. Disponível em: <[https://www.rp-photonics.com/fiber\\_lasers.html](https://www.rp-photonics.com/fiber_lasers.html)>. Acesso em: 5 ago. 2021.

PEIXOTO DE ALMEIDA, M. *et al.* Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 66, p. 529–567, 2014.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. 1. ed. São Carlos: EdUFSCar – Editora da Universidade Federal de São Carlos, 2015.

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

PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, nov. 2011.

POHLOT, H. P. M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos para aplicação em sensores plasmônicos**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Coordenação do Curso de Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, 2015.

PROCHÁZKA, M. *et al.* Probing applications of laser-ablated Ag colloids in SERS spectroscopy: Improvement of ablation procedure and SERS spectral testing. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 24, p. 5103–5108, 1997.

PYATENKO, A. *et al.* Mechanism of pulse laser interaction with colloidal nanoparticles.

**Laser & Photonics Reviews**, v. 7, n. 4, p. 596–604, jul. 2013.

QAYYUM, H. *et al.* Synthesis of silver and gold nanoparticles by pulsed laser ablation for nanoparticle enhanced laser-induced breakdown spectroscopy. **Journal of Laser Applications**, v. 31, n. 2, 2019.

RAHMATI, R. *et al.* Sensitive Voltammetric Detection of Melatonin in Pharmaceutical Products by Highly Conductive Porous Graphene-Gold Composites. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 49, p. 18224–18236, dez. 2020.

RAMALINGAM, V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 271, 10198, set. 2019.

REHBOCK, C. *et al.* Size control of laser-fabricated surfactant-free gold nanoparticles with highly diluted electrolytes and their subsequent bioconjugation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 9, p. 3057–3067, 2013.

RESENDE, R. R. *et al.* Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, p. 967–1012, 2017.

RESTREPO, J. A. S. **Sistemas biomiméticos na síntese de nanopartículas de ouro para aplicações biomédicas e biotecnológicas**. 2015. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

REZA SADROLHOSSEINI, A. *et al.* Laser Ablation Technique for Synthesis of Metal Nanoparticle in Liquid. In: MA, Y. (Ed.). **Laser Technology and its Applications**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

RIABININA, D.; CHAKER, M.; MARGOT, J. Dependence of gold nanoparticle production on pulse duration by laser ablation in liquid media. **Nanotechnology**, v. 23, n. 13, 2012.

SAHA, K. *et al.* Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739–2779, maio 2012.

SANTANA, E. R. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de um eletrodo quimicamente modificado com nanopartículas de ouro e de óxido de ferro para a determinação eletroanalítica de Bisfenol A**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SASAKI, K. Dynamics of laser ablation. In: YANG, G. (Ed.). **Laser Ablation in Liquids Principles and Applications in the Preparation of Nanomaterials**. 1st. ed. [s.l.] Jenny Stanford Publishing, 2012. p. 269–297.

SCHWENKE, A. *et al.* Influence of processing time on nanoparticle generation during picosecond-pulsed fundamental and second harmonic laser ablation of metals in tetrahydrofuran. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 104, n. 1, p. 77–82, 2011.

SEMALTIANOS, N. G. Nanoparticles by Laser Ablation. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, v. 35, n. 2, p. 105–124, maio 2010.

SHARIF, M.; DORRANIAN, D. Effect of NaCl Concentration on Silver Nanoparticles Produced by 1064 nm Laser Ablation in NaCl Solution. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 606, n. 1, p. 36–46, 2015.

SHI, L. *et al.* Reduced Graphene Oxide/Polydopamine/Gold Electrode as Electrochemical Sensor for Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 14, p. 8882–8891, set. 2019.

SIERRA, J. A. *et al.* Biogenic approaches using citrus extracts for the synthesis of metal nanoparticles: the role of flavonoids in gold reduction and stabilization. **New Journal of Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 1420–1429, 2016.

SINGH, S. C. *et al.* Nanomaterials: Laser-Based Processing in Liquid Media. In: SINGH, S. C. *et al.* (Eds.). **Nanomaterials**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. p. 317–494.

SOBHAN, M. A.; WITHFORD, M. J.; GOLDYS, E. M. Enhanced Stability of Gold Colloids Produced by Femtosecond Laser Synthesis in Aqueous Solution of CTAB. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3156–3159, mar. 2010.

SPORTELLI, M. C. *et al.* The pros and cons of the use of laser ablation synthesis for the production of silver nano-antimicrobials. **Antibiotics**, v. 7, n. 3, 67, 2018.

STARINSKIY, S. V.; SHUKHOV, Y. G.; BULGAKOV, A. V. Effect of nanoparticle sizes on the extinction spectrum of colloidal solutions produced by laser ablation of gold in water. **Quantum Electronics**, v. 47, n. 4, p. 343–346, abr. 2017.

STAUSS, S. *et al.* Pulsed Laser Ablation in High-Pressure Gases, Pressurized Liquids and Supercritical Fluids: Generation, Fundamental Characteristics and Applications. In: YANG, D. (Ed.). . **Applications of Laser Ablation - Thin Film Deposition, Nanomaterial Synthesis and Surface Modification**. [s.l.] IntechOpen, 2016.

STEEN, W. M. .; MAZUMDER, J. **Laser Material Processing**. 4a. ed. London: Springer London, 2010.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159–173, 2003.

STRATAKIS, E.; SHAFEEV, G. A. Nanostructures' Formation under Laser Ablation of Solids in Liquids. In: YANG, G. (Ed.). . **Laser Ablation in Liquids Principles and Applications in the Preparation of Nanomaterials**. 1st. ed. [s.l.] Jenny Stanford Publishing, 2012. p. 815–853.

STREUBEL, R.; BARCIKOWSKI, S.; GÖKCE, B. Continuous multigram nanoparticle synthesis by high-power, high-repetition-rate ultrafast laser ablation in liquids. **Optics Letters**, v. 41, n. 7, p. 1486–1489, 2016.

STREUBEL, R.; BENDT, G.; GÖKCE, B. Pilot-scale synthesis of metal nanoparticles by high-speed pulsed laser ablation in liquids. **Nanotechnology**, v. 27, 205602, 20 maio 2016.

SUN, Y.; XIA, Y. Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable

in the range from 400 to 750 nm. **The Analyst**, v. 128, n. 6, p. 686–691, 2003.

SYLVESTRE, J.-P. *et al.* Surface chemistry of gold nanoparticles produced by laser ablation in aqueous media. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 43, p. 16864–16869, 2004.

TOMAR, A.; GARG, G. Short review on application of gold nanoparticles. **Global Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 34–38, 2013.

TOMKO, J. *et al.* Cavitation bubble dynamics and nanoparticle size distributions in laser ablation in liquids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 522, p. 368–372, jun. 2017.

TORRISI, L.; TORRISI, A. Laser ablation parameters influencing gold nanoparticle synthesis in water. **Radiation Effects and Defects in Solids**, v. 173, n. 9–10, p. 729–739, 3 out. 2018.

TROUILLER, A. J. *et al.* Chemistry for oncotheranostic gold nanoparticles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 92–112, 2015.

TSUJI, T. *et al.* Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in polyvinylpyrrolidone solutions. **Applied Surface Science**, v. 254, n. 16, p. 5224–5230, 2008.

TSUJI, T. Preparation of nanoparticles using laser ablation in liquids: Fundamental aspects and efficient utilization. In: YANG, G. (Ed.). **Laser Ablation in Liquids: Principles and Applications in the Preparation of Nanomaterials**. 1st. ed. [s.l.] Pan Stanford Publishing, 2012. p. 207–268.

TSUJI, T.; KAKITA, T.; TSUJI, M. Preparation of nano-size particles of silver with femtosecond laser ablation in water. **Applied Surface Science**, v. 206, n. 1–4, p. 314–320, fev. 2003.

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.

VAN DER LINDEN, W. E.; DIEKER, J. W. Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 119, n. 1, p. 1–24, set. 1980.

VANONI, C. R. **Plataforma eletroquímica com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro para a determinação de melatonina**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

VINOD, M.; JAYASREE, R. S.; GOPCHANDRAN, K. G. Synthesis of pure and biocompatible gold nanoparticles using laser ablation method for SERS and photothermal applications. **Current Applied Physics**, v. 17, n. 11, p. 1430–1438, 2017.

WALTER, J. G. *et al.* Laser ablation-based one-step generation and bio-functionalization of gold nanoparticles conjugated with aptamers. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 8, n. 21, dez. 2010.

WANG, C. *et al.* A facile electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and Au nanoplates modified glassy carbon electrode for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 204, p. 302–309, dez. 2014.

WILLETS, K. A.; VAN DUYN, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 267–297, maio 2007.

XU, X. *et al.* Fabrication of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Liquid and Their Application for Simultaneous Electrochemical Detection of Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 1, p. 65–71, jan. 2014.

YAMADA, S.; SATO, H. Some Physical Properties of Glassy Carbon. **Nature**, v. 193, n. 4812, p. 261–262, jan. 1962.

YANG, D. *et al.* Fabrication of gold nanoparticles by pulsed laser ablation in aqueous media. **Journal of Laser Micro Nanoengineering**, v. 3, n. 3, p. 147–151, 2007.

YU, J.; NAN, J.; ZENG, H. Size control of nanoparticles by multiple-pulse laser ablation. **Applied Surface Science**, v. 402, p. 330–335, 2017.

ZAREI, K.; KHODADADI, A. Very sensitive electrochemical determination of diuron on glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide–gold nanoparticle–Nafion composite film. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 171–177, out. 2017.

ZEVIANI, W. M.; MAYER, F. DE P. Análise do fatorial 2k sem repetições. In: **Controle de Processos Industriais**. Notas de Aula. Curso de Estatística. Universidade Federal do Paraná, 2019. Disponível em: <http://web.leg.ufpr.br/ensino/CPI/apostila/referencias-bibliograficas.html>. Acesso em: 23 maio 2021.

ZHANG, A.; NEUMEYER, J. L.; BALDESSARINI, R. J. Recent Progress in Development of Dopamine Receptor Subtype-Selective Agents: Potential Therapeutics for Neurological and Psychiatric Disorders. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 1, p. 274–302, jan. 2007.

ZHANG, D.; GÖKCE, B.; NAHARUDDIN, S. Laser Synthesis and Processing of Colloids: Fundamentals and Applications. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 5, p. 3990–4103, mar. 2017.

ZHANG, J.; CHAKER, M.; MA, D. Pulsed laser ablation based synthesis of colloidal metal nanoparticles for catalytic applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 489, p. 138–149, 2017.

ZHU, L.; XUE, D.; WANG, Z. Gold Nanoparticle-based Colorimetric Sensor for pH Sensing. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 24, n. 5, p. 537–540, set. 2008.

ZHU, M. *et al.* Novel nitric oxide microsensor and its application to the study of smooth muscle cells. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, n. 2, p. 199–206, mar. 2002.

ZHU, S.; LU, Y. F.; HONG, M. H. Laser ablation of solid substrates in a water-confined environment. **Applied Physics Letters**, v. 79, n. 9, p. 1396–1398, ago. 2001.

## APÊNDICE A – Tratamentos dos dados no Software Statistica

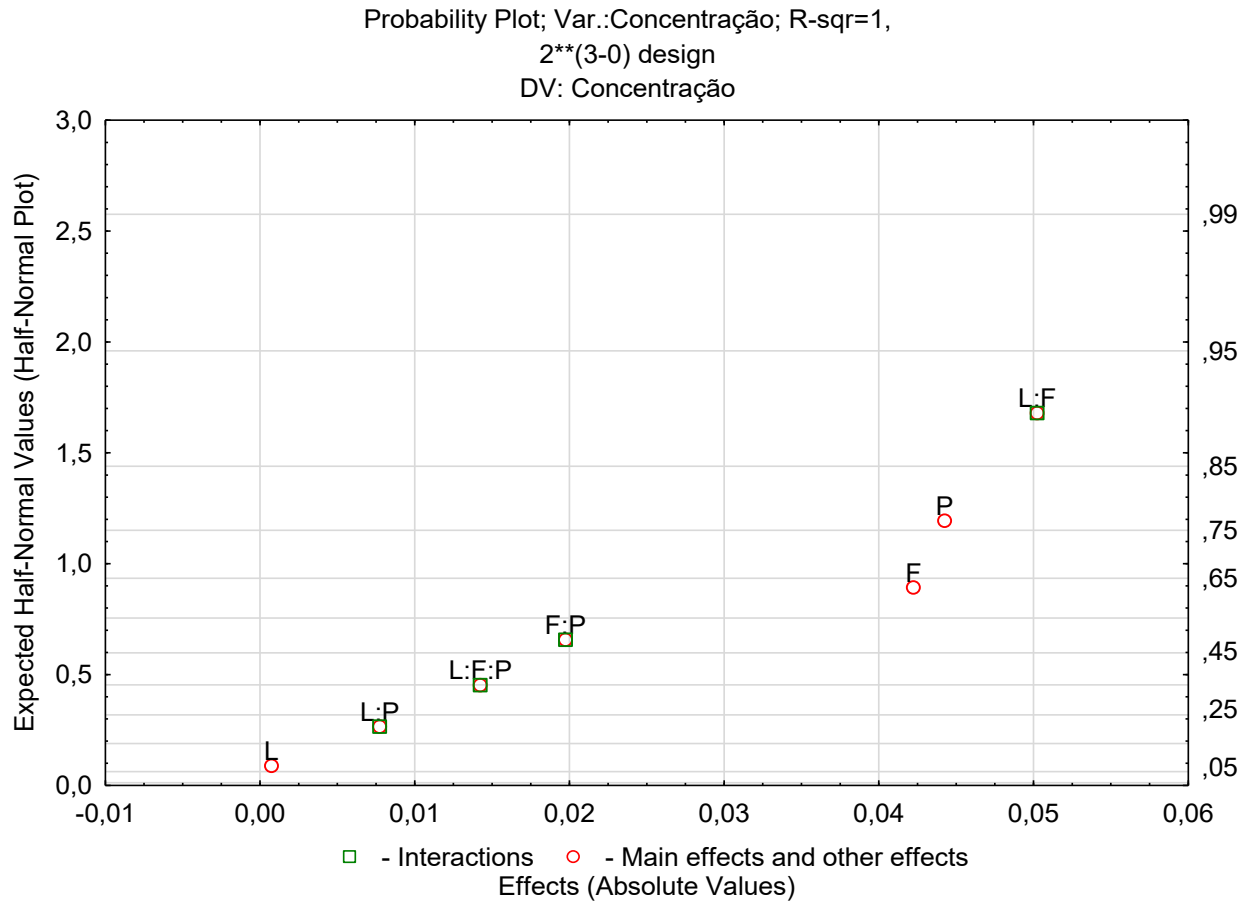
Na área industrial, projetos de experimentos do tipo  $2^k$  não replicados têm grande aceitação por apresentarem custo relativamente baixo, sendo muito utilizados como ponto de partida de estudos mais detalhados (MATTOS; BARBETTA; SAMOHYL, 2002).

No entanto, em planejamentos experimentais do tipo  $2^k$  sem réplicas tem-se um modelo saturado, onde não restam graus de liberdade para obter uma estimativa pura da variância do erro. Dessa forma, para estimar a significância dos efeitos com base em um nível de confiança se utiliza o princípio da esparsidade dos efeitos (MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, 2009).

Nesse caso, para obter uma estimativa de variância do erro, geralmente, abandona-se os termos de maior ordem do modelo. No entanto, a decisão sobre quais termos abandonar pode ser dada pela disposição dos termos em gráfico *Half-Normal*. “*Aqueles efeitos com estimativas mais próximas de zero são os candidatos naturais para serem abandonados*” (ZEVIANI; MAYER, 2019).

Dessa forma, o gráfico *Half-Normal* foi plotado considerando todos os efeitos primários, interações de segunda e terceira ordem, onde pode-se identificar o efeito de menor influencia no modelo. Para ambos os casos, concentração (Figura 41) e PdI (Figura 42), o efeito de menor influência, com valor próximos e zero foi desconsiderado, dando grau de liberdade para estimativa da significância dos demais efeitos. A aplicação desse modelo de redução de coeficiente de regressão se mostrou apropriada para estas análises, alcançando bons valores de  $R^2$  e  $R$  ajustado, como apresentado nas tabelas ANOVA para concentração (Tabela 9) e PdI (Tabela 10).



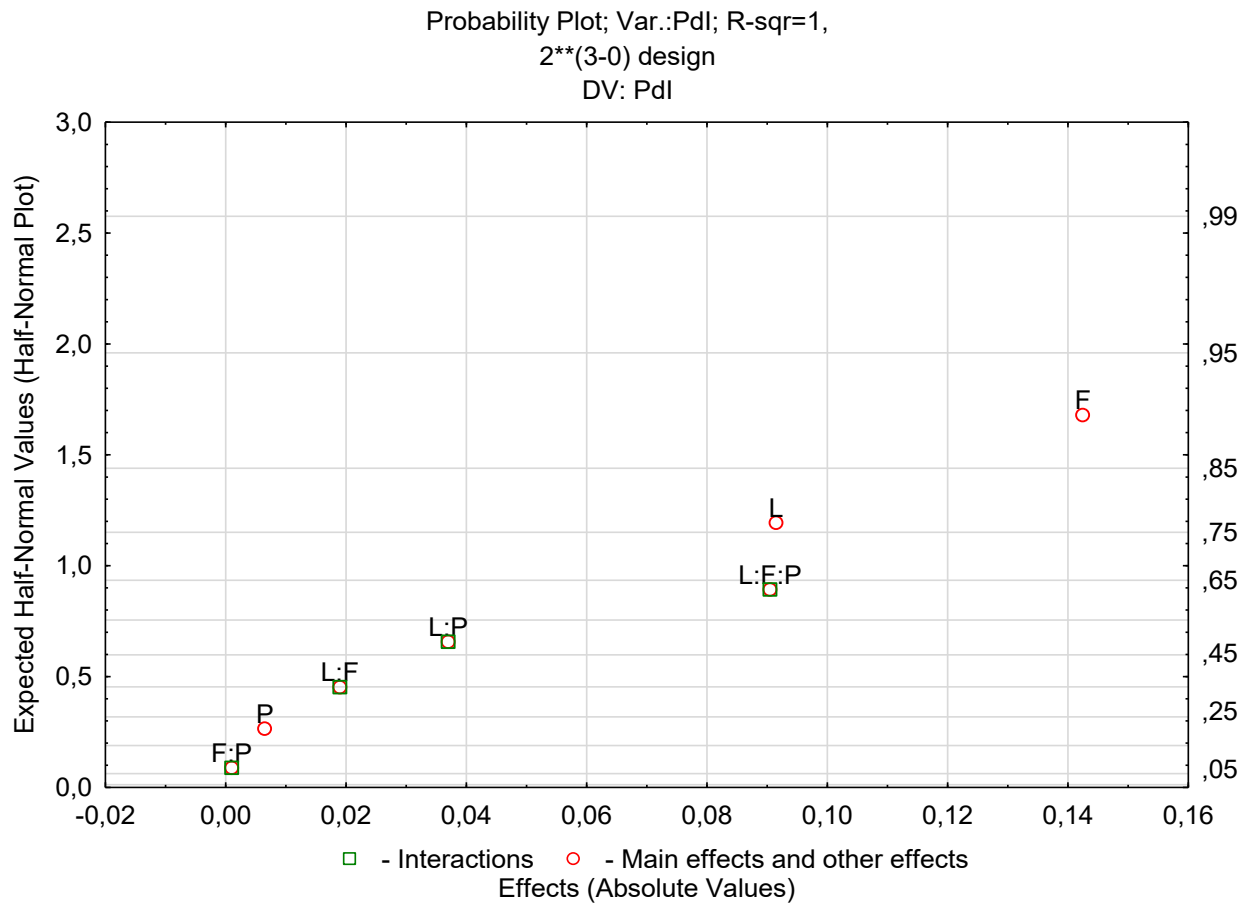
Figura 41 – *Half-Normal plot* da variável resposta concentração teórica.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 9 – ANOVA para Concentração teórica identificando (em vermelho) as variáveis que foram significativas no experimento ( $p < 0,05$ ) após redução do coeficiente de regressão L ( $R^2 = 0,99992$ ;  $Adj. = 0,99943$ ).

Fator	SS	df	MS	F	p
F	0,003570	1	0,003570	3173,444	0,011300
P	0,003916	1	0,003916	3481,000	0,010789
L:F	0,005050	1	0,005050	4489,000	0,009501
L:P	0,000120	1	0,000120	106,778	0,061417
F:P	0,000780	1	0,000780	693,444	0,024164
L:F:P	0,000406	1	0,000406	361,000	0,033475
Error	0,000001	1	0,000001		
Total SS	0,013844	7			

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Figura 42 - *Half-Normal plot* da variável resposta Pdl.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 10 – ANOVA para Pdl identificando (em vermelho) as variáveis que foram significativas no experimento ( $p < 0,05$ ) após redução do coeficiente de regressão F:P ( $R^2 = 0,99997$ ; Adj.: 0,99982).

Fator	SS	df	MS	F	p
L	0,016745	1	0,016745	8372,25	0,006957
F	0,040613	1	0,040613	20306,25	0,004467
P	0,000085	1	0,000085	42,25	0,097180
L:F	0,000722	1	0,000722	361,00	0,033475
L:P	0,002738	1	0,002738	1369,00	0,017202
L:F:P	0,016381	1	0,016381	8190,25	0,007034
Error	0,000002	1	0,000002		
Total SS	0,077284	7			

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

## APÊNDICE B – Número de mols de elétrons envolvidos segundo equação de Laviron

De acordo com a equação de Laviron a relação entre o  $E_p$  e  $\log v$  pode ser expressa da seguinte forma:

$$E_p = E^\circ + \left( \frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log \left( \frac{RT k^\circ}{\alpha n F} \right) + \left( \frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log v$$

Onde  $E^\circ$  é o potencial redox formal;  $k^\circ$  é a constante de velocidade heterogênea da reação;  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de elétrons (neste caso atribuído como 0,5 (BARD e FAULKNER, 2001));  $n$  é o número de mol de elétrons transferidos no processo;  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ );  $T$  a temperatura (298 K) e  $F$  a constante de Faraday ( $96485 \text{ C mol}^{-1}$ ).

Dessa forma, percebe-se que a equação respeita uma regressão linear com coeficiente angular equivalente a  $2,303RT/\alpha nF$ . Portanto, igualando esse termo da regressão com os coeficientes angulares obtidos experimentalmente:

Para oxidação:

$$\left( \frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) = 0,05151$$

$$\left( \frac{2,303 (8,314 \cdot 298)}{0,5 \cdot n \cdot 96485} \right) = 0,05151$$

$$n = \left( \frac{0,1182744308}{0,05151} \right)$$

$$n = 2,3 \sim 2$$

Para redução:

$$n = \left( \frac{0,1182744308}{0,0627} \right)$$

$$n = 1,9 \sim 2$$