

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA SANTOS

**“SÍNTESE NINA: UMA ESTRATÉGIA PARA PRODUÇÃO DE
NANOBASTÕES DE OURO EM LARGA ESCALA A PARTIR DO
MÉTODO MEDIADO POR SEMENTE ASSISTIDO POR ÍONS
PRATA”**

VIRTUTE SPIRITUS

1808
Salvador-Ba
Setembro de 2022

CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA SANTOS

**“SÍNTESE NINA: UMA ESTRATÉGIA PARA PRODUÇÃO DE
NANOBASTÕES DE OURO EM LARGA ESCALA A PARTIR DO
MÉTODO MEDIADO POR SEMENTE ASSISTIDO POR ÍONS
PRATA”**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Malta dos Santos

Coorientadora: Profa. Dr^a. Regina Maria Geris dos Santos

Salvador - Ba
Setembro de 2022



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA





TERMO DE APROVAÇÃO

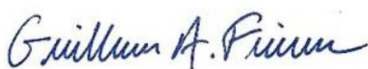
CAMILA CARVALHO DE OLIVEIRA SANTOS

“SÍNTESE NINA: UMA ESTRATÉGIA PARA PRODUÇÃO DE NANOBASTÕES DE OURO EM LARGA ESCALA A PARTIR DO MÉTODO MEDIADO POR SEMENTE ASSISTIDO POR ÍONS PRATA”


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Marcos Malta dos Santos 
Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a Luiza Amim Mercante 
Doutorado em Química, Universidade Federal Fluminense (UFF)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Guilherme Augusto Ferreira 
Doutorado em Ciências, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Madson de Godoi Pereira 
Doutorado em Ciências, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Ferreira da Silva 
Doutorado em Física, Linköping University (Suécia)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 19 de setembro de 2022.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências
e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

S237 Santos, Camila Carvalho de Oliveira

Síntese NINA: Uma estratégia para produção de nanobastões
de ouro em larga escala a partir do método mediado por semente
assistido por íons prata/ Camila Carvalho de Oliveira Santos. –
Salvador, 2022.

169 f.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Malta dos Santos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Química, 2022.

1. Nanotecnologia. 2. Química. I. Santos, Marcos Malta dos.
II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 544.18

Dedico esse trabalho aos meus familiares, em especial a Nina “in memoriam” que me ensinou, com seu exemplo, o amor.

A vida é um desafio
Fogo cruzado, eu sei
No rumo traçado me guio
No meu faro eu confio
Na busca do que sonhei

Porta fechada é nada
É mais uma lição
A perseverança me ensinou
Só conquista o que se sonhou
Com fé e determinação

Tem que ter, tem que ter
Coragem pra viver
Pra ser feliz
Tem que ter, tem que ter
Coragem pra viver
Pra ser tudo que se quis

Eu sou a esperança que quer viver
O amor no momento maior
Eu sou a certeza de quem plantou
Pra ter a colheita melhor

Quem tem vontade no coração
Quem tem pela vida paixão
Terá o seu dia de vencedor
Verá sua consagração

Nelson Rufino.

Agradecimentos

- A Deus;
- Ao professor Marcos Malta pela orientação, apoio e confiança, expresso aqui todo meu respeito e gratidão;
- À professora Regina Geris, pela coorientação e auxílio;
- À professora Claudilene Ribeiro Chaves pela ajuda fundamental nas primeiras sínteses e medidas de imagens de microscopia eletrônica de transmissão realizadas na UFMG;
- À professora Maria da Graça Carneiro da Rocha e Pascal Bargiela, pelo tempo precioso que dedicaram para me ensinar XPS, expresso aqui minha gratidão.
- À Clas Persson e Mathias Bostrom da Universidade de Oslo na Noruega pela parceria e trabalho de modelagem computacional.
- À professor Fernando Chubaci da USP pela disposição em buscar meios para as medidas experimentais dos Au-NBs.
- Aos professores do curso de Química da UFBA por ter contribuído com meu doutorado;
- Ao professor Antônio Ferreira da Silva, pela incansável dedicação e jeito próprio que nos empurra pra frente;
- Aos funcionários e técnicos da graduação e pós-graduação, pelo apoio;
- A todos os colegas da graduação e doutorado, pelo convívio e apoio;
- Aos colegas do Instituto de Química da UFBA pelo apoio;
- Aos pesquisadores Maria Lúcia Vieira Moreno, Adriana Lanfredi Rangel e Cláudio Pereira Figueira, ao técnico Márcio e Arlene da Fiocruz, pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão;
- Às professoras Rosangela Vidal e Isabel Rigoli pelo apoio;
- Ao professor Marcus Vinicius da Silva pelo apoio nas análises de microscopia de força atômica;

- Ao meu querido Daniel Lucas Freire Silva pela indicação do programa para produzir as figuras dos artigos e do presente trabalho.
- Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da UFBA (LAMUME);
- A todos os meus queridos colegas de laboratório (Messias, Marina, Jeferson, Verônica, Cristian, Sarah, Leonardo) do LBQM; a companhia de você tornou tudo melhor.
- Ao meu esposo Jackson e enteado Daniel Lucas, pelo amor, parceria e apoio.
- A todos os meus familiares, minha mãe Leny, minhas irmãs Carol e Daniela, meu filho (In memorian), meu pai Servilio, minhas tias queridas Alayde, Celeste, Iara, M^a Helena, Raimunda, Sônia..., meus tios, primos e sobrinhos, meus avós Paulo e Alayde, Benigno e Eulina (in memorian), a Nilzete –Nina (in memorian) pelo amor e referência sólida do que é família.
- Ao PPGQ, CAPES e FAPESB, pela bolsa concedida;
- Ao contribuinte brasileiro, por financiar as instituições que servem ao progresso da nossa sociedade.

Sumário

Lista de figuras.....	XI
Lista de tabelas.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XIV
Resumo	XV
Abstract	XVI
Capítulo 1. Introdução.....	17
Capítulo 2. Fundamentação teórica.....	22
2.1 Ouro, breves considerações descritivas	22
2.2 CTAB, considerações descritivas e função na síntese de nanobastões de ouro.	25
2.3 Métodos de preparo dos nanobastões de ouro.....	30
2.4 Propriedades físico-químicas das nanopartículas de ouro e suas Aplicações.....	45
Capítulo 3. Objetivos.....	54
3.1 Objetivos Gerais.....	54
3.2 Objetivos Específicos	54
Capítulo 4. Parte Experimental	56
4.1 Espectroscopia eletrônica UV-Vis	56
4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	56
4.3 Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)	57
4.4 Síntese dos Nanobastões de Ouro.....	59
4.4.1 Reagentes utilizados	59
4.4.2 Preparo dos nanobastões de ouro (Au-NBs)	59
4.4.2.1 Preparo da solução semente.....	60
4.4.2.2 Preparo da solução de crescimento	60
4.4.3 Síntese de nanobastões de ouro em larga escala (Síntese NINA).....	61
4.4.3.1 Preparo de 10 vezes de suspensão coloidal contendo Au-NBs	61
4.4.3.2 Preparo de 100 vezes da suspensão coloidal contendo Au-NBs	62
Capítulo 5. Resultados e discussões	65
5.1 Síntese mediada por semente: Espécies químicas e suas funções	69
5.1.1 Solução de Crescimento	69
5.1.2 Solução Semente.....	72
5.2 Síntese mediada por semente: transformações químicas	72

5.2.1 Solução Semente	72
5.2.2 Solução de Crescimento.	78
5.3 Mecanismos de crescimento e relação com ambiente químico dos nanobastões de ouro	84
5.4 O ambiente químico dos nanobastões de ouro e o papel da prata.....	93
5.5 Importância do XPS na elucidação do ambiente químico das nanopartículas metálicas..	102
5.6 Au-NBs síntese NINA.	107
5.6.1 Síntese NINA – 10 vezes a síntese clássica	117
5.6.2 Síntese NINA - 100 vezes a síntese clássica	129
Capítulo 6. Considerações Finais	134
Referências	136
Anexo A Artigo sobre as medidas de XPS da superfície dos Au-NBs.....	150
Anexo B Artigo sobre os bionanohíbridos de ouro e paládio	159

Lista de figuras

Figura 1: Passos da reação redox de produção dos Au-NBs.....	24
Figura 2: Fórmula em linhas do CTAB	25
Figura 3: Representação da formação da bicamada de CnTAB na superfície do Au-NBs.....	27
Figura 4: Imagem dos poros da membrana de alumina (escala= 50nm).....	31
Figura 5: Nanobastões de ouro preparados via eletrodeposição do Au(I) dentro dos poros de óxido de alumínio.....	31
Figura 6: Esquema das transformações ocorridas da síntese fotoquímica dos Au-NBs. 33	
Figura 7: Micrografias eletrônica de transmissão de Au-NBs.....	35
Figura 8: Mudança no perfil espectral associado a variação do conteúdo de íons prata na síntese dos nanobastões.....	39
Figura 9: Representação esquemática da evolução da dispersão em função do tamanho de partícula, considerando clusters cúbicos, n número de átomos.....	46
Figura 10: Representação esquemática da mudança nos níveis de energia das bandas em função do tamanho da partícula.	48
Figura 11: Representação esquemática da oscilação coletiva de elétrons (RPLS) através da interação da radiação eletromagnética com nanopartículas.....	50
Figura 12: Fotos dos sistemas na síntese de nanobastões de ouro (a) Solução contendo íons de ouro (III) e CTAB (b) solução semente (c) Solução de crescimento após adição das sementes de ouro.....	61
Figura 13: Micrografias de nanobastões de ouro com diferentes razões de aspecto e suas respectivas bandas plasmônicas dos espectros eletrônicos.....	66
Figura 14: Estrutura em linhas do Cátion CTA ⁺	70
Figura 15: Representação do preparo da suspensão de semente original (Nikoobakht e El Sayed, 2003) (a) e a suspensão de semente da síntese NINA baseada em GONZÁLEZ-RUBIO <i>et al</i> , 2019 (b).	74
Figura 16: Fotografias de béqueres contendo (a) solução aquosa 0,001mol L ⁻¹ de HAuCl ₄ ; béquer (b) solução aquosa de HAuCl ₄ 0,001 mol L ⁻¹ e CTAB 0,2 mol L ⁻¹	75
Figura 17: Imagens digitais das etapas das reações redox que ocorrem na produção da semente na síntese NINA de nanobastões de ouro e espectros óticos das soluções referidas soluções. Solução A curva vermelha, B curva azul e C curva preta.....	77
Figura 18: Espectro de UV-Vis da solução aquosa de HAuCl ₄ e da solução de crescimento pré-redução.	79
Figura 19: Imagem digital da solução de crescimento pré-redução (a) e pós redução(b)... ..	81
Figura 20: Espectro eletrônico de UV-Vis da solução de crescimento pré-redução (curva preta) e pós-redução com ácido ascórbico (curva vermelha).....	81
Figura 21: Reação de oxidação do ácido ascórbico.....	82
Figura 22: Imagem digital do crescimento dos nanobastões após a adição da semente de ouro na solução de crescimento..	83

Figura 23: Espectros eletrônicos na região do UV-Vis de a) nanobastões de ouro sintetizados no presente trabalho, b) dos nanobastões de ouro do Nikoobath e El Sayed (2003).....	84
Figura 24: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de uma amostra de nanobastões de ouro produzidos a partir da rota de síntese de Nikoobath e El Sayed (2003).....	85
Figura 25: Dupla camada de CTAB na superfície do nanobastão de ouro	87
Figura 26: Fórmula em linhas do L-ascorbato A e radical aniônico L-ascorbato B.	89
Figura 27: Espectro survey XPS e espectro ótico UV-Vis de Au-NBs.....	95
Figura 28: Espectros de alta resolução dos Au-NBs tratados por deconvolução dos elementos nas regiões (a) C 1s, (b) N 1s, (c) Br 3d, (d) O 1s, (e) Au 4f e (f) Ag3d.	96
Figura 29: Microscopia eletrônica de transmissão do bionanohíbrido fungos@NPs-AuPd em corte transversal	104
Figura 30: Espectros de alta resolução do ouro e paládio no fungos@NPs-AuPd.....	106
Figura 31: Esquema da síntese da semente (a) NiKoobakht e El-Sayed (2003) (b) Síntese NINA.....	108
Figura 32: Esquema da síntese da solução de crescimento e nanobastões (a) NiKoobakht e El-Sayed (2003) (b) Síntese NINA.....	108
Figura 33: Solução de crescimento antes (esquerda) e depois (direita) da redução com AA.....	112
Figura 34: Fracionamento da solução de crescimento.	113
Figura 35: Imagem digital da Solução semente recém preparada	114
Figura 36: Fotografia dos 100 tubos de ensaio contendo solução de crescimento após adição da solução semente.....	115
Figura 37: Processo de junção das frações após medidas de UV-Vis.	116
Figura 38: Espectros de UV-Vis das frações de Au-NBs da síntese de NINA-1.	119
Figura 39: Espectros de UV-Vis das porções de Au-NBs da síntese NINA-2.....	119
Figura 40: Espectros de UV-Vis de sínteses de Au-NBs realizadas paralelamente a partir da síntese original Nikoobakht e El-Sayed (2003).....	121
Figura 41: Espectro da Síntese NINA-1 após junção parcial das frações, centrifugação, lavagem com CTAB 1mM e re-suspensão em CTAB 1mM para realizar a medida.....	125
Figura 42: Espectro da Síntese NINA- 2 após junção parcial das frações, centrifugação, lavagem com CTAB 1mM e re-suspensão em CTAB 1mM para realizar a medida.....	125
Figura 43: Micrografia da amostra composta das frações síntese NINA.	127
Figura 44: Micrografias em diferentes magnificações e espectro UV- Vis da amostra composta.....	130

Lista de tabelas

Tabela 1: pH de soluções aquosas dos reagentes e meio reacional da síntese de Au-NBs (concentrações das soluções item no 4.4).....	71
Tabela 2: Composição química da superfície dos Au-NBs obtidos por espectro de alta resolução de XPS	98
Tabela 3: Parâmetros adquiridos via XPS dos Au-NBs de elementos metálicos em eV obtidos via experimental cálculos <i>ab initio</i>	101
Tabela 4: Máximo do RPLS e fwhm das frações da síntese NINA-1.....	122
Tabela 5: Máximo do RPLS e fwhm das frações da síntese NINA-2.	122
Tabela 6: Máximo do RPLS e o fwhm do UV-Vis das replicatas da síntese original.....	122
Tabela 7: Desvio padrão do RPLS e fwhm das frações das sínteses NINA e original.	123
Tabela 8: Média do fwhm das frações comparado ao fwhm da composta das sínteses NINA.	126
Tabela 9: Máximo do sinal longitudinal e fwhm dos espectro de UV-Vis das frações síntese.NINA.....	132
Tabela 10: Média e devio padrão do sinal longitudinal e fwhm das frações da síntese NINA para quantidade de 100 vezes a síntese clássica:.....	133

Lista de Abreviaturas

Au-NBs- Nanobastões de ouro

Au- Ouro

Au-NPs- Nanopartículas de ouro

Ag- Prata

NPs- Nanopartículas

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

UV-Vis - Ultravioleta e Visível

XPS - Espectroscopia fotoeletrônica de Raios-X

CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio

Fwhm - Largura a meia altura

CTACl - Cloreto de hexadeciltrimetilamônio

RPLS - Ressonância de plasmons localizados de superfície

SANTOS, Camila Carvalho de Oliveira. **Síntese NINA: Uma estratégia para produção de nanobastões de ouro em larga escala a partir do método mediado por semente assistido por íons prata**. Orientador: Marcos Malta dos Santos. 2022. 169f. il. Tese (doutorado em química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.2022.

RESUMO

A importância dos nanobastões de ouro (Au-NBs) se deve a suas propriedades ópticas, catalíticas, fototérmicas, e as suas variadas aplicações, com destaque para aplicações biomédicas. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo a obtenção de Au-NBs uniformes, em quantidade suficiente para avançar em várias etapas da pesquisa de aplicação, que ainda é um desafio atual. Foi proposta uma estratégia para produção de Au-NBs, em larga escala, a partir da síntese mediada por semente assistida por íons prata do Nikoobakht e El Sayed (2003), bem como a caracterização da superfície dos Au-NBs, via espectroscopia fotoeletrônica de Raios-X, para contribuir com o entendimento do papel das espécies químicas na superfície destes nanomateriais. A síntese em larga escala, nomeada NINA, foi realizada em cinco etapas. Os Au-NBs obtidos foram caracterizados utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e XPS. Como principais resultados, destacam-se a produção de nanobastões de ouro em quantidade 100 vezes maior que o obtido pelo método de síntese clássica de Nikoobakht e El Sayed (2003). Foram calculados, desvios padrão relativo (σ) do máximo da banda plasmônica de maior intensidade, para as replicatas da síntese clássica ($\sigma=19,5$) e para frações da síntese NINA ($\sigma=9,4$), e feito um comparativo entre estes dados. Os valores de σ indicaram menor dispersão para as frações NINA que para as replicadas da síntese clássica, a partir destes e outros dados, foi possível inferir sobre a viabilidade da síntese NINA. Foi proposta uma projeção para produção, via síntese NINA, de pelo menos 800 vezes mais Au-NBs que à síntese clássica. A partir dos dados de XPS, obteve-se melhor entendimento sobre o estado químico das substâncias presentes na superfície dos Au-NBs, destacando que dentre as substâncias, a prata foi encontrada em dois estados de oxidação Ag(0) (368,2 e 374,3 eV) e Ag(I) (367,4 e 373,4 eV), e estes achados contribuem para o entendimento do mecanismo de formação do Au-NBs.

Palavras – chave: Nanobastões de ouro. Síntese em larga escala. Nanotecnologia.

SANTOS, Camila Carvalho de Oliveira. **NINA synthesis: A strategy for large-scale production of gold nanorods using the silver ion-assisted seed-mediated method.** Advisor: Marcos Malta dos Santos. 2022. 169f. il. Thesis (PhD in Chemistry) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.2022.

ABSTRACT

The importance of gold nanorods (Au-NBs) is due to their optical, catalytic, photothermal properties, and their varied applications, with emphasis on biomedical applications. In this way, the present work aims to obtain uniform Au-NBs, in sufficient quantity to advance in several stages of application research, which is still a current challenge. A strategy for large-scale production of Au-NBs was proposed from Nikoobakht and El Sayed's (2003) silver-assisted seed-mediated synthesis, as well as the characterization of the surface of Au-NBs, via photoelectron spectroscopy of X-rays, to contribute to the understanding of the role of chemical species on the surface of these nanomaterials. The large-scale synthesis, named NINA, was carried out in five steps. The Au-NBs obtained were characterized using the techniques of transmission electron microscopy (TEM), electron spectroscopy in the ultraviolet and visible region (UV-Vis), XPS. As main results, the production of gold nanorods in an amount 100 times greater than that obtained by the classical synthesis method of Nikoobakht and El Sayed (2003) stands out. Relative standard deviations (σ) from the maximum of the highest intensity plasmonic band were calculated for the replicates of the original synthesis ($\sigma=19.5$) and for fractions of the NINA synthesis ($\sigma=9.4$), and a comparison was made between these data. The values of σ indicated less dispersion for the NINA fractions than for the replicates of the original synthesis, from these and other data, it was possible to infer about the viability of the NINA synthesis. A projection was proposed for the production, via NINA synthesis, of at least 800 times more Au-NBs than the classical synthesis. From the XPS data, a better understanding was obtained about the chemical state of the substances present on the surface of Au-NBs, highlighting that among the substances, silver was found in two Ag(0) oxidation states (368.2 and 374.3 eV) and Ag(I) (367.4 and 373.4 eV), and these findings contribute to the understanding of the formation mechanism of Au-NBs.

Keywords: Gold nanorods. Large-scale synthesis. Nanotechnology.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

A nanociência e nanotecnologia têm aberto portas e proposto soluções para problemas em diversas áreas do conhecimento. Por definição, a nanociência é a área que estuda os objetos na escala nanométrica (10^{-9} m), isto é, trata da manipulação de átomos, partículas e moléculas e os fenômenos atribuídos a estes nanomateriais. (TERRONES *et al.*, 2004; WHITESIDES, 2005). As propriedades dos nanomateriais são consequência da sua escala de tamanho, portanto, diferem das espécies químicas que são suas análogas, em composição química, e que estão em escala maior (macroscópica ou *bulk*). A nanotecnologia, por sua vez, pode ser definida como a produção, estudo das propriedades e aplicações de materiais nanoestruturados, sendo importante, nessa área, o controle do tamanho e da forma das partículas que compõem os nanomateriais. (TERRONES *et al.*, 2004; WHITESIDES, 2005).

O avanço das pesquisas em nanotecnologia tem sido notório, inclusive muito desse avanço se deve ao seu perfil interdisciplinar, com interação de pesquisadores na área da química, física, biologia, medicina e outras. Especialmente, o desenvolvimento da nanotecnologia na produção de nanopartículas metálicas, com destaque para os metais nobres, como ouro, prata e platina, que apresentam, devido suas propriedades óticas, catalíticas e outras, aplicações na área biomédica. (NIKOOBAKHT; EL SAYED, 2003; EL-NAGGAR; HUSSEIN; EL-SAWAH, 2017; IMAOKA *et al.*, 2017).

A evolução dos métodos de síntese dos nanomateriais à base do elemento químico ouro, com rigoroso controle no tamanho e morfologia, tem levado a obtenção de diferentes materiais como nanopartículas esféricas (EL SAYED, I., HOUANG, EL SAYED, 2005), nanobastões (Huang *et al.*, 2006), nanocubos

(SUNDARAPANDI, SHANMUGAM, AND RAMARAJ, 2022; Wang *et al*, 2021), nanofios (WANG *et al*, 2022) e nanoconchas (PARK *et al*, 2022). Apesar desses materiais serem constituídos quase que exclusivamente por ouro, eles apresentam propriedades muito distintas uns dos outros, sendo utilizados em nanosensores bioquímicos, em catálise, eletrocatalise espalhamento Raman aprimorado por superfície (SERS), dispositivos nanoeletrônicos e optoeletrônicos. (HUANG, NERETINA, EL SAYED, 2009). A obtenção de novas propriedades de nanomateriais tornou-se possível uma vez que elas estão relacionadas com tamanho e forma do nanomaterial. (LIU *et al*, 2016). O trabalho de El Sayed, e colaboradores (2005), por exemplo, apresentou importante perspectiva de uso de nanopartículas de ouro como biosensor molecular para diagnóstico e investigação de células cancerígenas epiteliais tanto *in vitro* quanto *in vivo*. As nanoestruturas de ouro têm significativa relevância para aplicações biomédicas e os nanobastões de ouro, partículas alongadas, isto é, as dimensões do comprimento são maiores que a largura, se destacam nestas aplicações incluindo *drug delivery* (QIU, *et al.*, 2015, XIAO, *et al* 2012) biosensores (SONG *et al*, 2020), imagens biomédicas (XIAO, *et al* 2012), terapia fototérmica (CHEN, *et al.* 2017), tornando possível, devido às suas propriedades e a baixa citotoxicidade dos nanobastões de ouro (Au-NBs) funcionalizados, o desenvolvimento de várias soluções para área da medicina.

Os nanobastões de ouro permitem a diversidade de aplicações citadas, devido especialmente às propriedades ópticas e fototérmicas desses nanomateriais. (JAIN, 2008). Essas propriedades decorrem dos fenômenos da absorção/espalhamento de fótons incidentes pelos nanobastões, que surgem a partir da oscilação coletiva e coerente dos elétrons da banda de condução, em um fenômeno chamado de ressonância de plasmons localizados de superfície (RPLS). O sinal RPLS pode ser observado como uma ou mais bandas num espectro UV-Vis do nanomaterial. Esse fenômeno de confinamento eletromagnético ou confinamento de fótons, ocorre particularmente para

algumas nanopartículas de metais nobres tais como ouro e prata, e induz o aumento considerável da absorção da radiação que incide sobre estes nanomateriais. A consequência disso é que as propriedades radiativas (absorção e espalhamento da luz) têm aumento significativo comparado a outros tipos de materiais (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009).

Por exemplo, Dreaden e colaboradores apresentam em sua revisão que a perspectiva de aplicação em biossensor está baseada no deslocamento do RPLS em função da mudança de ambiente químico da superfície da nanoestrutura e estudos teóricos mostram que nanobastões de ouro apresentam maior sensibilidade no RPLS que nanopartículas esféricas. Uma razão para isto, deve-se ao fato de nanoestruturas anisotrópicas, tais como nanobastões de ouro, apresentarem a oscilação coletiva de elétrons, na posição transversal e na longitudinal resultando em duas bandas no espectro óptico, uma associada ao RPLS transversal e outra ao RPLS longitudinal. Sendo que o sinal longitudinal está relacionado com a razão de aspecto do nanobastão, isto é, a razão do comprimento pela largura do nanobastão. O controle da razão de aspecto de Au-NBs é possível de ser obtida por meio de mudanças no métodos de síntese dos nanomateriais, portanto é possível obter nanobastões que apresentem o máximo do sinal longitudinal na faixa de comprimento de onda desejado e adequado ao estudo de aplicações específicas. (HUANG, NERENTINA, EL SAYED, 2009)

A importância dos nanobastões de ouro pode também ser notada com base no crescente número de pesquisas voltada a obtenção de Au-NBs com rigoroso controle de tamanho e forma. (VIGDERMAN; KHANAL; ZUBAREV, 2012). O foco desses estudos está na obtenção de nanobastões que apresentam baixa dispersividade (ou seja, com uma estreita distribuição de tamanhos) e com controle da razão de aspecto, e elevado rendimento. (GRZELCZAK, *et al.* 2008.). Com o desenvolvimento das pesquisas, muito foi alcançado em mais de duas décadas, em especial sínteses com melhores rendimentos e baixa

polidispersividade. No entanto, ainda se faz necessário além das características citadas, a obtenção de maiores quantidades dos materiais, sendo este um dos desafios da atualidade na pesquisa dos Au-NBs.

Em diversas rotas de síntese dos nanobastões de ouro, os íons prata são utilizados. Esta substância tem papel de destaque na produção destes materiais. Sua ação contribui na orientação da forma das hastes (bastões), na razão de aspecto do Au-NB, e no rendimento destes materiais. (ORENDORFF e MURPHY, 2006; LIU e GUYOT-SIONNEST, 2005;). No entanto, o mecanismo de formação dos nanobastões ainda não foi adequadamente elucidado. Existem alguns trabalhos que propõem a existência de prata metálica na superfície e no cerne do nanobastão, enquanto outras pesquisas apontam que na superfície dos Au-NBs existem íons prata. (LORSE e MURPHY, 2013; MOREAU *et al*, 2019; YE *et al*, 2020). Devido a controversa sobre a função da prata no mecanismo de formação dos nanobastões de ouro, é necessário estudar a superfície dessas nanoestruturas com o propósito de contribuir no entendimento da atuação da prata na síntese dos Au-NBs, levando ao avanço nas pesquisas destes materiais.

Em vista de uma limitação da pesquisa dos nanobastões de ouro, que é a produção de grandes quantidades de Au-NBs com baixa dispersividade, este trabalho propõe-se a formular uma estratégia de síntese em larga escala para Au-NBs pelo método mediado por semente, bem como estudar o ambiente químico superficial dos Au-NBs, a partir da técnica de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS), com propósito de entender a ação da prata na produção dos nanobastões de ouro.

Este trabalho de doutorado será dividido em 6 Capítulos. No capítulo 2 será apresentada uma revisão na literatura, no capítulo 3 será apresentado os principais objetivos, no capítulo 4 será descrita a parte experimental do trabalho,

o capítulo 5 irá conter os resultados e discussões e por fim o capítulo 6 será as considerações finais do trabalho de doutorado.

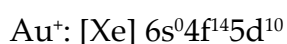
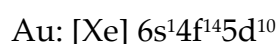
CAPÍTULO 2

2. Fundamentação Teórica

2.1. Ouro, breves considerações descritivas

O ouro é um elemento metálico de transição com número atômico 79. Apesar de seus átomos apresentarem orbitais d completamente preenchido, dão origem a pelo menos um íon com o subnível d parcialmente preenchido na camada de valência. Por esta razão é elemento de transição. Como tal, os íons ouro, apresentam algumas características como a formação de complexos com grande número de ligantes. Os compostos constituídos por este elemento, possuem propriedades catalíticas relevantes tanto para indústria quanto para sistemas biológicos. (CHANG, 1994, p.980; BARROS, 1992, p.445, 449).

As configurações eletrônicas do elemento ouro, cátion ouro (I) e cátion ouro(III) são descritas como:



Como propriedades organolépticas, o ouro massivo é mole e de coloração amarela, além de ser mais dúctil e maleável quando comparado a outros elementos conhecidos, como Cu e Zn. Como características importantes, o ouro é um metal pouco reativo e não reage, por exemplo, com oxigênio ou enxofre. Porém, reage com halogênios, tais como soluções que contenham ou produzam cloro a exemplo da água régia. A reação do ouro com a água régia produz um

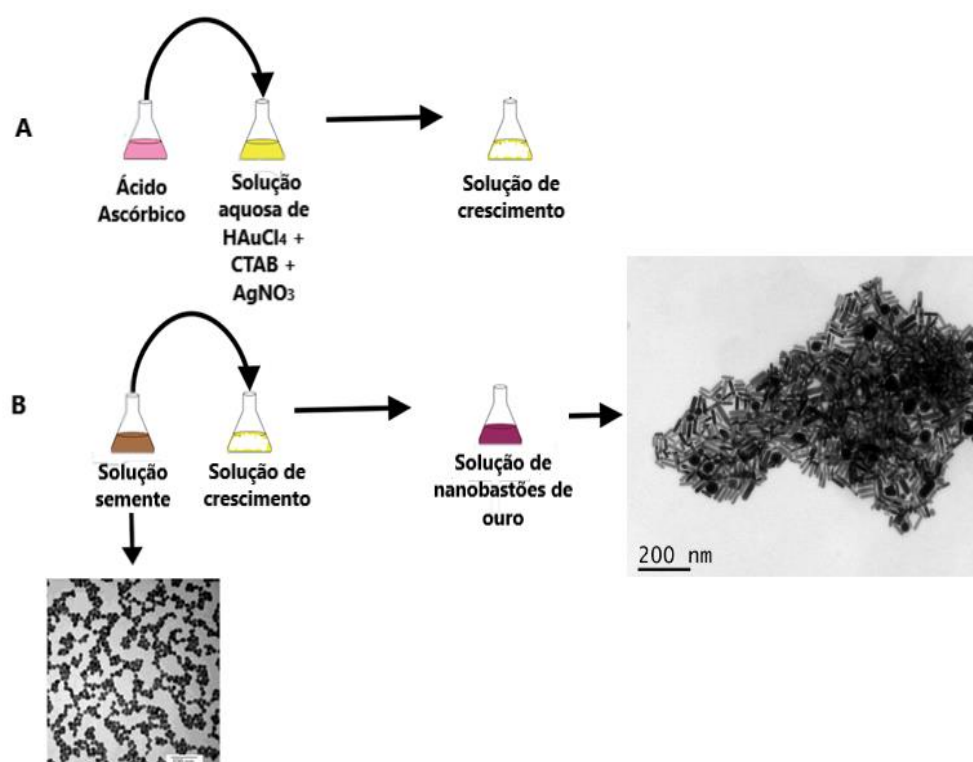
composto de coordenação e a solução que contém o complexo, após evaporada, apresenta um sólido cristalino amarelo de fórmula $[\text{H}_3\text{O}][\text{AuCl}_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Esta espécie contém o íon complexo, tetracloroaurato (III), AuCl_4^- que é o precursor de muitos preparos de nanopartículas de ouro. (COTTON e WILKINSON, 1978, p.462, 464)

A espécie química, AuCl_4^- , que é precursora de grande parte dos nanomateriais de ouro é um composto de coordenação, cujo número de oxidação do ouro é 3+. Portanto, para obter a nanopartícula metálica, cujo número de oxidação das espécies de ouro é zero, é necessária uma reação de oxirredução. (EDGAR, MCDONAGH, CORTIE, 2012; BASOLO, 1976). Especificamente a síntese dos nanobastões de ouro requer mais do que uma reação redox associada à estratégia de controle do tamanho das partículas. Sua produção necessita de mecanismo de controle de forma, e isto é um desafio considerável. Existem rotas de síntese que utilizam diferentes estratégias para permitir a formação das nanopartículas metálicas, por exemplo, síntese eletroquímica, fotoquímica, *template* com a presença de agente redutor etc.

Atualmente, a “metodologia mediada por semente e assistida por prata” é a rota mais popular para obter Au-NBs em rendimentos consideravelmente altos. A síntese é dividida em duas etapas: inicialmente, são preparadas, via redução com borohidreto de sódio, sementes de ouro com diâmetro médio de 2,0 nm, capeadas por brometo de hexadeciltrimetilamônio, CTAB. Na segunda etapa, as sementes de ouro são adicionadas a uma solução de crescimento aquosa, contendo HAuCl_4 , CTAB, AgNO_3 e um agente redutor suave, como o ácido ascórbico (Figura 1). A morfologia final em relação às dimensões e proporção de aspecto pode ser influenciada, variando a concentração de nitrato de prata. (ALMORA-BARRIOS *et al* 2014; NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003; OLIVEIRA *et al*, 2021)

Na figura 1, a seguir são apresentados os passos gerais da reação redox na produção dos nanobastões de ouro, separados em etapas.

Figura 1: Passos da reação redox de produção dos Au-NBs



Fonte: adaptada de HINMAN *et al*, 2016 e SHAH *et al* 2014

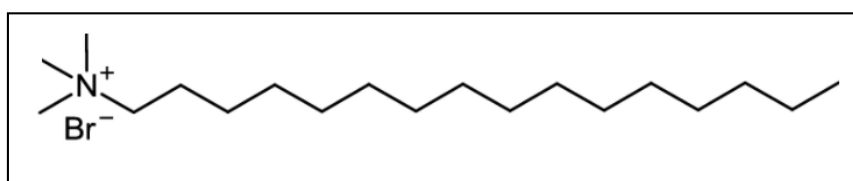
Na etapa A, estão representados uma solução aquosa contendo íons Au(III) , oriundo do HAuCl_4 , íons CTA^+ , íons Brometo Br^- , oriundos do CTAB e íons prata (I) Ag^+ , cujo precursor é AgNO_3 . Esta solução, chamada de *solução de crescimento*, apresenta coloração amarelo intenso. Neste ponto, ao sistema é

adicionado um agente redutor, o ácido ascórbico, levando a redução dos íons ouro Au(III) para Au(I) observado nesta etapa. Em seguida, na etapa B, é adicionado a solução semente de ouro Au(0) cujo agente estabilizante das nanopartículas é o CTAB. Neste ponto, inicia-se o processo de crescimento do nanobastão envolvendo, além de um processo redox, $\text{Au(I)} \rightarrow \text{Au(0)}$, a interação de substâncias presentes no sistema, CTA^+ , Ag^+ e Br^- , com a nanopartícula, permitindo o crescimento da forma de bastonete. (NIKOUBAKTH e EL SAYED, 2003)

2.2. CTAB, considerações descritivas e função na síntese de nanobastões de ouro.

Uma das substâncias que tem fundamental importância na produção dos nanobastões de ouro, é o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), cujo nome IUPAC é brometo de hexadeciltrimetilamônio. O CTAB é uma substância de fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$, cuja fórmula em linhas apresentado na Figura 2 abaixo:

Figura 2: Fórmula em linhas do CTAB



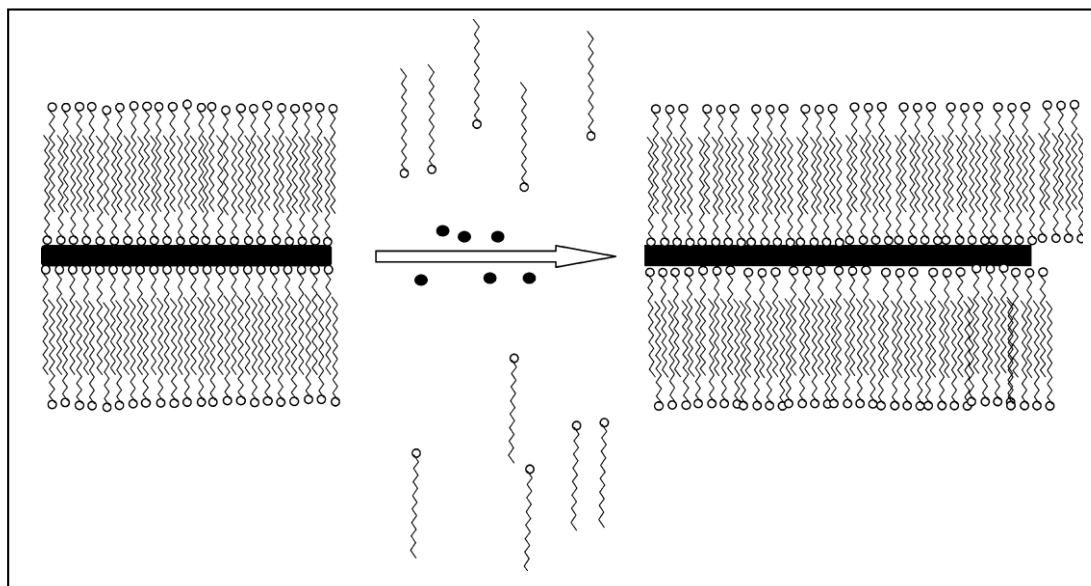
O CTAB é um pó branco cristalino iônico e forma soluções aquosas transparentes. Este reagente é comumente utilizado nas sínteses de nanobastões de ouro para o direcionamento de forma e como estabilizantes de

nanopartículas. Além disso, na síntese eletroquímica dos Au-NBs, o CTAB é usado como eletrólito de suporte. (YU, 1997; NIKOOBAKHT e EL SAYED, 2003)

O CTAB é um dos reagentes chave para a obtenção dos nanobastões de ouro via rota de síntese mediada por semente. Sem ele ainda não foi possível obter nanobastões de ouro de qualidade, isto é, com razão de aspecto desejada (específico associado às pesquisas de aplicação) e pouco polidisperso, sendo que um material pode ser chamado polidisperso se a distribuição do tamanho de suas partículas é ampla. (JANA, 2003; ANDERSON *et al*, 2013; HU, CRIST e CLOGSTON, 2020). O CTAB, portanto, exerce um papel primordial na produção deste nanomaterial e assim é necessário compreender os pormenores da ação do CTAB na síntese dos nanobastões e sua relevância ao estudo destas nanopartículas de ouro. Alguns grupos de pesquisa, a exemplo o do pesquisador Mostafa El Sayed e da pesquisadora Catherine Murphy, se dedicaram ao estudo da função que o CTAB possui na síntese dos Au-NBs.

Nikoobakth e El Sayed (2001 e 2003) propuseram uma análise qualitativa do mecanismo de crescimento dos nanobastões de ouro na síntese mediada por semente e considerações sobre qual é o papel do CTAB. Uma das possibilidades da forma como este surfactante age na produção dos Au-NBs é como um molde (*template*). Na síntese, após introdução da semente na solução de crescimento, esta, por sua vez, teria sua superfície recoberta com CTAB, na solução de crescimento a semente faria parte do *template*. O crescimento do bastão teria início a partir da difusão das espécies iônicas de ouro livre na solução, através do molde, como mostra a Figura 3 a seguir. (JOHNSON *et al* 2002; NIKOOBAKTH e EL SAYED, 2003).

Figura 3: Representação da formação da bicamada de CnTAB na superfície do Au-NBs.



Fonte: GAO, BENDER e MURPHY, 2003

Nikoobakht e El-Sayed (2001) fizeram um estudo utilizando análise termogravimétrica (TGA), entre outras técnicas, para avaliar qual o papel do CTAB no mecanismo de crescimento dos Au-NBs. Foram avaliadas duas possibilidades sobre como o CTAB atua no Au-NBs: formando micela ou uma bicamada. No estudo, foram realizadas medidas de TGA em uma solução contendo a mistura de surfactantes, CTAB e TOAB (brometo de tetraoctilammonio) e foi comparado com uma solução dos nanobastões de ouro preparada com os mesmos surfactantes. A partir dos dados obtidos, foram observados três sinais no TGA da solução de Au-NBs: o primeiro sinal em 230°C foi atribuído aos surfactantes livres, o segundo sinal foi associada a surfactante não ligado diretamente ao Au-NBs em 275°C, e ao terceiro sinal foi atribuído ao surfactante ligado diretamente ao nanobastão de ouro. Com base nestes dados,

pôde-se apoiar a proposta da formação da bicamada de surfactante sobre a superfície dos nanobastões de ouro. Atribuiu-se que certa população das moléculas de surfactante está ligada à superfície do nanobastão de ouro através do grupo amina, esta interação eletrostática é a mais forte. Outra parcela dos surfactantes, estão interagindo via cadeia carbônica, por meio de interações de London, com a cadeia carbônica dos CTAB e TOAB que estão ligados diretamente aos Au-NBs, formando assim uma bicamada de surfactantes ao redor do nanobastão de ouro. A Figura 3 acima representa bem a bicamada proposta. A investigação sobre o papel do CTAB na formação dos nanobastões continuou provendo muitos outros artigos elucidando outras questões relevantes. (NIKOOBAKHT E EL-SAYED, 2001)

Gao, Bender e Murphy (2003) utilizaram medidas de difração de elétrons e microscopia eletrônica de alta resolução, e identificaram naquele estudo que a extremidade do nanobastão de ouro se refere a face (111) do ouro. Já as laterais do bastonete têm face (100). Com base nesses dados os autores propuseram que devido a questões estéricas, o grupo amina do CTAB, uma amina quaternária, um grupo volumoso, tem preferência pela face que possui maior espaçamento entre átomos de ouro, isto é, a face (100) da lateral do bastão comparada à face (111) que é mais compacta. A proposta feita por Gao, Bender e Murphy (2003) contribuiu para o entendimento do mecanismo de crescimento do Au-NBs, que se deve a interação preferencial do surfactante por determinada face cristalina e a consequente ação do mesmo em causar impedimento, ou melhor, redução significativa do crescimento do cristal de ouro a partir da face (100), sendo assim, melhor compreendido o papel do CTAB em orientador do crescimento da nanopartícula na forma de bastonete. Além disto, os autores investigaram a influência que o comprimento da cadeia carbônica do surfactante tem sobre a produção do Au-NBs, e concluíram que tem importância crítica para a formação da partícula alongada.

Para uso de nanobastões de ouro, bem como qualquer outra espécie química na medicina, é necessário que a substância não cause efeito maléfico à organismos, isto é, seja compatível com tecidos, órgãos etc. O CTAB é uma espécie citotóxica, ou seja, tóxica para células. A síntese dos nanobastões de ouro, requer o uso do CTAB, no entanto o uso destes nanomateriais na medicina está condicionado a retirada do CTAB da sua composição para implementar as aplicações dos Au-NBs. Um problema neste processo de retirada do CTAB da nanoestrutura, é que isto resulta na agregação e destruição dos Au-NBs, uma vez que este surfactante é agente estabilizante. Utilizou-se então uma estratégia que consistiu na substituição do CTAB por uma espécie que não é citotóxica e compatível com organismos vivos. Desta maneira pode-se obter Au-NBs biocompatível. (NIIDOME *et al*, 2006)

Niidome e colaboradores (2006) propuseram a substituição do CTAB por polietilenoglicol modificado (mPEG-SH), este último interage com a superfície do Au-NBs através de ligação de sulfeto, ligação covalente entre os grupos -SH e os átomos de ouro. Os autores utilizaram a estratégia de centrifugação da suspensão de Au-NBs a fim de decantar as nanopartículas separando-as da solução rica em CTAB. A solução sobrenadante foi descartada, e os Au-NBs foram re-suspendidos em água, diminuindo, assim, o excesso do surfactante. Em seguida foi adicionado mPEG-SH e a solução ficou em agitação por 24h para que o processo de substituição do mPEG-SH pelo surfactante ocorresse, por fim, à solução foi submetida à dialise por 3 dias, com o objetivo de retirar o CTAB da solução. Muitas foram as propostas de substituição de várias espécies químicas ao CTAB e a pesquisa de aplicações avançou graças a essa estratégia.

O processo de substituição de ligantes (agente estabilizante) da superfície de nanopartículas, com a finalidade de torna-las biocompatíveis ou conferi-lhes propriedades úteis para determinadas aplicações pode ser entendido como a funcionalização de nanopartículas. (CHEN *et al*, 2022). A estratégia da

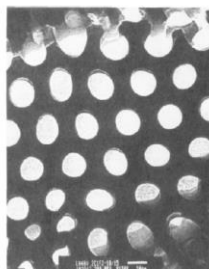
funcionalização tem permitido aplicações de destaque tais como desenvolvimento de sensores via efeito SERS (MEYER e MURPHY, 2022), nanosonda de monitoramento de doenças (SOLIMAN *et al*, 2022), terapia fototérmica associada a terapias alvo (CHIEN *et al*, 2021)

2.3 Métodos de preparo dos nanobastões de ouro

Os nanobastões de ouro são nanoestruturas recobertas com uma espessa camada de CTAB. A obtenção dos nanobastões, se iniciou na década de 1990 com trabalhos de Foss, Tierney e Martin (1992); Foss e colaboradores (1994); Foss e colaboradores (1992); Van Der Zande e colaboradores (1997) utilizando a síntese eletroquímica nos poros de uma membrana ou óxido de alumínio anodizado como “*template*”, isto é, um molde na forma de bastonete, observe imagem na Figura 4. YU e colaboradores (1997) também utilizaram a síntese eletroquímica, porém com o auxílio de surfactantes. (CEPAK and MARTIN, 1998; FOSS *et al* 1992; VAN DER ZANDE, 1997).

Com o passar dos anos, a pesquisa foi avançando e possibilitando a obtenção de nanobastões em quantidades maiores e mais homogêneos a partir de métodos mais simples, melhorando o controle de tamanho e forma destes materiais. Na maioria das rotas de síntese são utilizados reagentes importantes que contribuem com a produção dos Au-NBs, incluindo o ácido tetracloroáurico HAuCl_4 , CTAB e o nitrato de prata AgNO_3 .

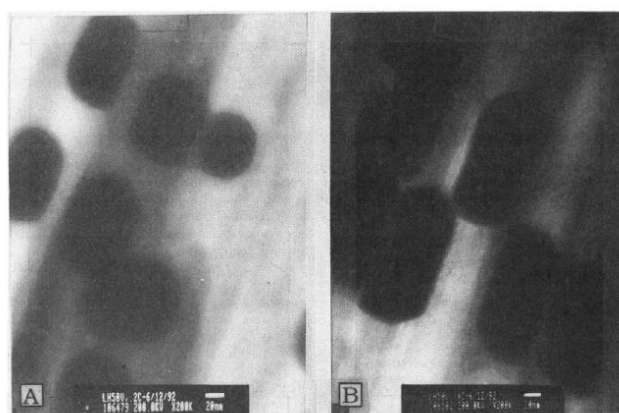
Figura 4: Imagem dos poros da membrana de alumina (escala= 50nm)



FONTE: FOSS *et al*, 1994

As cavidades observadas na membrana de alumina, na Figura 4 acima, apresentam dimensões nanométricas e forma alongada. Os reagentes inseridos no interior destas cavidades se transformam, via uma reação eletroquímica, em nanopartículas de ouro, onde a forma e dimensão destas partículas são dadas pelas cavidades (poros), formando então nanobastões de ouro, conforme é observado na Figura 5.

Figura 5: Nanobastões de ouro preparados via eletrodeposição do Au(I) dentro dos poros de óxido de alumínio



(FONTE: FOSS *et al*, 1994)

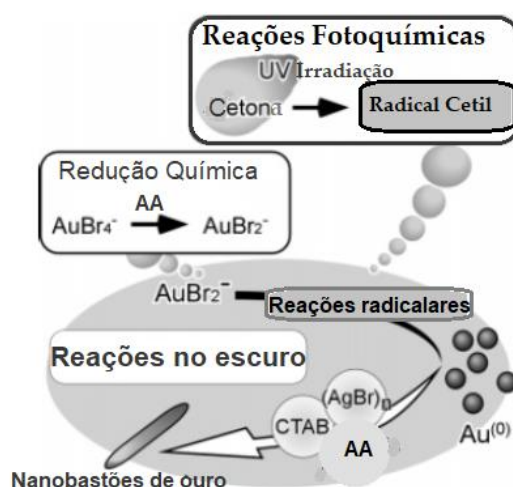
Na síntese, os metais eram depositados nos poros dos moldes por redução eletroquímica da solução do íon metálico. A produção de nanobastões de ouro usando a membrana porosa de óxido de alumínio como *template* se dá pela eletrodeposição da solução do íon ouro, e posteriormente a eletrodeposição de pequena quantidade de cobre. A finalidade do uso do cobre é permitir a liberação adequada dos nanobastões de ouro do *template*. Após a síntese dos nanobastões, essas nanoestruturas ficam dentro da membrana. Para retirá-las, o *template* era dissolvido em solução alcalina e, em seguida o cobre é dissolvido da superfície dos nanobastões, liberando-os. (VAN DER ZANDE, 1997). A vantagem da rota eletroquímica em molde é a boa uniformidade e razão de aspecto controlada dos Au-NBs. (KIM, SONG e YANG, 2002) A grande limitação deste método é o baixo rendimento da síntese, em que se produz quantidades muito pequena dos nanobastões de ouro. (PÉREZ-JUST *et al*, 2005). Devido a necessidade de obtenção de quantidades maiores de Au-NBs, a pesquisa seguiu em busca de outros métodos adequados a atender esta demanda.

Em 1995, foi publicado um trabalho por Esumi, Matsuhisa e Torigoe (1995) que descreve a produção de nanobastões de ouro via irradiação ultravioleta em ambiente com *template* catiônico, isto é, o cloreto de hexadeciltrimetilamônio. Esta rota de síntese ficou conhecida como **síntese fotoquímica**. Ela é uma rota para produção de nanobastões de ouro que consiste em utilizar a radiação na faixa do ultravioleta para iniciar a formação do nanobastões.

Um interessante trabalho foi realizado via rota fotoquímica, por Nishioka, Niidome e Yamada (2007). Foi preparada uma solução aquosa contendo CTAB, ácido tetracloroáurico, seguido da adição de nitrato de prata e acetona. Outro sistema reacional também foi preparado na ausência de acetona. Após estes preparos, foi adicionado ácido ascórbico nos sistemas reacionais, um agente redutor brando. As transformações químicas que ocorreram no sistema reacional foram acompanhadas por espectroscopia ótica na região do UV-Vis. No sistema,

foi observado uma banda em torno de 400 nm, relativa à espécie AuBr_4^- , sendo esta espécie resultante da substituição dos íons cloreto do AuCl_4^- por íons Br^- , proveniente do CTAB. Em seguida, foi adicionado ácido ascórbico, observando, então, o desaparecimento da banda em 400nm, devido a redução do ouro, Au(III) da espécie AuBr_4^- para Au(I) , resultando em AuBr_2^- . Neste ponto, não foram observadas bandas que pudessem ser associadas à formação de nanopartículas. Estes sistemas foram submetidos à irradiação com radiação ultravioleta por 30 min e após isto, notou-se a formação de bandas em 840 nm e 520 nm, associadas a bandas plasmônicas características dos nanobastões de ouro. Medidas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das amostras confirmaram a presença de nanobastões de ouro. O sistema preparado na ausência de acetona foi submetido aos mesmos procedimentos citados acima, porém não foi registrado a formação de bandas plasmônicas após irradiação UV. A compreensão do que ocorre nesta síntese foi esquematizada na Figura 6.

Figura 6: Esquema das transformações ocorridas da síntese fotoquímica dos Au-NBs



Fonte: (NISHIOKA, NIIDOME E YAMANDA, 2007) modificada

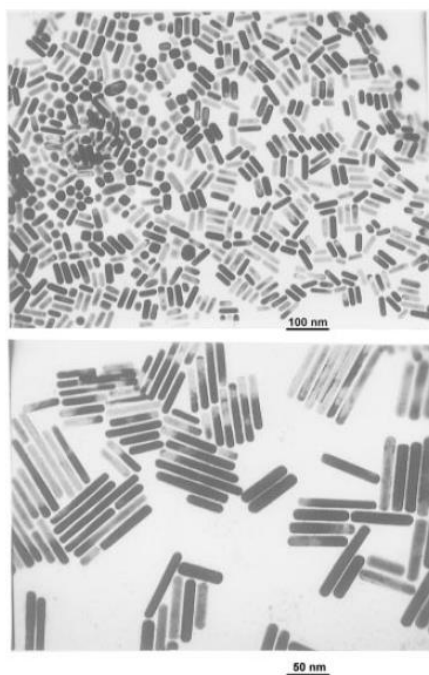
A Figura 6 indica que a síntese fotoquímica ocorre inicialmente com redução química do Au^{3+} para Au^+ , devido à reação do AuBr_4^- com ácido ascórbico (AA). Em seguida, há a irradiação UV e a acetona é, por sua vez, fotoexcitada pela radiação UV, vai para um estado tripleto e, em seguida, abstrai um átomo de hidrogênio de uma molécula orgânica presente no sistema, esta reação produz radicais cetil. Os radicais cetil, por sua vez, reduzem Au^+ para Au^0 . A presença do CTA^+ e Ag^+ , contribui para o direcionamento da forma de bastão. (ARHMED e NORAIN, 2010; DONG e ZHOU, 2007; GRZELCZAK –MARZAN, 2014; KIM, SONG, YANG, 2002; NISHIOKA, NIIDOME E YAMANDA, 2007).

A síntese fotoquímica tinha como objetivo, também, contribuir com a elucidação do mecanismo de formação do nanobastões de ouro. (KIM, SONG, YAN, 2002). Uma importante vantagem desta síntese é a distribuição uniforme do agente redutor em toda a solução (GRZELCZAK, MARZAN, 2014). A principal desvantagem na síntese fotoquímica é a não eficiência no controle da nucleação, uma vez que, enquanto há irradiação UV e a presença dos precursores, ocorre continuamente a formação dos núcleos. (LEONTIDIS *et al*, 2002).

Em 1997, YU-YING YU desenvolveu um trabalho, que consistiu numa síntese eletroquímica com altos rendimentos de Au-NBs. A obtenção de Au-NBs ocorria em uma célula eletroquímica contendo dois eletrodos: um deles era um eletrodo de ouro metálico, que atuava como ânodo (eletrodo de sacrifício) e o segundo eletrodo de platina, que atuava como cátodo da célula eletroquímica. Os dois eletrodos eram imersos numa solução eletrolítica aquosa de CTAB, cuja função, segundo os autores, além de eletrólito suporte, seria de agente estabilizante da nanopartícula. O co-surfactante também foi adicionado ao sistema para contribuir com o controle da forma de bastão e o co-surfactante utilizado era o brometo de tetraoctilamônio (TOAB). Acetona também era adicionada ao sistema eletrolítico.

Uma eletrólise de corrente controlada foi usada durante todo o processo e, em um tempo de eletrólise típico de 30 min com a síntese foi realizada sob ultrassom. O processo consistiu na oxidação do eletrodo de ouro, eletrodo de sacrifício, formando espécies iônicas de ouro, seguida de uma redução destas espécies, produzindo os nanobastões de ouro. Como pôde-se notar, a fonte de ouro nesta síntese é o próprio eletrodo de ouro metálico, que sofreu um processo de oxidação eletrolítica. Neste período, 1997, o mecanismo da reação nessa rota de síntese ainda não era conhecido, no entanto os autores afirmam que as evidências sugerem que a ação da acetona seria facilitar a incorporação do co-surfactante (TOAB) e induzir a forma de bastonete. (NIKOOBAKTH E EL SAYED, 2001; YU-YING YU *et al*, 1997). Medidas de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados e confirmaram a produção dos nanobastões de ouro como mostra a Figura 7.

Figura 7: Micrografias eletrônica de transmissão de Au-NBs



Fonte: YU-YING YU *et al*, 1997

A síntese eletroquímica representou um avanço na produção de nanobastões de ouro, uma vez que podia sintetizar maiores quantidades destas nanopartículas quando comparado com métodos anteriores. No entanto, o controle da formação de subproduto, as nanopartículas esféricas, não era efetivo. A pesquisa seguiu, e outros métodos de síntese de nanobastões de ouro foram propostos, surgiu assim o **método mediado por semente**.

No ano 2000, o grupo da professora Catherine J. Murphy, da Universidade do Sul da Califórnia, buscava otimizar a síntese de nanopartículas esféricas de ouro para obtenção de um produto com uma distribuição mais estreita de tamanhos. Para isso, foi estruturada a síntese por via de semente, que consistia na redução de íons ouro de forma controlada, para obter nanopartículas com diâmetro máximo de 100 nm. O passo seguinte era promover a redução de ouro sobre as “sementes” previamente formadas. Entretanto, os autores notaram a formação de partículas na forma de bastões, um indicativo que o mecanismo de nucleação e crescimento teria que ser elucidado. (JANA, GEARHEART e MURPHY, 2001-a)

A síntese proposta consistiu em etapas, nas quais o preparo da semente (nucleação) seria separado, no tempo, do crescimento das nanopartículas de ouro. Como resultado, nos produtos desta síntese, foram observados nanobastões em meio às nanopartículas aproximadamente esféricas. Na referida síntese, a etapa da produção da semente, Jana, Gearheart e Murphy (2001a) utilizaram o método Frens, isto é, à uma solução aquosa de ácido tetracloroaurico sob agitação e aquecimento, adicionou-se uma solução aquosa de citrato de sódio. Nesta etapa, para a obtenção da semente, o citrato de sódio foi usado como agente redutor e agente estabilizante da nanopartícula de ouro com cerca de 12nm.

Num trabalho posterior, submetido quase 7 meses depois, intitulada “*Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods*”, os autores

sintetizaram nanobastões de ouro, usando o método mediado por semente proposto por eles. Na síntese, haviam duas etapas separadas, i- o preparo da semente e posterior ii-crescimento dos nanobastões com a mediação da semente previamente preparada. (JANA, GEARHEART E MURPHY, 2001b). O preparo da semente na referida síntese de nanobastões foi realizado com basicamente três reagentes em meio aquoso e temperatura de 25°C: o ácido tetracloroáurico, usado como fonte de ouro, o citrato trissódico, utilizado como agente redutor e estabilizante das nanopartículas e o borohidreto de sódio como agente redutor forte. No preparo da semente, foi possível obter nanopartícula com tamanho de cerca de 3,5nm, tamanho bem menor comparado àquela feita pelo método Frens. Na etapa seguinte, no preparo da solução de crescimento, foi utilizada uma solução contendo ácido tetracloroáurico e um surfactante, o CTAB, este mesmo surfactante já havia sido utilizado em outros métodos de síntese dos nanobastões de ouro, a exemplo do trabalho de Esumi, Matsuhisa e Terigoe (1995). Na síntese mediada por semente, Jana, Gearheart e Murphy (2001b) utilizaram o ácido ascórbico como agente redutor brando, levando o Au(III) a Au(I) na solução de crescimento, seguido da adição da solução semente preparada previamente, mantendo este sistema estático até a mudança de cor se consolidar, resultando na obtenção de nanobastões de ouro.

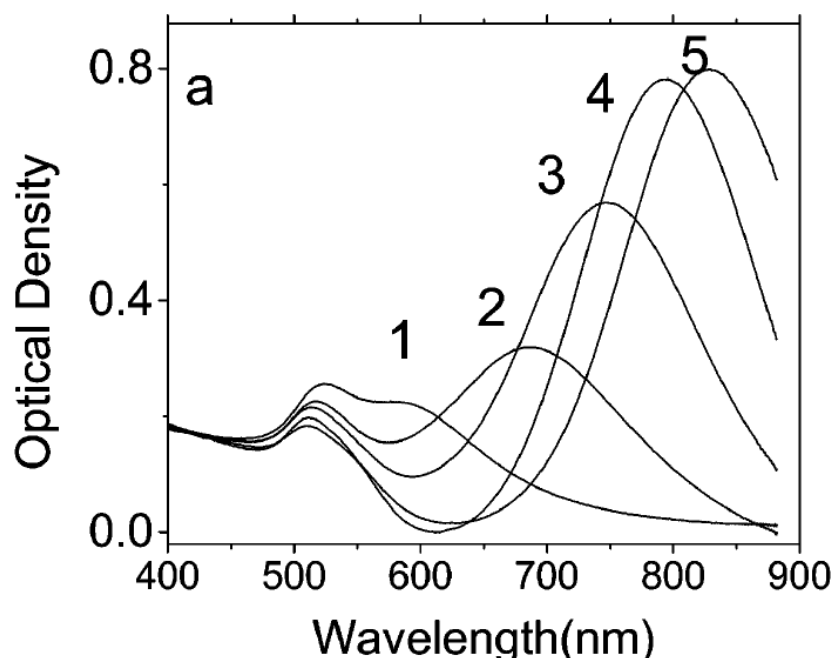
Jana, Gearheart e Murphy (2001b) usaram o CTAB como um *template* micelar e a adição da semente (núcleos) à solução de crescimento, contendo ouro (I), resultou na formação controlada de nanobastões de ouro. Os autores acreditavam que esta síntese comparada às sínteses, via *template*, a exemplo do trabalho do FOSS e outros (1994), seria mais prática para proporcionar, por exemplo, a síntese em larga escala. Porém, como visto ao longo do tempo, a quantidade de síntese mediada por semente, com boa qualidade de nanobastões e elevado rendimento, é pequena, (aproximadamente 10mL). (JANA, GEARHEART E MURPHY, 2001b). Ainda num outro trabalho, desenvolvido concomitantemente à pesquisa do primeiro e publicado como comunicação na

“Advanced Materials”, Jana, Gearheart e Murphy, (2001-c), adicionam íons prata, através do nitrato de prata, à solução de crescimento da síntese, pois, como já havia sido relatado na literatura, esta espécie (Ag^+) contribui para o controle da forma do nanobastão de ouro, propiciando razão de aspecto maior para os Au-NBs.

Tempos depois, Nikoobakth and El Sayed (2003), modificaram a síntese de Jana, Gearheart e Murphy, (2001c), uma vez que, nesta, ainda era produzida grande quantidade de nanoesferas como subproduto. Eles utilizaram CTAB como agente estabilizante da semente em vez de citrato de sódio e modificaram as quantidades de nitrato de prata presente na solução de crescimento e como resultado, foi observada redução de nanoesferas formadas concomitantemente aos nanobastões de ouro estabelecendo assim o método mediado por semente que tem sido utilizado na pesquisa, sendo modificado e melhorado ao longo do tempo. Este método de síntese tem contribuído de forma significativa nos avanços da pesquisa de nanobastões de ouro.

As mudanças propostas por Nikoobakth and El Sayed (2003) resultaram em grande impacto sobre a síntese mediada por semente, uma vez que permitiu além de uma síntese mais homogênea, menor quantidade de subproduto, isto é, enquanto a síntese de Jana, Gearheart e Murphy, (2001c) produzia cerca de 40-50% de nanoesferas, as mudanças propostas por Nikoobakth and El Sayed (2003) promoveram uma síntese com quantidades menor que 1% de nanoesferas e aumento do rendimento dos nanobastões. Outro avanço significativo que foi a possibilidade do controle da razão de aspecto dos nanobastões, via, principalmente, a variação nas quantidades de íons prata. Os autores citam que a possibilidade de controle da razão de aspecto em função da variação da quantidade de íons prata se dá nas condições que o agente estabilizante da semente é o CTAB e este controle efetivo não ocorre quando o estabilizante da semente é o citrato de sódio. Na Figura 8, é apresentada a mudança no perfil espectral de Au-NBs para diferentes concentrações dos íons prata (I).

Figura 8: Mudança no perfil espectral associada à variação do conteúdo de íons prata na síntese dos nanobastões.



Fonte: NIKOOBAKTH AND EL SAYED (2003)

De acordo com os resultados de Nikoobakth e El Sayed (2003), o aumento na concentração de íons prata, do gráfico 1 para o 5, na Figura 8, até certo ponto resultou no desvio da banda longitudinal para regiões de comprimento de onda maiores, isto é, indicando um aumento na razão de aspecto dos Au-NBs decorrente do aumento do comprimento dos bastonetes. Estes autores citam não saber como a prata leva ao aumento da razão de aspecto dos Au-NBs. Jana, Gearheart e Murphy, (2001c) propuseram que íons prata são adsorvidos na superfície das nanopartículas de ouro na forma de AgBr e isto controla o crescimento levando à forma de bastonete, além de estabilizar o Au-NBs. Estas considerações foram muito importantes para o desenvolvimento das pesquisas

para melhor entender o papel da prata na síntese mediada por semente dos Au-NBs.

A busca por métodos, que permitem obter grandes quantidades de Au-NBs de qualidade continuou seguindo. A síntese mediada por semente, com todas suas vantagens de rendimento, controle da razão de aspecto dos bastonetes e homogeneidade ainda tem a desvantagem, que é a quantidade da suspensão dos Au-NBs estar limitada a cerca de 10 mililitros. É necessário entender o que representa esta quantidade de suspensão de Au-NBs em massa de ouro. Pode-se considerar que, para produzir 10 mililitros de suspensão de Au-NBs, partiu-se da massa de cerca de 0,98 miligramas de Au^{3+} , cujo precursor foi HAuCl_4 (desconsiderando a massa de ouro oriunda da semente). Supondo, que toda quantidade de matéria de ouro presente no meio reacional fosse convertida em nanobastões de ouro, o que de fato não ocorre, e considerando, também, que não houvessem perdas nas etapas de limpeza que ocorrem após a síntese, seria obtido 0,98 miligramas de Au-NBs (desconsiderando a massa das substâncias na superfície dos nanobastões). (NIKOOBAKTH e EL SAYED, 2003) Aproximadamente 1 miligrama de Au-NBs é uma quantidade insuficiente para avançar em várias etapas dos estudos de aplicações, em especial as aplicações em terapia fototérmica *in vivo*, portanto faz-se necessário uma estratégia para a produção de Au-NBs em larga escala. Neste contexto surgiu o **método seedless**.

O método “seedless” contém todos os reagentes fundamentais similares àqueles utilizados no método mediado por semente. O sistema contém ácido tetracloroaurico como fonte de ouro, o CTAB como agente estabilizante para o controle da forma dos nanobastões, nitrato de prata como fonte de íons prata que contribuem no controle da forma e na razão de aspecto da nanopartícula, e os agentes redutores. No caso da síntese seedless, são utilizados dois agentes redutores, o ácido ascórbico e o borohidreto de sódio no mesmo sistema.

A finalidade do uso dos dois agentes redutores é para, no processo redox, promover a nucleação e crescimento dos nanorods. (JANA, 2005). O ácido ascórbico leva à redução do Au(III) para Au(I). A nucleação e o crescimento dos nanobastões são realizados dentro do mesmo sistema. A adição de quantidades pequenas de borohidreto de sódio, forte agente redutor, com agitação vigorosa do sistema, leva à nucleação e como resultado posterior, tem-se o crescimento dos nanobastões de ouro. (ZIJLSTRA, 2006).

Outros autores, tais como Liopo e colaboradores (2015), usam outro agente redutor em lugar do ácido ascórbico, como é o caso da dopamina. As vantagens de produzir Au-NBs em maiores quantidades (larga escala) via o método seedless é interessante, porém, a desvantagem deste método é que produz Au-NBs polidispersos. (LIOPO *et al*, 2015). Este fator implica seriamente no uso destes nanobastões, uma vez que as propriedades dos Au-NBs estão associadas ao tipo de nanobastão, sua razão de aspecto, cristalinidade e outras características.

Diferentes métodos de sínteses produzem muitas vezes nanobastões com características distintas. Inclusive mudanças na mesma rota de síntese podem produzir nanobastões com diferentes cristalinidades. Por exemplo, é possível obter Au-NBs penta-geminados ou monocristais. O tipo de semente, se é penta-geminada ou monocristal, determina o tipo de nanobastão, uma vez que a cristalinidade é mantida ao longo do crescimento da nanopartícula. (WALSH *et al*, 2017)

Analisando comparativamente os métodos de síntese supracitados, aquele mais popular, que produz de forma simples o conjunto de características dos Au-NBs necessárias para o estudo adequado de suas aplicações, são oriundos do método mediado por semente. Esse método de síntese produz nanobastões com menor polidispersividade (REQUEJO, LIOPO, ZUBAREV, 2020.), elevado rendimento comparado a outros métodos, controle da razão de aspecto dos bastonetes (NIKOOBAKTH E EL SAYED, 2003). No entanto, este método ainda

apresenta limites a serem superados, que são obtenção de quantidades pequenas dos Au-NBs em uma síntese; limite na reprodutibilidade da síntese; as etapas de limpeza (centrifugação e lavagem) e funcionalização que leva a perdas de material. (BURROWS *et al*, 2017; GONZÁLEZ-RUBIO *et al*, 2019).

Devido às desvantagens apontadas, tem-se uma situação problema, que é a dificuldade de obtenção de quantidade suficiente de Au-NBs homogênea, oriunda da mesma síntese, de modo que essa quantidade de material seja suficiente para avançar em várias etapas da pesquisa de aplicação. A busca de estratégias para obtenção de grandes quantidades de síntese é um dos pontos importantes e necessários para o avanço na pesquisa dos Au-NBs.

Na última, década pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de obter nanobastões em larga escala, via método mediado por semente. Ye e colaboradores (2012) reportaram uma melhoria na síntese, utilizando aditivos aromáticos em combinação com a redução das quantidades de CTAB, com o intuito de melhorar o controle sobre a monodispersividade dos nanobastões e controle da razão de aspecto. Esses autores realizam a síntese de 500 mL de solução de Au-NBs, observando baixa quantidade de impureza.

Mayer e Murphy (2022), utilizando o protocolo de síntese mediada por semente desenvolvido por Vigderman e Zubarev (2013) que substitui o ácido ascórbico por outro agente redutor (a hidroquinona) entre outras mudanças, obtiveram uma síntese de Au-NBs por volta de 300 mL, e portanto, nesta síntese os autores obtiveram tanto rendimento superior, comparada a síntese mediada por semente original (NIKOBAKTH AND EL SAYED, 2003), quanto quantidades maiores.

Chang e Murphy (2018) propuseram a síntese do que chamaram mini nanobastões de ouro, que são nanobastões pequenos, isto é, com dimensões menores do que comumente são obtidos pelo método padrão mediado por semente. Os autores modificam a síntese em dois pontos, tornando o meio mais

ácido com adição de HCl, e utilizando uma quantidade de semente significativamente maior, 200 mL de solução semente. Chang e Murphy (2018) produziram 1 litro de solução de mini Au-NBs.

Khanal e Zubarev (2019) propuseram a produção de 1 grama de nanobastões de ouro via síntese mediada por semente com adição controlada de ácido ascórbico.

As propostas de síntese em larga escala contemplam pontos importantes e específicos na pesquisa dos nanobastões, tais como: produção de mini Au-NBs e inserção de aromáticos ou outras espécies que, por fim permanecem no ambiente químico superficial dos nanobastões. Os referidos métodos de sínteses propostos, apresentam algumas desvantagens tais como: dificuldade de reprodução e necessidade de novos protocolos de funcionalização da superfície dos Au-NBs produzidos. (CHANG, MURPHY, 2018; BURROWS *et al*, 2017)

A lacuna na literatura de métodos de síntese em larga escala que contemplem os diversos tipos de nanobastões de ouro, em termos de morfologia e na química da superfície, precisa ser preenchida com a finalidade de abarcar todo o potencial de aplicação possível destes nanomateriais. Este trabalho de doutorado se propôs a produzir Au-NBs em larga escala, via síntese mediada por semente assistida por íons prata, uma vez que, este é o método de via úmida que produz Au-NBs de baixa dispersividade e rendimentos maiores comparados a outros métodos encontrados na literatura.

Além da obtenção dos nanobastões de ouro em larga escala, faz-se necessário o estudo das características superficiais destes Au-NBs para obter ferramentas que contribuam com o entendimento do mecanismo de crescimento, uma vez que ainda há o que se discutir, em especial sobre o mecanismo de crescimento de nanobastões monocristalinos. (WALSH *et al*, 2017).

O entendimento dos mecanismos de crescimento dos nanobastões pode levar ao significativo avanço na pesquisa de produção dos Au-NBs. Diante disso,

e das informações obtidas até então sobre a atuação de espécies químicas (CTAB, Ag^+ etc) passivantes de determinadas famílias de faces, que induzem o crescimento do cristal em forma de nanobastão, (JANA, GEARHEART E MURPHY, 2001c; NIKOOBAKTH E EL SAYED, 2003; WALSH *et al*, 2017) se faz necessário a caracterização da morfologia e de superfície, para entender sua cristalinidade e interações de substâncias na superfície do Au-NBs. (WALSH *et al*, 2017; OLIVEIRA, *et al*, 2021)

Uma técnica que se destaca no estudo de superfície é a espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, XPS. Esta técnica, amparada por informações de outros dados de caracterização, pode prover informações úteis sobre as substâncias bem como sua forma química, presente na superfície dos nanobastões. Exemplos de trabalhos nesse sentido são: Ye e colaboradores (2020) utilizaram o XPS para estudar as espécies na superfície de Au-NBs e seu papel nas variações da ressonância plasmônica de nanobastões de ouro quimicamente preparados em dispositivos microfluídicos. Moreau e colaboradores (2019) utilizaram XPS e outras técnicas para contribuir com o entendimento do papel que a prata exerce na síntese dos Au-NBs, utilizando o estudo da superfície destas nanopartículas.

No presente trabalho de doutorado, foi realizada a caracterização superficial de nanobastões de ouro, utilizando XPS, como o intuito de gerar informações sobre o ambiente químico da superfície dos Au-NBs e contribuir com o entendimento do papel das espécies químicas na síntese dos nanobastões de ouro.

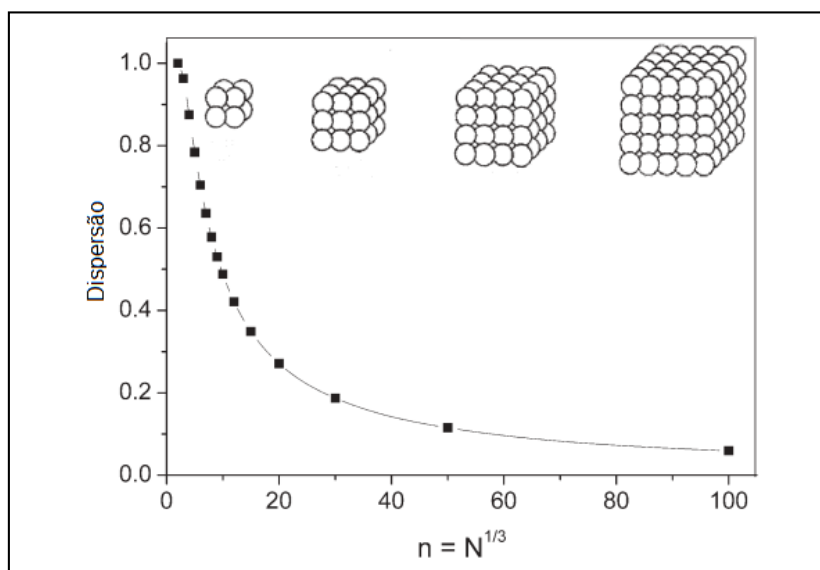
2.4. Propriedades físico-químicas das nanopartículas de ouro e suas Aplicações

As propriedades físico-químicas diferenciadas dos nanomateriais surgem quando essas estruturas são menores que um determinado *tamanho crítico*. O tamanho crítico é a dimensão (em escala nanométrica) de uma partícula, abaixo do qual pelo menos uma de suas propriedades (óptica, magnética, catalítica, elétrica, etc.) é alterada. (ZARBIN, 2007). No caso de nanopartículas metálicas, se tornam relevantes, na descrição das propriedades físico-químicas os seguintes fatores: (i) fração de átomos superficiais, (ii) efeito do confinamento quântico e (iii) confinamento eletromagnético (RPLS). (RODUNER, 2006; LOUIS; PLUCHERY, cap. 04, pg. 29, 2012; POOLE; OWENS, 2003,pg 73).

i- Fração de átomos na superfície.

Fazendo um comparativo entre nanoestruturas de ouro e ouro *massivo*, pode-se avaliar a fração de átomos na superfície, isto é, o percentual de átomos da superfície do material relativo ao total de átomos de todo material. Considerando uma partícula idealmente cúbica, os átomos de superfície têm menos vizinhos diretos do que os átomos internos, e por esse motivo estes átomos possuem um número de coordenação menor. A fração de átomos superficiais é chamada de Dispersão. Pode-se observar no gráfico da Figura 09 que, quanto menor é o tamanho da partícula, maior é a Dispersão, isto é, maior é a fração de átomos na superfície. Deve-se fazer, aqui, uma importante consideração a respeito do conceito de dispersão: os cálculos feitos levam em consideração o tipo do átomo que compõe as partículas cúbicas. (RODUNER, 2006).

Figura 09: Representação esquemática da evolução da dispersão em função do tamanho de partícula, considerando clusters cúbicos, n número de átomos.



Fonte: Emil Roduner, 2006 modificada.

Os átomos de superfície, por serem menos coordenados se comparados aos átomos do interior, formam menos ligações e, portanto, são mais instáveis. As consequências desta menor estabilidade é que os átomos das camadas superficiais possuem **menor energia de coesão**. Além disso, os átomos menos coordenados de um material possuem maior afinidade para adsorver moléculas. Estes são exemplos do que os tamanhos das partículas de um material podem afetar suas propriedades. Desta forma, as nanopartículas, quando comparadas ao material bulk, possuem maior dispersão, portanto, são mais reativas devido ao baixo número de coordenação dos átomos superficiais. (RODUNER, 2006)

ii-Efeito de confinamento quântico.

Assim como foi feito no item anterior, aqui será feito, brevemente, um comparativo do ouro massivo com as nanopartículas de ouro para compreender, neste caso, o efeito de confinamento quântico.

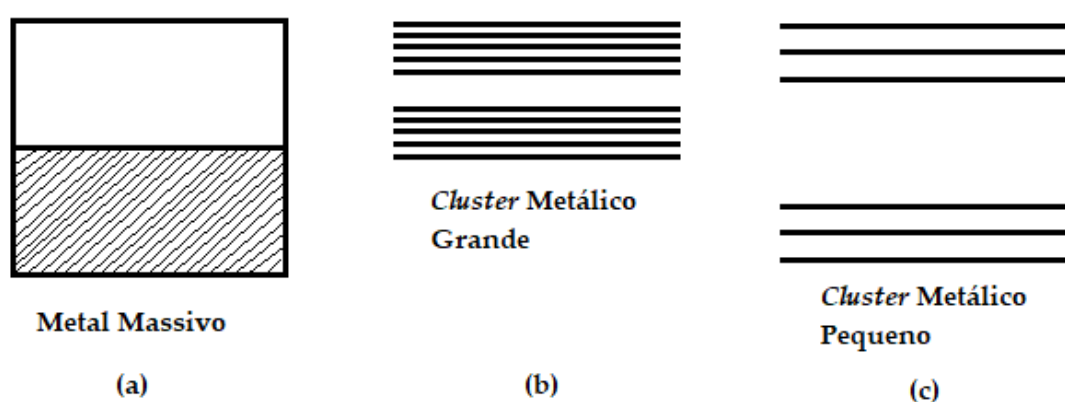
As propriedades físico-químicas dos materiais são também determinadas pelo movimento permitido aos elétrons de valência. Elétrons fracamente ligados ao núcleo têm o movimento não quantizado e podem absorver qualquer quantidade de energia; por outro lado, elétrons que estão ligados às espécies químicas estão confinados, isto é, são permitidas apenas certos movimentos nos orbitais atômicos ou moleculares com energias bem definidas. (EL-SAYED, 2001). O comportamento dos elétrons é influenciado pelas dimensões do sólido em que eles se movem. Nos metais, os elétrons são altamente deslocalizados, não existindo um *band gap*, ou separação entre a banda de valência e condução; logo, eles são menos confinados. À medida que o tamanho da partícula do metal diminui, o movimento eletrônico torna-se mais restrito devido a interação com os núcleos atômicos. Passa a existir um *band gap* e o sistema passa a ser quantizado. Como consequência, outras propriedades, diferentes daquelas do metal massivo, são observadas. (EL-SAYED, 2001; KRAHNE *et al.*, 2013).

Para melhor entender o efeito do confinamento quântico tendo em vista a teoria de bandas, pode-se considerar o material massivo, em que existem N átomos, sendo que cada átomo contribui com o estado atômico para a banda. Quanto maior for a quantidade de átomos, isto é, um mol de átomos, $6,02 \times 10^{23}$, maior será a largura da banda. A densidade de estados é proporcional ao número de átomos, isto é, a densidade de estados refere-se ao número de níveis de energia dentro de um dado intervalo de energia. Portanto, para o material *bulk* a densidade de estados é elevada, porém, para nanopartículas é baixa. (POOLE; OWENS, 2003; EL-SAYED, 2001; ZHANG, 1997).

Pode-se observar que, ao diminuir as dimensões de um metal massivo para escala nanométrica, a densidade de estados na banda de condução muda substancialmente, como pode ser observado na Figura 10 abaixo. A densidade de estados contínua na banda eletrônica do metal massivo (Figura 10-a), é alterada e, em seu lugar, observa-se um conjunto discreto de níveis de energia (Figura 10-b), que devem ter espaçamentos de níveis de energia maiores do que a energia

térmica do meio ambiente. Desta forma, os elétrons ficam mais confinados, uma vez que a energia térmica ambiente não é mais o suficiente para que estes elétrons fiquem deslocalizados, e o sistema torna-se quantizado. (POOLE; OWENS, pg. 81-82, 2003; EL-SAYED, 2001).

Figura 10: Representação esquemática da mudança nos níveis de energia das bandas em função do tamanho da partícula.



Fonte: (POOLE; OWENS,pg 82, 2003) Modificada

Quanto aos *clusters* pequenos, mostrados na figura 10-c (agregado de átomos metálicos), estes se comportam analogamente às moléculas que apresentam níveis de energia discretos. Possivelmente, o tamanho é atingido na situação em que a distância que separa a superfície das partículas é da ordem do comprimento de onda do elétron. Neste contexto, os níveis de energias podem ser entendidos à luz da mecânica quântica, considerando a aproximação do modelo de partícula na caixa, em que o tamanho da caixa é relativo ao tamanho da nanoestrutura de ouro e a partícula é o elétron. Tudo isto se refere ao efeito quântico devido ao tamanho, tendo em vista que o efeito do confinamento quântico é uma consequência do comportamento dual onda-partícula do elétron. (POOLE; OWENS, pg 82, 2003; RODUNER, 2006).

A partir deste ponto, surgem novas propriedades eletrônicas que podem ser compreendidas a partir dos termos do princípio de incerteza de Heisenberg. Estados em que mais de um elétron é confinado no espaço mais amplo será a extensão do momento. A média de energia não será bem determinada pela natureza química dos átomos e, sim, principalmente, pelo tamanho das partículas. Desta forma, as propriedades dos materiais, tais como as cores, variam quando as nanoestruturas apresentam diferentes tamanhos de partículas, uma vez que a cor é determinada pelo comprimento de onda da luz que é absorvida pelo material. A absorção ocorre, pois elétrons são excitados por fótons da luz incidente e realizam transições entre estados ocupados de baixa energia para níveis desocupados de mais alta energia do material. Clusters de tamanhos diferentes possuem diferentes estruturas eletrônicas e, portanto, diferentes separações entre os níveis de energia. Assim, é possível explicar, por exemplo, as diferentes cores presentes nos diferentes sistemas de nanopartículas de ouro. (POOLE; OWENS,pg 82, 2003).

iii- A Ressonância de plasmons localizados de superfície (RPLS)

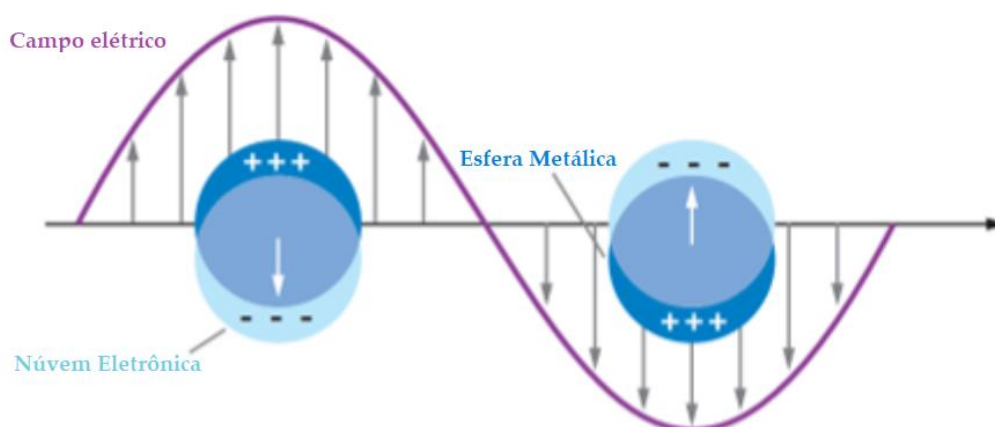
A incidência de radiação eletromagnética sobre nanopartículas de alguns metais nobres, como Au e Ag, pode desencadear o efeito de oscilação coletiva dos elétrons livres dessas NPs. Essa oscilação, ao tornar-se ressonante com o campo eletromagnético incidente, faz com que energia oriunda da radiação seja absorvida e convertida em calor ou emitida de volta na forma de radiação visível. (KRAHNE *et al.*, 2013).

As oscilações coletiva e coerente dos elétrons promovem um deslocamento dos mesmos em relação ao núcleo, como mostra a Figura 11. Isto sucede em uma diversidade de distribuições de carga possíveis na superfície. Como resultado, criam-se interações Coulômbicas entre cargas positivas e negativas e o aparecimento de forças restauradoras, em que as oscilações são em

parte amortecidas, e forças restauradoras atuam sobre os elétrons livres. (KRAHNE *et al.*, 2013).

O efeito de confinamento eletromagnético ocorre à medida que uma onda eletromagnética interage com nanopartículas metálicas, a exemplo do ouro, resultando no fenômeno de ressonância de plasmons localizados de superfícies (RPLS) (do inglês *localized surface plasmon resonance, LSPR*). Plasmons são ondas de densidade de carga e são criados devido à propagação de uma partícula num sistema ou à perturbação externa, como por exemplo, um feixe de Raios X. (REINING, [s.d.]). O RPLS decorre da oscilação coletiva de elétrons de condução em sistemas nanoparticulados, como ilustrado na Figura 11. (WILLETS; VAN DUYNE, 2007). De acordo com Louis e Pluchery (2012), isto ocorre uma vez que as nanopartículas têm tamanhos muito menores que o comprimento de onda da luz incidente e tamanhos menores que a profundidade de penetração do campo elétrico da radiação incidente. Por isto, a posição dos elétrons é polarizada, resultando nos efeitos que levam à oscilação coletiva dos elétrons livres, isto é, ao RPLS.

Figura 11: Representação esquemática da oscilação coletiva de elétrons (RPLS) através da interação da radiação eletromagnética com nanopartículas.



Fonte: WILLETS e VAN DUYNE, 2007 Modificada

O efeito de ressonância de plasmons localizados de superfície resulta em algumas propriedades diferenciadas das NPs (como intensa absorção na região do espectro visível). Para nanobastões de Au, o sinal de absorbância referente à ressonância de plasmons aparece como bandas na faixa visível e no infravermelho próximo. (LOUIS; PLUCHERY, 2012). Ao considerar um sistema de nanopartículas homogêneas e incidir radiação neste sistema, a radiação atravessa-o e é também, em parte, absorvida por ele. Esta absorção ocorre na frequência de ressonância de plasmons. Forma-se um feixe emergente que apresenta uma banda acentuada na frequência plasmônica. Além disso, as nanopartículas exibem dispersão de luz com seção transversal muito elevada. Estas características espectrais fazem das nanopartículas de ouro potencialmente adequadas para aplicações na área médica.

Muitos exemplos podem ser apresentados das aplicações dos Au-NPs em tratamentos tumorais por meio de terapias fotodinâmicas, a qual requer que espécies químicas envolvidas no fármaco absorvam radiação na faixa do visível para excitar e liberar uma substância, que é capaz de promover a morte da célula cancerosa. (WANG *et al.*, 2014; LOUIS; PLUCHERY, pg.50, 2012; KUO *et al.*, 2010; KOLEMEN *et al.*, 2016). Devido às propriedades fototérmicas de algumas nanopartículas de ouro, existe a possibilidade de aplicação destes materiais no tratamento de tumores baseados na hipertermia. Neste tratamento, é possível irradiar luz e controlar o aquecimento confinado das partículas, permitindo a destruição do tumor sem danificar os tecidos saudáveis ao redor. (HUANG *et al.*, 2008; BHANA *et al.*, 2016; OLADIPO *et al.*, 2017).

Para entender melhor a conversão em calor, a partir da irradiação de luz sobre nanopartículas, ou seja, o efeito fototérmico. Louis e Pluchery (2012) explicam:

“O calor pode ser visto como um conjunto de vibrações estatísticas incoerentes de banda larga, e é então suposto ser suportado em um

sólido por fônons. O transporte de calor é assegurado por transportadores que são partículas elementares como elétrons, fônons e até mesmo fótons. Nos dois casos anteriores, o mecanismo envolvido é a condução, enquanto que no último ocorre por radiação. Quando exposto à uma luz incidente (ou na vizinhança) do domínio espectral visível, uma nanopartícula de ouro pode ganhar energia absorvendo fótons através de transição de elétrons. O principal processo de relaxamento é então a dispersão elétron-fóton[...]. Claro, uma transição individual elétron-fóton pode resultar no ganho de energia ou perda de energia para o elétron, mas como a energia inicial fornecida à nanopartícula por absorção de fótons é inserida na forma de excitação de elétrons, a transferência de energia geral subsequente avança de elétrons para vibrações de rede. Este mecanismo é então a causa do aquecimento foto-induzido de uma nanopartícula metálica.” (LOUIS e PLUCHERY, 2012, cap.4, pg.77). (Nossa tradução)

O fenômeno de aquecimento foto-induzido em nanopartículas, conforme foi mencionado acima, permite uma série de aplicações com destaque especial para a terapia fototérmica, no tratamento de tumores e ainda diversas outras aplicações. (JAIN *et al.*, 2008; KENNEDY *et al.*, 2011).

É também grande o potencial de aplicação das nanopartículas de ouro como sensores. (MAYER; HAFNER, 2011). Como, por exemplo, o trabalho de Yu e Irudayaraj (2007), no qual, eles propõem um protocolo para o desenvolvimento de sondas moleculares baseadas em nanobastões de ouro funcionalizadas com anticorpos e testaram para visualizar e detectar espécies químicas biomarcadoras de superfície celular, para células epiteliais de mama humanas normais e transformadas. (MAYER; HAFNER, 2011 YU; IRUDAYARAJ, 2007). Outro exemplo é o trabalho de Ding e colaboradores (2020), que desenvolveram uma plataforma SERS, baseada em nanobastões de ouro recoberto por conchas de estrutura orgânica metálica, do inglês, *metal organic framework* (MOF), dispostos na superfície de polidimetilsiloxano (PDMS). Esta nanoestrutura, devido a ação

das conchas MOF porosas, permitem, seletivamente, que substâncias de interesse, de uma amostra complexa, contribuam para o espectro SERS, resultando na simplificação do espectro SERS e melhorando significativamente a capacidade de identificação do analito em amostras complexas, tais como o sangue. Esta plataforma funciona, a grosso modo, pois as cascas MOF porosa atuam como um filtro de analito para impedir que grandes analitos, de amostras complexas se aproximem do interior dos Au-NBs. Desta maneira, somente alguns analitos contribuem para o espectro SERS. Os autores testaram a plataforma e obtiveram sucesso na detecção seletiva de 4-nitrobenzenotiol em níveis de concentração nanomolar do sangue total. (DING *et al*, 2020)

CAPÍTULO 3

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

Esta tese de doutorado tem dois objetivos principais. Primeiramente, foi propor uma estratégia de síntese simples, que viabilize a produção em larga escala de nanobastões de ouro, de alta qualidade e morfologicamente homogêneos. Essa nova estratégia aplicada à síntese mediada por semente assistida por íons prata tem, por finalidade, a obtenção de quantidade suficiente de material adequado para realização de caracterizações e futuras aplicações. O segundo objetivo foi analisar via espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) o ambiente químico da superfície dos nanobastões de ouro produzidos via síntese mediada por semente assistida por prata(I) com a finalidade de contribuir com o entendimento dos mecanismos que envolvem a formação dos Au-NBs.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar as espécies químicas que estão presentes na superfície dos Au-NBs e suas formas químicas, a exemplo do estado de oxidação, por meio das medidas de XPS, e a partir destes dados, associar o papel das substâncias observadas com as propostas de mecanismos de crescimento dos Au-NBs presentes na literatura.

- Propor uma estratégia de síntese a partir do método de síntese mediado por semente assistida por íon prata, que permita a obtenção de 100 vezes mais Au-NBs que a síntese original de Nikoobakth e El Sayed (2003).
- Realizar uma caracterização físico-química de Au-NBs através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia eletrônica na região de UV-Vis e espectroscopia fotoeletrônica de Raios-X.

CAPÍTULO 4

4. Parte Experimental

4.1. Espectroscopia eletrônica UV-Vis

A espectroscopia é a área que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria e, por meio desta técnica, podem-se estudar características dos materiais (SALA, 2008). Os espectros eletrônicos nos permitem obter informações sobre transições de elétrons, que seriam a diferença de energia entre níveis. No caso relevante para nosso trabalho, as transições entre níveis eletrônicos estão geralmente na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) do espectro eletromagnético. (SALA, 2008)

Para as medidas espectroscópicas na região do ultravioleta-visível, utilizou-se o equipamento da marca Rigol Ultra-3560. As amostras líquidas foram inseridas em cela de quartzo de caminho ótico de 1 cm para efetuar as medidas. Quando necessário, foi realizada diluição.

4.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Nas medidas de MET, a microrregião analisada da amostra é irradiada com um feixe elétrons, que interage, e passa através de uma amostra. Os elétrons são emitidos por uma fonte (canhão de elétrons), que está focada e ampliada por um sistema de lentes eletromagnéticas ou magnéticas. A interação do feixe de elétrons com a amostra gera alguns tipos de resposta, incluindo elétrons

retroespalhados, elétrons secundários, elétrons auger e raios-X, que não atravessam a amostra. Aquelas respostas, que atravessam a amostra, são espalhamento elástico, espalhamento inelástico e feixe transmitido (não interage com a amostra). Os elétrons, que são elasticamente espalhados, consistem em feixes transmitidos, que passam através da lente objetiva, na qual se faz a exibição da imagem. (FARINA, 2010)

Para realizar as medidas de microscopia, utilizou-se o equipamento da marca JOEL, JEM-1230. As imagens foram obtidas na Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz Bahia.

4.3. Espectroscopia fotoeletrônica de Raios-X (XPS).

A espectroscopia fotoeletrônica de Raios-X, XPS, é uma medida da superfície dos materiais analisados. O espectro de XPS é obtido uma vez que uma amostra é irradiada com Raios-X e isto promove a ejeção de elétrons do cerne dos átomos que compõem o material, estes elétrons são chamados fotoelétrons. O espectrômetro do equipamento mede a energia cinética dos fotoelétrons e os dados são expressos geralmente em um gráfico de contagens por segundo (CPS) versus energia de ligação (eV) do elétron no átomo. Para obter a energia de ligação, que é um valor característico do átomo em determinado estado químico, é necessário usar a equação a seguir:

$$EL = h\nu - EC - W$$

Sendo que EL é energia de ligação do fotoelétron, EC é a energia cinética, $h\nu$ é a energia do fóton, e W é a função de trabalho do espectrômetro.

Para realizar as medidas de XPS, utilizou-se o equipamento da marca modelo kratos Axis ultra DLD usando raios-X monocromáticos Fontes de radiação Al K α

(1486,6 eV), 10mA x 15kV. As energias de passagem do analisador para espectros de pesquisa e espectros de alta resolução foram definidas para 80 eV e 40 eV, respectivamente. Um neutralizador de carga foi usado em todas as amostras para compensar o efeito de carga. A correção de carga foi feita, usando o pico C-C, C-H em 284,8eV. O software Casa XPS (versão 2.3.17) foi empregado para análise dos dados.

4.4. Síntese dos Nanobastões de Ouro

4.4.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nas sínteses dos nanobastões de ouro foram o brometo de cetiltrimetilamônio (Aldrich, CTAB, $\geq 99\%$), ácido tetracloroaurico (Aldrich, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} \geq 99,999\%$), ácido ascórbico (Aldrich, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, $>99\%$), borohidreto de sódio (Aldrich, NaBH_4 , $\geq 99\%$) e nitrato de prata (Merck, AgNO_3 , $\geq 99,999\%$). Foi utilizada água deionizada em todas as etapas da síntese (Equipamento Veolia Purelab Classic.).

Limpeza dos materiais

A limpeza das vidrarias foi feita previamente ao uso. Toda vidraria foi lavada com água e detergente líquido seguida por mergulho em água régia ($\text{HCl}:\text{HNO}_3$ na proporção de 3:1). Atenção: água régia deve ser manuseada com extremo cuidado, dentro de uma capela, com EPI's adequados, por se tratar de um agente oxidante forte que libera vapores tóxicos. Todos os materiais foram enxaguados 3 ou mais vezes com água destilada.

4.4.2. Preparo dos nanobastões de ouro (Au-NBs)

Os nanobastões de ouro foram preparados baseando-se na síntese mediada por semente de Nikoobakht e El-Sayed (2003). Primeiramente, foi produzida uma solução de semente, seguida do preparo de uma solução aquosa, contendo íons Au(I) , CTAB e íons Ag^+ , chamada solução de crescimento. À solução de crescimento foi adicionada pequena quantidade de sementes de ouro, levando a formação dos nanobastões de ouro.

4.4.2.1. Preparo da solução semente

A solução semente foi preparada em um béquer sob agitação mecânica misturando 0,3645 g de CTAB, 5 mL de água deionizada, seguido da adição de 5 mL de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) $0,0005 \text{ mol L}^{-1}$. Após isto, foi adicionado 600 μL de borohidreto de sódio (NaBH_4) $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, recém preparado e resfriado; o sistema foi agitado vigorosamente por cerca de 3 min e mantido em temperatura ambiente.

4.4.2.2. Preparo da solução de crescimento

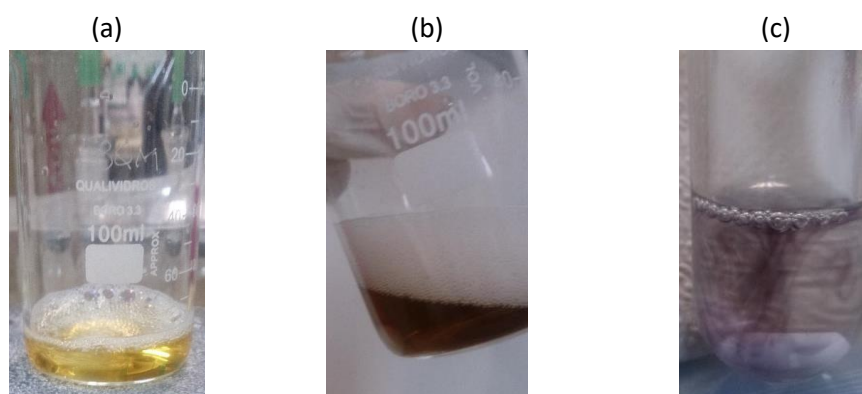
A solução de crescimento foi preparada em um béquer sob agitação mecânica misturando 0,3645 g de CTAB em 5 mL de água deionizada, seguido da adição de 5 mL de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, ainda sob agitação, foram adicionados 100 μL de solução de nitrato de prata $0,0040 \text{ mol L}^{-1}$. Depois, foram adicionados 100 μL de solução de ácido ascórbico (AA) $0,0788 \text{ mol L}^{-1}$ e, após alguns segundos, a mistura foi transferida, cuidadosamente, para um tubo de ensaio, sendo mantido à temperatura na faixa 27-30°C.

Ao tubo contendo a solução de crescimento, foram adicionados cuidadosamente, 12 μL da solução semente, mantendo o sistema em repouso por cerca de 12 horas, para o crescimento dos nanobastões de ouro. A Figura 12 apresenta imagens digitais das etapas da síntese dos nanobastões de ouro. (a) O início do preparo da solução de crescimento, antes da adição de ácido ascórbico, (b) a solução semente, e finalmente (c) a solução de crescimento após adição das sementes de ouro. A cor, que surge no seio do tubo, indica a formação dos Au-NBs.

Para caracterização do material por TEM e XPS, foi necessária a remoção do excesso de surfactante da solução. Para isso, uma amostra de Au-NBs foi centrifugada a 2000 rpm durante aproximadamente 5 horas. O líquido

sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta de pasteur e foi adicionado uma solução diluída de CTAB 1 mmol L^{-1} . O sólido decantado foi redisperso, centrifugado e seu líquido sobrenadante novamente retirado, sendo todo o processo de lavagem repetido mais 1 vez. Do sólido decantado, uma pequena parte foi retirada para medida de TEM, e o restante do material do tubo foi seco por liofilização para posteriores análises de XPS.

Figura 12: Fotos dos sistemas na síntese de nanobastões de ouro (a) Solução contendo íons de ouro (III) e CTAB (b) solução semente (c) Solução de crescimento após adição das sementes de ouro.



4.4.3. Síntese de nanobastões de ouro em larga escala (Síntese NINA)

4.4.3.1. Preparo de 10 vezes de suspensão coloidal contendo Au-NBs

Solução de crescimento 10 vezes a quantidade da síntese clássica (100 mL): A solução de crescimento foi preparada sob agitação magnética misturando-se 3,645 g de CTAB e 50 mL de água deionizada em um béquer de 250 mL, seguido da adição de 2,5 mL de solução $0,004 \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 . Após isso, foram adicionados 50 mL de solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, sob agitação lenta, foram adicionados 700 μL de solução $0,0788$

molL⁻¹ de ácido ascórbico. Após mudança de cor da solução do amarelo para incolor, a solução foi fracionada em 10 tubos de vidro com aproximadamente 10 mililitros em cada.

Solução semente: A solução semente foi preparada, utilizando agitação magnética misturando 0,3645 g de CTAB e 5 mL de água deionizada em um béquer, seguido da adição de 5mL de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) 0,0005 mol L⁻¹. Após isto, ainda sob agitação, foi adicionado 70 µL de solução de ácido ascórbico (AA) 0,0788 mol L⁻¹; após a mudança de cor de amarelo para incolor, foram adicionados 600 µL de solução 0,01 molL⁻¹ de borohidreto de sódio, recém preparada e resfriada, agitando vigorosamente durante 2 minutos, enquanto se observou a mudança de cor de incolor para marrom claro. A solução foi utilizada, no mínimo, 10 minutos após a síntese.

Aos tubos contendo a solução de crescimento, foram adicionados 12 µL de solução semente e, cuidadosamente, os tubos foram mantidos em repouso na faixa de temperatura 27-30 °C, durante 12 horas. Em seguida, medidas espectrofotométricas foram realizadas com cada fração. Finalmente, juntou-se as amostras individuais, formando uma amostra composta.

4.4.3.2. Preparo de 100 vezes de suspensão coloidal contendo Au-NBs

Solução de crescimento 100 vezes a quantidade da síntese clássica (1000 mL):

No preparo de 1000 mL de suspensão coloidal de Au-NBs, foi utilizada a mesma metodologia descrita na seção anterior, mas com uma quantidade de precursores e solventes maior.

A solução de crescimento foi preparada, misturando 36,45 g de CTAB e 500 mL de água deionizada em um béquer de 1000 mL, seguido da adição de 25

mL de solução $0,004 \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 . Após isto, foram adicionados 500 mL de solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, solubilizando com auxílio de uma placa agitadora e bagueta até formar uma solução. Em seguida, sob agitação lenta, foram adicionados 7,5 mL de solução $0,0788 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico e após mudança de cor da solução do amarelo para incolor, a solução foi fracionada em 100 tubos de vidro, com aproximadamente 10 mililitros de solução em cada.

A solução semente foi sintetizada da mesma maneira que no item 4.4.3.1

Em cada tubo contendo a solução de crescimento adicionaram-se 12 μL de solução semente cuidadosamente, mantendo os tubos na faixa de temperatura $27\text{-}30^\circ\text{C}$ durante 12 h. Após isto, foram realizadas medidas espectroscópicas na região de UV-Vis nas suspensões dos tubos, e posteriormente as frações foram unidas, perfazendo aproximadamente 1 L de suspensão coloidal, cujo espectro foi medido. Após isto, a amostra foi centrifugada o mais breve possível e submetida à lavagem com solução de CTAB $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Centrifugação/lavagem

O processo de centrifugação foi realizado na faixa de temperatura de $30\text{-}35^\circ\text{C}$ para remoção do excesso de CTAB. Tubos falcon preenchidos com o 25 mL da suspensão de Au-NBs foram centrifugados em ultracentrífuga à 11000 rpm durante 20 min. A seguir, foi retirado, cuidadosamente, o líquido sobrenadante com uma pipeta, restando, aproximadamente 1 mL de suspensão de Au-NBs, que foi completada com mais suspensão de Au-NBs e repetido o processo de centrifugação até que quase a totalidade do líquido sobrenadante da suspensão como um todo foi retirado, restando aproximadamente 1 mililitro. A referida suspensão de Au-NBs foi transferida para tubos eppendorf, centrifugado retirado a solução sobrenadante, $\sim 1 \text{ mL}$, em seguida foi adicionado 900 microlitros de solução diluída de CTAB, $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, homogeneizado e

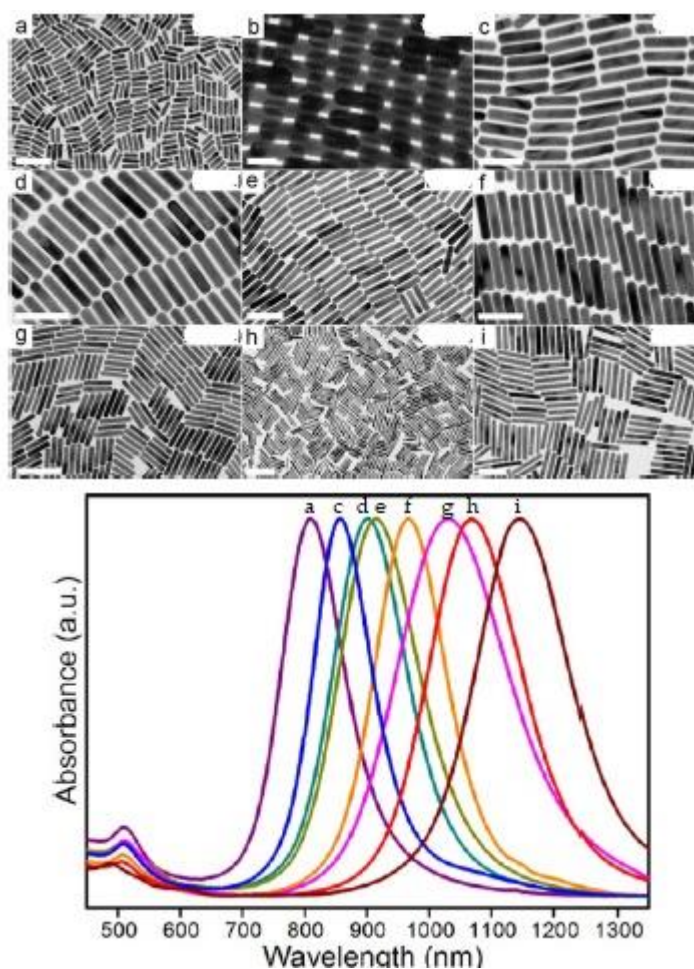
centrifugado à 14000-15000 rpm durante 10min. Em seguida, 850-900 μ L do líquido sobrenadante foram retirados com uma micropipeta, cuidadosamente. Este processo de lavagem dos nanobastões, seguido de centrifugação, foi repetido mais 1 vez. Por fim, após a centrifugação foram mantidos apenas 100 microlitros aproximadamente da suspensão de Au-NBs. Destas amostras concentradas, foi feita a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

CAPÍTULO 5

5. Resultados e Discussões

Atualmente, a síntese de nanobastões de ouro mediada por semente assistida por íons prata é o método preferido por produzir nanopartículas de boa qualidade, razoavelmente monodispersas e com potenciais aplicações na área de biosensores e biomedicina (YE *et al*, 2013; DING *et al*, 2020; MEYER e MURPHY, 2022). É a síntese via semente que produz nanobastões com menor polidispersividade (REQUEJO, LIOPO, ZUBAREV, 2020), quando comparado à rota de síntese "*seedless*", que produz maiores quantidades de Au-NBs. Materiais monodispersos são necessários para obter uma população de nanobastões com propriedades óticas e fototérmicas homogêneas, uma vez que a razão de aspecto dos Au-NBs está associada às estas propriedades. (YE, *et al* 2013). Em uma população de nanobastões polidispersos, têm-se partículas com grande variação de razões de aspecto, portanto com propriedades físico-químicas variadas, associada aos seus indivíduos. (BURROWS *et al*, 2017) A Figura 13, compara nanobastões com variadas razões de aspectos seguido dos seus espectros ópticos na região de UV-Vis. (YE *et al*, 2013). À medida que a razão de aspecto aumenta no sentido da Figura13 a-i, nas imagens de TEM, os máximos das bandas de LPRS deslocam para o região de comprimento de onda maior, observado nos espectros de **a-h**.

Figura 13: Micrografias de nanobastões de ouro com diferentes razões de aspecto e suas respectivas bandas plasmônicas dos espectros eletrônicos.



Fonte: YE e colaboradores (2013)

A síntese mediada por semente apresenta várias vantagens já citadas anteriormente. No entanto, tem limitações tais como, baixa robustez, presença de impurezas e pequena quantidade (volume) de síntese produzida (aproximadamente 10 mililitros). As consequências das limitações citadas são:

- I- obtenção de quantidades pequenas dos Au-NBs em uma síntese;

- II- baixa reprodutibilidade da síntese;
- III- etapas de limpeza (centrifugação e lavagem) e funcionalização, que levam a perdas de material. (BURROWS *et al*, 2017; GONZÁLEZ-RUBIO *et al*, 2019).

Em razão dos três pontos citados, surge uma situação limitante, que é a dificuldade de obtenção de quantidade suficiente de Au-NBs homogênea, isto é, oriunda da mesma síntese, de modo que essa quantidade de material seja suficiente para avançar em várias etapas da pesquisa de aplicação. Com o propósito de viabilizar uma solução para esta importante questão, foi proposta, nesta tese de doutorado, a produção em larga escala dos nanobastões de ouro.

A síntese, via semente, que foi utilizada como referência no presente trabalho, foi baseada no trabalho de Nikoobakht e El-Sayed (2003). Assim, propomos uma modificação nesta síntese, também inspirado no trabalho de González-Rubio *et al* (2019), que destaca que o ponto crítico desta síntese é a quebra de simetria, isto é, quando a semente de ouro é adicionada à solução de crescimento. E destaca que a otimização da síntese necessita considerar este ponto crítico. O objetivo do presente trabalho foi produzir grandes quantidades da solução de Au-NBs. Sucintamente, foram realizadas mudanças na etapa da produção da semente e na solução de crescimento. A produção da semente foi modificada baseado no artigo de GONZÁLEZ-RUBIO e colaboradores (2019), e na segunda etapa da síntese dos nanonastões de ouro, isto é, na etapa de produção da solução de crescimento e adição de semente, foi produzida uma mudança na rota desta síntese baseada em ideias, que surgiram no decorrer dos experimentos deste trabalho de doutorado. Esta nova rota ou estratégia de síntese foi nomeada síntese NINA.

Nas etapas que precedem a síntese dos nanobastões e durante a mesma, tanto para a síntese de Nikoobakht e El-Sayed (2003), quanto para a síntese

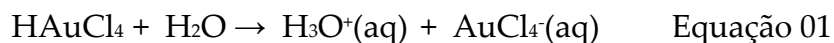
NINA, ocorrem transformações químicas e físicas que são relevantes para o entendimento da produção destes materiais. Portanto, serão discutidos pontos relevantes para construção deste entendimento.

5.1. Síntese mediada por semente: Espécies químicas e suas funções

Dentre as espécies químicas presentes no meio reacional durante a síntese de Au-NBs, existem aquelas provenientes da solução aquosa de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), solução aquosa de CTAB, solução aquosa recém preparada do ácido ascórbico e solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3). No preparo das soluções a partir dos reagentes, há, em alguns casos, reações químicas e, em outros, apenas dissociação das espécies (transformações físicas), que serão brevemente descritas abaixo.

5.1.1- Solução de crescimento

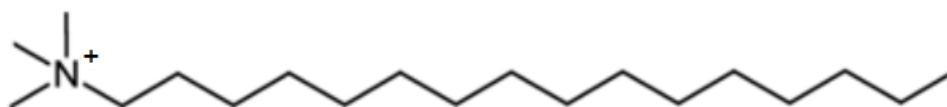
O preparo da solução de crescimento envolve produzir as soluções a seguir. O ácido tetracloroáurico, um sólido amarelo, é o precursor na síntese dos nanobastões e sua dissolução em água resulta em uma reação ácido-base de Brönsted-Lowry :



Na reação, equação 01, ocorre a formação da espécie complexa tetracloroaurato e AuCl_4^- . Este ânion complexo é, de fato, o precursor da síntese dos nanobastões metálicos. Além disso, há formação dos íons H_3O^+ , conforme pode-se observar pela mudança de pH do meio de 6,0 (água pura) para 2,8 (solução), na Tabela 1. Após a preparação da solução aquosa contendo o íon AuCl_4^- , vem o preparo da solução aquosa do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Nesta, mistura-se o CTAB com água e ocorre uma dissociação, na qual resulta o ânion brometo (Br^-) hidratado e o cátion CTA^+ , que interage com moléculas de água através da extremidade que contém o nitrogênio (veja Figura 14, representando o cátion CTA^+). Na Tabela 1, página 67, pode-se observar que o pH do meio não mudou, comparado ao pH da água, indício que ocorreu um

processo físico. O papel do CTA⁺ na síntese é de ser o agente estabilizante e orientador da forma de bastão (Nikoobakht e El-Sayed (2003). O ânion Brometo, Br⁻, também exerce função relativa à orientação da forma do bastão, portanto, seu papel na síntese também é relevante. (BROWN e WILEY, 2020)

Figura 14: Estrutura em linhas do Cátion CTA⁺



Outra solução aquosa preparada é a de ácido ascórbico (AA). Ao misturar o sólido C₆H₈O₆ com a água, ocorre a reação ácido-base de Bronsted-Lowry, em que o ácido ascórbico doa íons H⁺ para a água, base de Bronsted-Lowry, e, como produtos, tem-se o íon C₆H₇O₆⁻, e o H₃O⁺. O propósito do ácido ascórbico na síntese é atuar como agente redutor.

No preparo da solução aquosa de nitrato de prata mistura-se o AgNO₃ com água, ocorrendo então, a dissociação dos íons Ag⁺ e NO₃⁻, que permanecem hidratados na solução. O nitrato de prata é utilizado como norteador da forma dos nanobastões e influencia na razão de aspecto dos nanobastões; o ânion nitrato, após a síntese na etapa de centrifugação e lavagem, é eliminado do sistema. (Nikoobakht e El Sayed, 2003)

No preparo da solução de crescimento, há mistura de soluções aquosas de CTAB, HAuCl₄, AgNO₃ e AA. Conforme os dados apresentados na Tabela 1, o meio reacional tem pH por volta de 3,0, devido à presença do íon H₃O⁺ proveniente da reação ácido-base da água com HAuCl₄ e com AA. A acidez do

meio reacional influencia na formação dos nanobastões, uma vez que a reação de oxirredução é influenciada pelo pH do meio.

Tabela 1: pH de soluções aquosas dos reagentes e meio reacional da síntese de Au-NBs (concentrações das soluções item no 4.4).

Água/Soluções aquosas	pH
Água deionizada	6,0
Ácido tetracloroaurico	2,8
Ácido ascórbico	3,0
Solução de crescimento	2,9
CTAB	6,1
Borohidreto de Sódio	9,7

5.1.2- Solução de Semente

O preparo da solução semente envolve a mistura das soluções aquosas de CTAB, HAuCl_4 , AA (na síntese NINA) e Borohidreto de sódio, a única substância que é base de Arrhenius. O uso das sementes de ouro envolve, apenas, 12 microlitros que são adicionados em cerca de 10 mililitros de solução de crescimento. Portanto, a solução semente tem pouca influência na mudança de pH do sistema em que crescem os nanobastões. Sendo assim, o pH da solução de nanobastões é por volta de 3,0. As análises feitas acima a respeito da função dos reagentes se aplicam, aqui, com exceção do borohidreto, que é um agente redutor forte, e promove a redução do Au(III) para Au(0) , formando, assim, sementes de ouro. As transformações químicas, que ocorrem tanto na solução semente, quanto na de crescimento, serão abordadas no item seguinte. (GONZÁLEZ-RUBIO *et al*, 2019)

5.2. Síntese mediada por semente: transformações químicas

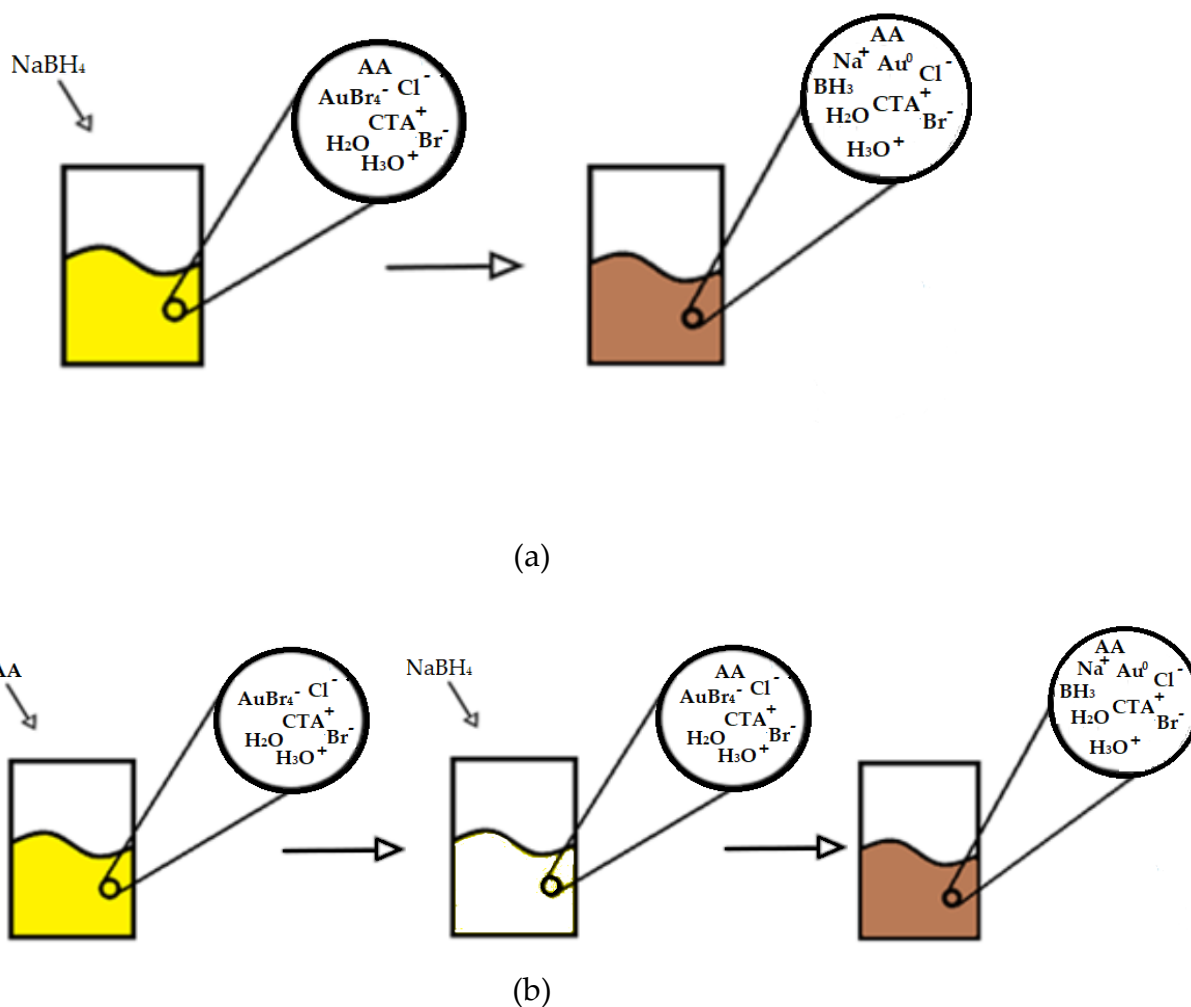
5.2.1. Solução semente

A solução semente para síntese NINA é modificada com relação àquela de Nikoobakht e El-Sayed (2003). Esta mudança diz respeito à adição de ácido ascórbico na solução aquosa, contendo CTAB e HAuCl_4 , promovendo previamente a redução do $\text{Au(III)} \rightarrow \text{Au(I)}$, antes da adição de NaBH_4 , que promoverá uma reação redox $\text{Au(I)} \rightarrow \text{Au(0)}$ para a formação das sementes de ouro. Essa mudança foi baseada no trabalho de González-Rubio *et al*, 2019. No trabalho destes autores, o objetivo central foi melhorar a síntese mediada por semente assistida por prata, de modo a obter uma síntese mais reprodutiva e com elevado rendimento, desconectando a quebra de simetria do processo de crescimento dos nanobastões. Para tanto, eles usaram a

otimização da produção da semente esférica, seguida da produção de sementes anisotrópicas. Destacando aqui, que a síntese NINA com sua proposta de produção de Au-NBs em larga escala, foi inspirada nas ideias de González-Rubio e colaboradores (2019), no que tange à compreensão de que o ponto crítico da síntese de nanobastões de ouro é a quebra de simetria, quando é adicionado a semente na solução de crescimento. Sendo, portanto, relevante otimizar os estágios que antecedem a quebra de simetria, que foi modificado neste trabalho, para alcançar o preparo dos Au-NBs em larga escala.

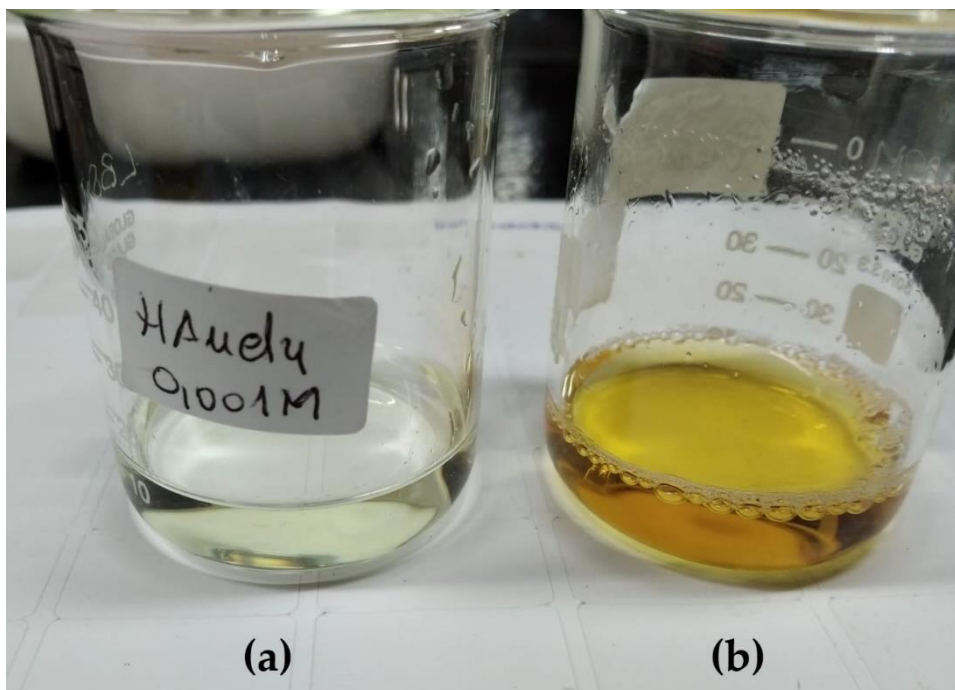
A Figura 15 representa um esquema geral comparativo da síntese da semente de ouro do trabalho original, Figura15 –a, e a da síntese NINA Figura15 –b, baseada em González-Rubio e outros (2019)

Figura 15: Representação do preparo da suspensão de semente original (Nikoobakht e El Sayed, 2003) (a) e a suspensão de semente da síntese NINA baseada em GONZÁLEZ-RUBIO *et al*, 2019 (b)



No preparo da solução semente, foi adicionada água deionizada ao CTAB, formando uma solução incolor. À esta solução, foi adicionada uma solução de ácido tetracloaúrico, na qual estão presentes os íons H_3O^+ e AuCl_4^- , cuja cor é amarelo claro, Figura 16-a, devido à presença do ânion complexo tetracloaurato hidratado. Após a mistura, a solução apresenta uma cor amarelo escura, Figura 16-b, indicando a formação de outras espécies químicas.

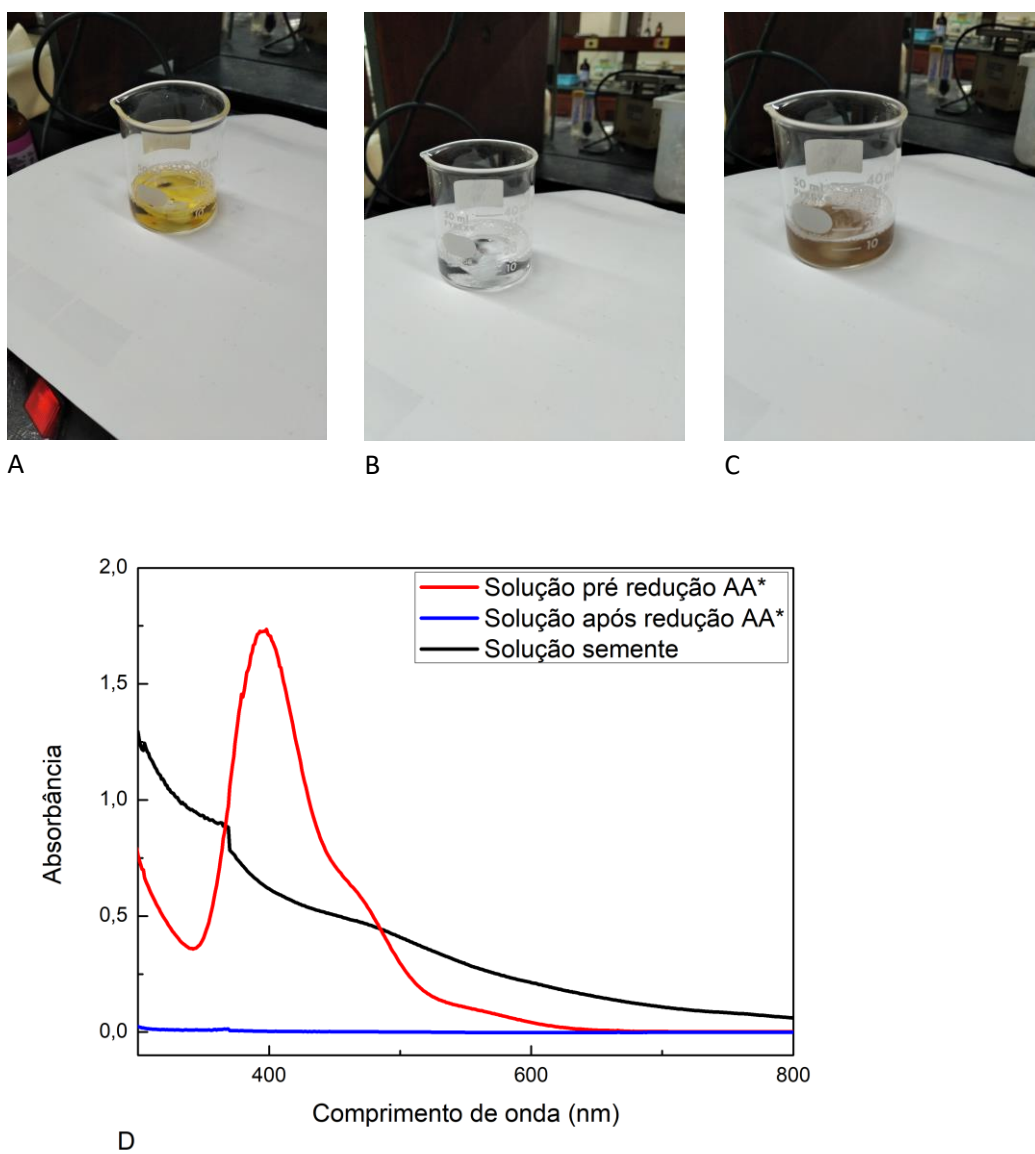
Figura 16: Fotografias de béqueres contendo (a) solução aquosa $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ de HAuCl_4 ; béquer (b) solução aquosa de HAuCl_4 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e CTAB $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.



Na síntese da semente de Nikoobakht e El-Sayed (2003), todas as substâncias citadas estão presentes no sistema, indicado na Figura 15-a acima, e apresentado na imagem digital na Figura 16-b. À esta solução foi adicionado, uma solução resfriada e recém preparada de borohidreto de sódio. Desta forma, observou-se a mudança de cor da solução que sai de amarelo intenso passando pelo incolor e, em seguida, para marrom clara, Figura 15-a. O cátion borohidreto, BH_4^- , reage com o precursor de Au, promovendo uma reação de oxirredução na qual o ânion complexo, cujo centro metálico é Au(III) , recebe elétrons do BH_4^- , resultando na redução da espécie metálica do ânion complexo, o $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$. O BH_4^- , por sua vez, é oxidado, resultando em BH_3 . Portanto, o borohidreto de sódio atua como agente redutor na síntese. Nesta síntese, produz-se nanoesferas de ouro menores que 4 nm (NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003).

Na síntese NINA, o preparo da solução semente tem uma etapa adicional, que é a redução do íon de $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^+$, como mostrado na Figura 15-b. Ao béquer contendo solução aquosa de CTAB e HAuCl_4 , representado pela Figura 17-A, foi adicionado do ácido ascórbico, levando a primeira reação de redução do Au(III) para Au(I), Figura 17-B e, posteriormente, realizou-se a redução do Au(I) para Au(0) com o borohidreto de sódio, Figura 17-C. As transformações químicas que ocorreram nesta síntese, relacionadas aos processos redox, podem ser corroboradas por meio da mudança do perfil espectral, com o desaparecimento do sinal relacionado a espécie cujo centro metálico é ouro (III), quando este é reduzido $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^+ \rightarrow \text{Au}^0$, da solução antes da redução com AA, após a redução com AA e, posteriormente, a redução com o ânion borohidreto, respectivamente. O objetivo da redução com AA antes da redução com o NaBH_4 é tornar a semente mais homogênea, monodispersa, de modo que seja possível obter um processo de semear os nanobastões mais homogeneamente, como consequência obtendo nanobastões menos polidispersos, uma vez que a qualidade da semente influencia na produção dos nanobastões. (González-Rubio, 2019).

Figura 17: Imagens digitais das etapas das reações redox que ocorrem na produção da semente na síntese NINA de nanobastões de ouro e espectros das referidas soluções. Solução A curva vermelha, B curva azul e C curva preta.



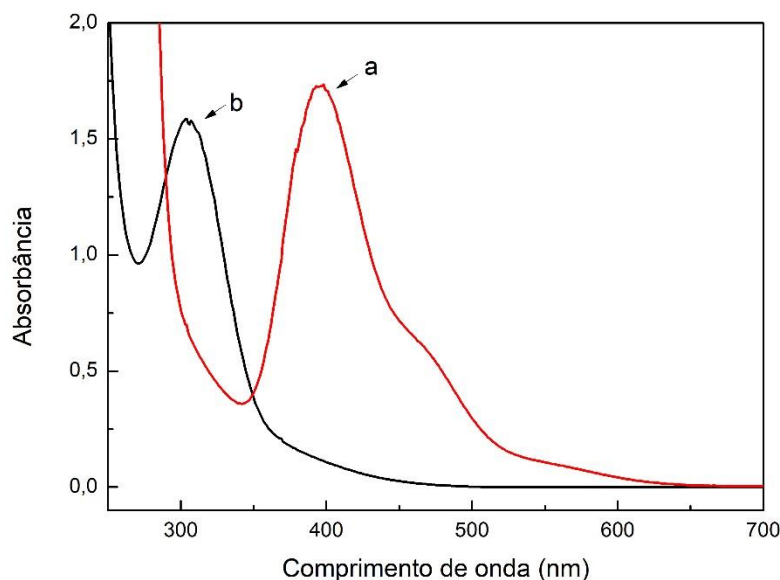
5.2.2. Solução de crescimento

A segunda etapa de síntese dos nanobastões de ouro consiste em preparar uma solução contendo precursor metálico, que será reduzido sobre as sementes de Au sintetizadas previamente. É importante mencionar que a superfície das sementes de ouro catalisa a redução de Au(I) para Au(0) pelo AA conforme será abordado posteriormente. (BURROWS *et al*, 2017)

Para isso, foi preparada uma solução de crescimento contendo 5 mL de HAuCl_4 0,0010 mol L^{-1} , de coloração amarelo claro como mostra a Figura 16-a. Essa solução foi adicionada em um béquer contendo 5 mL de solução de CTAB 0,2 mol L^{-1} (solução incolor). Imediatamente à mistura, a solução resultante mudou para uma coloração amarelo-alaranjado escuro, (Figura 16-b); a mudança de cor da solução pode ser explicada pela substituição dos íons cloreto do $[\text{AuCl}_4]^-$ por íons brometo oriundos do CTAB.

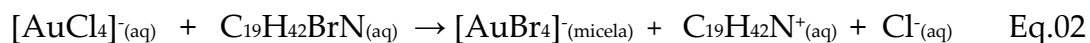
Pode-se observar, na Figura 18, que o perfil espectral UV-Vis e a banda relativa a este modo refere-se ao íon $[\text{AuCl}_4]^-$, com máximo de intensidade em 305 nm, curva preta (b), difere claramente do sinal relacionado à espécie $[\text{AuBr}_4]^-$, com máximo de intensidade 395nm, curva vermelha(a). Os sinais observados para as duas soluções diferem, pois estes se originam de transições eletrônicas diferentes, uma vez que as espécies são ânions complexos distintos. (MIRANDA, 2006; ABDELMOTI, ZAMBORINI, 2010; EDGAR, MCDONAGH, CORTIE, 2012.).

Figura 18: Espectro de UV-Vis da solução aquosa de HAuCl_4 e da solução de crescimento pré-redução.



Na Figura 18, a curva b, em cor preta, corresponde ao espectro da solução aquosa HAuCl_4 diluída. A curva a, em vermelho, corresponde ao espectro da solução de crescimento antes da redução concentrada.

A razão da substituição dos íons cloreto pelos íons brometo, no ânion complexo de Au^{3+} , é que a força da ligação Brometo- Au(III) é maior que a Cloreto- Au(III) , resultando na solução de crescimento, o ânion complexo tetrabromoaurato $[\text{AuBr}_4]^-$. (GARG, 2010; MIRANDA DOLLAHON, AHMADI, 2006; SI *et al*, 2012; EDGAR, MCDONAGH, CORTIE, 2012). O $[\text{AuBr}_4]^-$ está no sistema contendo o íon CTA^+ , portanto, há interações entre as duas substâncias iônicas, veja equação 02. (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, 2005; SCARABELLI, *et al* 2015)



O passo seguinte da síntese da solução de crescimento consiste em adicionar alíquotas de 100 microlitros da solução aquosa, contendo AgNO_3 . O íon Ag^+ tem função de atuar no direcionamento da morfologia de bastonete, porém, sobre o mecanismo de ação desta espécie química seu entendimento não é conclusivo (NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003). O papel da prata será abordado posteriormente neste trabalho.

A próxima etapa do preparo da solução de crescimento consiste em adicionar 100 microlitros do ácido ascórbico (AA) $0,0788 \text{ mol L}^{-1}$ ao sistema. É importante ressaltar que antes da adição do AA na solução de crescimento (Figura 19-a), já existem várias espécies químicas no meio reacional. No entanto, presume-se que o $[\text{AuBr}_4]^-$, seja reduzido pelo ácido ascórbico adicionado, mudando a cor da solução de amarelo-alaranjado para incolor, como mostrado na Figura 19-b. Os espectros eletrônicos na região de UV-Vis da solução de crescimento antes e após a adição de ácido ascórbico (AA), são apresentados na Figura 20. Pode-se observar o desaparecimento da banda em 400 nm, quando comparamos o espectro da solução aquosa contendo apenas CTAB e HAuCl_4 (curva preta), com a solução de crescimento após a adição de AA (curva vermelha). Portanto, os espectros indicam que o centro metálico Au^{3+} do ânion complexo tetrabromoaurato é reduzido a Au^{1+} , $\text{Au(III)} \rightarrow \text{Au(I)}$, e o ácido ascórbico (H_2A) é oxidado a ácido dehidroascórbico (A_{ox}) (veja Figura 19, Figura 21 e equação 03). Como resultado, obteve-se o ânion complexo $[\text{AuBr}_2]^-$, cujo centro metálico é Au(I) . (EDGAR, MCDONAGH, CORTIE, 2012.) As substâncias $[\text{AuBr}_2]^-$, A_{ox} , além do íon prata (Ag(I)), íon nitrato (NO_3^-), íon brometo (Br^-), íon CTA^+ , íons H_3O^+ compõem, em meio aquoso, a solução de crescimento. É importante notar as substâncias presentes no meio reacional, pois elas de modo direto ou indireto, interferem no passo seguinte que é a *quebra de simetria* ao crescer o nanobastões a partir da adição de sementes esféricas a esta solução de crescimento. (EDGAR, MCDONAGH, CORTIE, 2012.)

Figura 19: Imagem digital da solução de crescimento pré-redução (a) e pós redução(b).

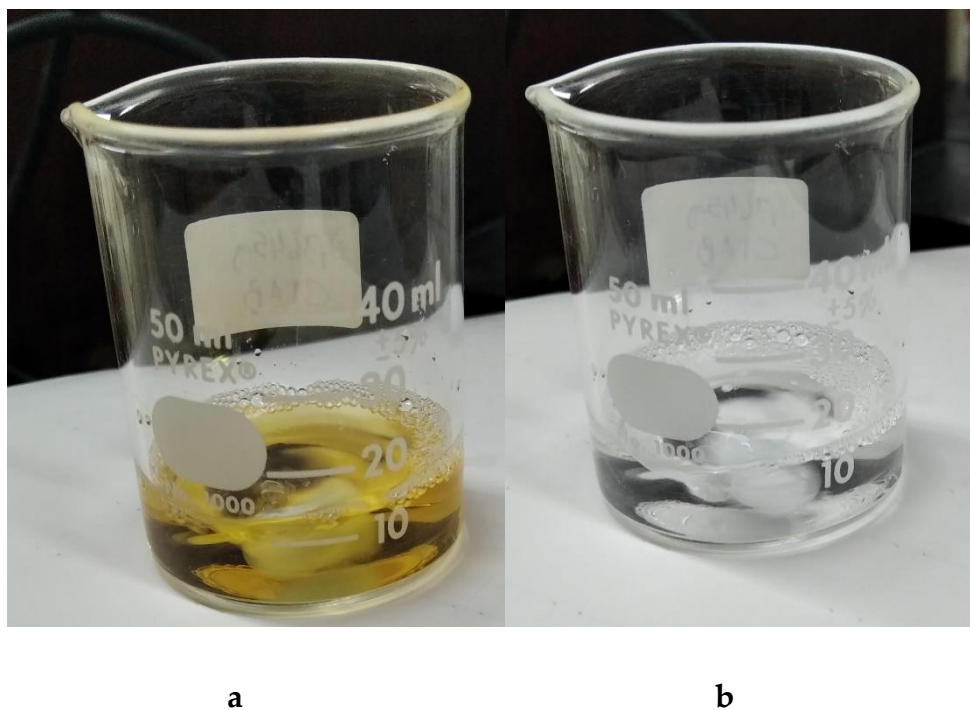
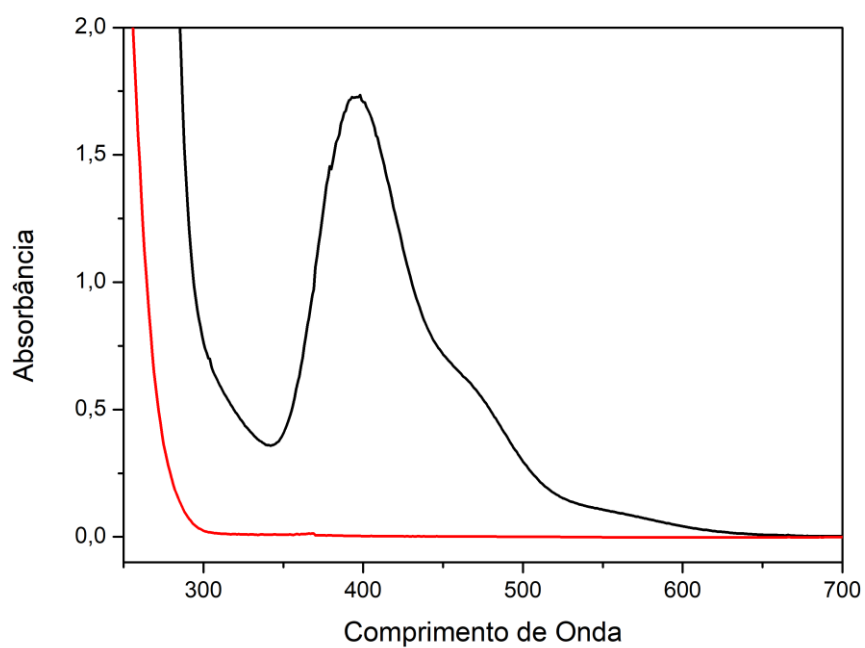
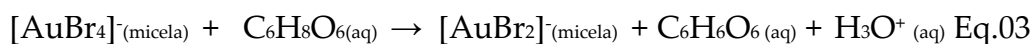


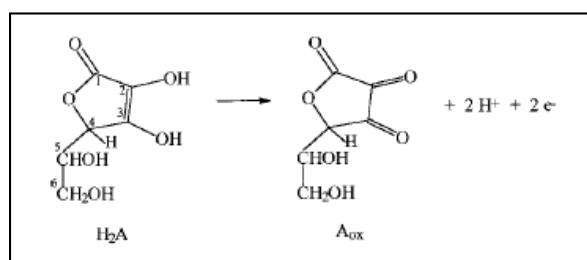
Figura 20: Espectro eletrônico de UV-Vis da solução de crescimento pré-redução (curva preta) e pós-redução com ácido ascórbico (curva vermelha).





(Fonte: EDGAR, MCDONAGH, CORTIE, 2012.)

Figura 21: Reação de oxidação do ácido ascórbico



Fonte: FORNARO E COICHEV, 1998

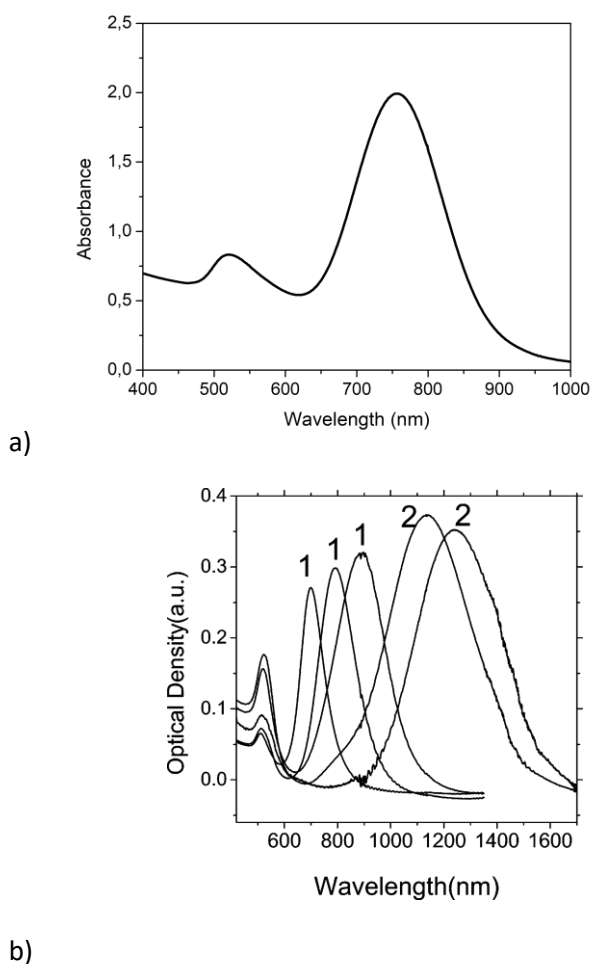
Na solução de crescimento, o ânion complexo [AuBr₂]⁻, cujo centro metálico é o Au(I), interage com o CTA⁺ (EDGAR, MCDONAGH, CORTIE, 2012). O passo seguinte, na síntese dos nanobastões de ouro, é adicionar a esta solução de crescimento, 12 microlitros da solução semente. Este é o momento em que ocorre o que muitos autores chamam de **quebra de simetria**, em que as pequenas esferas de ouro rodeadas por CTA⁺, começam a crescer, através da redução dos íons [AuBr₂]⁻, formando Au(0). (GONZÁLEZ-RUBIO *et al*, 2019; TONG *et al*, 2017; WALSH *et al*, 2017). Os íons Au(I) são incorporados à semente em uma face preferencial alongando o cristal. Assim, a simetria esférica da semente é modificada dando lugar a uma partícula anisotrópica na forma de bastonete. Neste ponto do sistema, pode-se notar a mudança de cor na solução em que estão crescendo os nanobastões, observe na Figura 22. (GOLE E MURPHY, 2004).

Figura 22: Imagem digital do crescimento dos nanobastões após a adição da semente de ouro na solução de crescimento.



No presente trabalho, a síntese de Nikoobakht e El Sayed (2003) foi reproduzida e podemos inferir que houve a formação destas partículas anisotrópicas, os nanobastões de ouro, por meio dos espectros de UV-Vis, (Figura 23).

Figura 23: Espectros eletrônicos na região do UV-Vis de a) nanobastões de ouro sintetizados no presente trabalho, b) dos nanobastões de ouro do Nikoobath e El Sayed (2003).



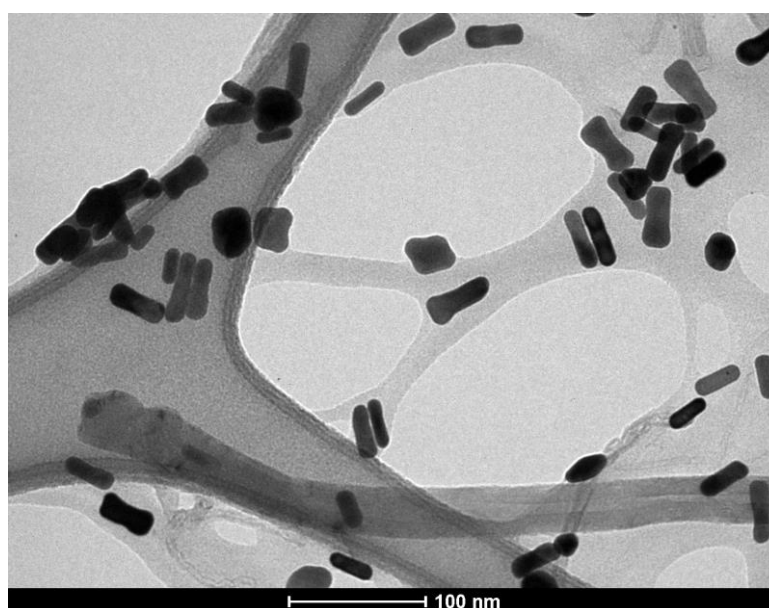
Na Figura 23-a, é apresentado o espectro eletrônico na região de UV-Vis da suspensão aquosa de nanobastões de ouro, produzida no presente trabalho de doutorado, a partir da mesma rota sintética do trabalho do Nikoobath e El Sayed (2003). (OLIVEIRA *et al*, 2021). Observam-se duas bandas: uma por volta de 520 nm, que é atribuída ao modo transversal de oscilação coletiva dos elétrons (HUANG, NORENTINA, EL- SAYED, 2009) e outra banda por volta de 757 nm, relativa ao modo longitudinal da ressonância de plasmons localizados de superfícies (RPLS), (HUANG, NORENTINA, EL-

SAYED, 2009). A razão de aspecto é 3,5, calculada a partir dos dados de UV-Vis apresentado na Figura 23-a. (OLIVEIRA *et al*, 2021)

Pode-se comparar que os perfis espectrais das Figuras 23-a e Figura 23b.1 são semelhantes, mostrando que obtivemos uma produção de nanobastões de ouro, de acordo com a rota proposta por Nikoobath e El Sayed (2003). Na Figura 23-b, pode-se observar os números 1 e 2, que se referem a espectros produzidos a partir da rota mediada por semente, contendo 1 e 2 surfactantes, respectivamente.

A partir de análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) como apresentando na Figura 24, pôde-se inferir o sucesso em reproduzir a síntese de Nikoobath e El Sayed (2003), através da observação de nanopartículas com morfologia alongada dos nanobastões de ouro.

Figura 24: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de uma amostra de nanobastões de ouro produzidos a partir da rota de síntese de Nikoobath e El Sayed (2003).

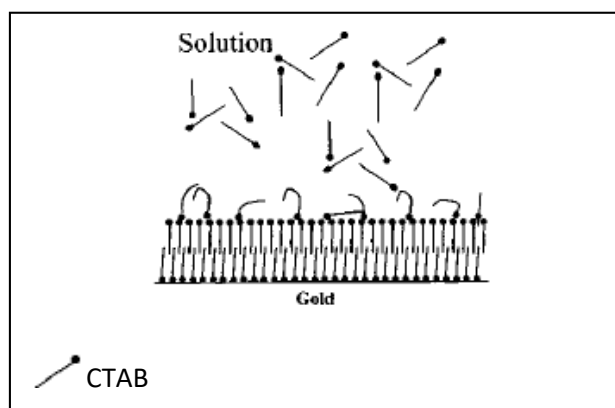


5.3 Mecanismos de crescimento e relação com ambiente químico dos nanobastões de ouro

Por meio de medidas de microscopia de eletrônica de transmissão de alta resolução, Nikoobakht e El Sayed (2003) investigaram o mecanismo de formação dos nanobastões de ouro, com relação ao papel do CTAB. Eles afirmaram que os íons CTA^+ são atraídos mais fortemente por certas faces do cristal de ouro (110), quando comparado às demais faces. Os autores inferem, também, que o cristal cresce de forma simultânea em todas as direções. Porém, crescem em diferentes taxas, para diferentes faces, isto é, a largura do nanobastão cresce numa taxa mais lenta que o comprimento. A razão deste crescimento é que as faces (110), presentes na lateral do cristal, são aquelas que estão mais protegidas pelo surfactante CTAB. Portanto as faces (110) tem maior impedimento estérico, comparado às demais faces, frente ao acesso do ânion complexo $[\text{AuBr}_2]^-$ que, na superfície da semente em crescimento, é reduzido e incorporado à partícula. Como resultado, obtém-se a nanopartícula na forma de bastão.

Em publicação anterior, Nikoobakht e El Sayed (2001) produziram nanobastões via síntese eletroquímica, em que o agente estabilizante era o CTAB, e inferiram, a partir de análise termogravimétrica, que, na superfície dos nanobastões, o CTAB formava uma dupla camada. Basicamente, uma porção de surfactante ficaria com o grupo amina voltada para a superfície do nanobastão de ouro e outra porção dos surfactantes voltada em sentido oposto, para o exterior. Os grupos amina da porção voltada para o exterior interagem com a água presente no meio e, por esta razão, formam uma suspensão estável. Nesta Figura 25 é possível observar, ainda, que há CTA^+ “livre” afastado da superfície do ouro e esta substância também está em solução, interagindo com moléculas de água.

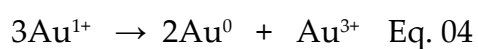
Figura 25: Dupla camada de CTAB na superfície do nanobastão de ouro



Fonte: NIKOOBAKTH E EL SAYED, 2001

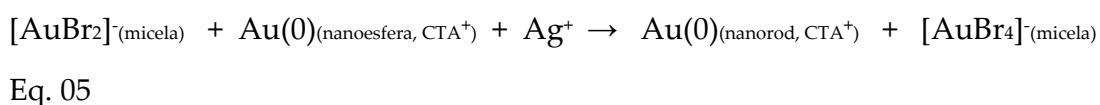
Diversos grupos no mundo inteiro têm buscado elucidar os mecanismos de crescimento dos nanobastões, uma vez que estas informações podem contribuir de forma significativa para o avanço na formulação de nanobastões com características adequadas para aplicações específicas. (EDGAR, MCDONAGH, CORTIE, 2012; BURROWS *et al*, 2017; NIKOOBAKHT e EL SAYED, 2003). Abordaremos, aqui, mecanismos encontrados na literatura dos nanobastões de ouro, seguindo este caminho de entender melhor os detalhes que envolvem os nanobastões para chegar à finalidade de compreender que o ambiente químico superficial destes nanomateriais, responde de forma importante à sua funcionalidade.

Edgar, Mcdonagh, Cortie (2012) afirmam que, ao adicionar a semente na solução de crescimento, ocorre uma reação redox de desproporcionamento, em que o Au(I) é reduzido e oxidado a Au(0) e Au(III) simultaneamente, como mostra a equação:



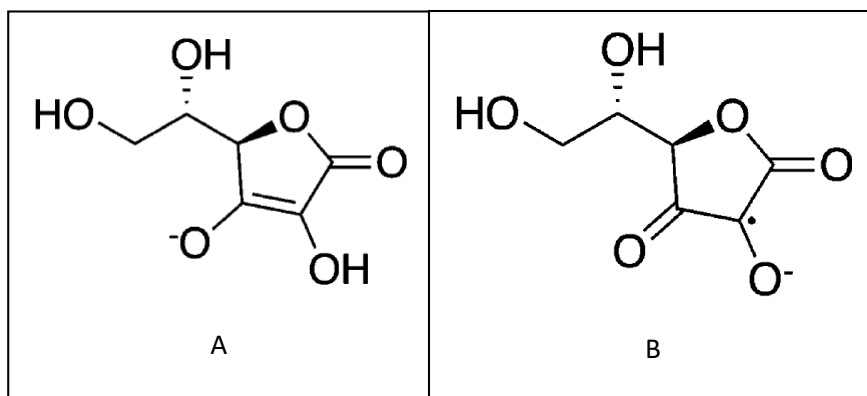
Nesta reação redox, o centro metálico do íon $[\text{AuBr}_2]^-$ transfere elétron a dois outros ânions complexos $[\text{AuBr}_2]^-$ que se reduzem a ouro zero. A espécie que

transferiu dois elétrons é oxidada formando o íon $[\text{AuBr}_4]^-$, que é reduzido pelo ácido ascórbico para $[\text{AuBr}_2]^-$. A reação de desproporcionamento é catalisada pela superfície do ouro metálico presente como semente. A reação ocorre quando o íon $[\text{AuBr}_2]^-$ entra em contato com a superfície do ouro, que catalisa a reação da equação 04. (EDGAR, MCDONAGH e CORTIE, 2012)



Por outro lado, Burrows e colaboradores (2017) concluíram que a redução do ouro $\text{Au}(\text{I})$ no crescimento dos nanobastões não ocorre por desproporcionamento e, sim, por redução direta do íon $[\text{AuBr}_2]^-$ na superfície metálica pelo ácido ascórbico. Os autores afirmam que a espécie $[\text{AuBr}_4]^-_{(\text{micela})}$ será primeiramente reduzida pelo ânion L-ascorbato, Figura 26, forma na qual o ácido ascórbico está presente devido à acidez da solução. Após adição da semente, os autores defendem a proposta de que a espécie química $[\text{AuBr}_2]^-$ é reduzida uma vez que interage com a superfície da semente de ouro e esta, por sua vez, também interage com o ácido ascórbico na forma do ânion radical L-ascorbato, Figura 26-B. O agente redutor transfere elétrons para o $[\text{AuBr}_2]^-$, formando $\text{Au}(0)$, numa reação autocatalítica. O ouro metálico é incorporado à nanopartícula e isto ocorre em maior taxa para uma face preferencialmente às demais.

Figura 26: Fórmula em linhas do L-ascorbato A e radical aniônico L-ascorbato B.



Fonte: BURROWS *et al*, 2017

Além disso, o ânion brometo permanece na composição dos Au-NBs e há indícios apontados na literatura sobre a relevância deste ânion no ambiente químico dos nanobastões de ouro. Garg e colaboradores (2010) demonstraram que os íons brometo atuam com agentes direcionadores da forma do nanobastão na síntese mediada por semente. Neste trabalho, os autores citam que analisaram alguns fatos. Por exemplo, o uso do CTACl (Cloreto de hexadeciltrimetilamônio) não levou a formação dos nanobastões e a presença do íon iodeto, I⁻, interferiu impedindo a formação dos nanobastões. A concentração micelar crítica do CTAB, para que os íons CTA⁺ atuem como esperado, formando um *template* mole, é por volta de 1 mmol L⁻¹, cerca de 100 vezes menos que a concentração de CTAB necessária para produzir o Au-NBs. Estes fatos os levaram a avaliar o papel do Br⁻ na síntese do Au-NBs.

Garg e colaboradores (2010) realizaram alguns experimentos, tais como: substituição do CTAB por CTACl na síntese dos Au-NBs ou utilização da mistura de CTAB e CTACl em diferentes proporções, sempre tendo o cuidado de manter a concentração de CTA⁺ do sistema 0,1 mol L⁻¹. Nesses experimentos, não foi

observada a formação de Au-NBs. Esses autores propuseram, também, baixar a concentração de CTAB para $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e utilizar íon brometo de fonte extrínseca, na forma de NaBr, em concentração de $0,08 \text{ mol L}^{-1}$. Neste caso, eles puderam observar a formação dos nanobastões de ouro. Os autores concluíram que o íon Brometo tem papel de direcionador da forma de nanobastões de ouro e, portanto, é fundamental nesta síntese. Eles ainda citam que o CTA^+ tem uma ação fundamental, uma vez que proporcionam proteção estérica aos nanobastões e os íons brometo não têm este papel.

Brown e Wiley (2020) estudaram o papel do íon brometo na síntese via semente dos nanobastões de ouro. Compararam crescimento de nanoestruturas em solução de CTACl, solução de CTACl com adição de NaBr, e solução de CTAB. Eles avaliaram os processos mediados pela superfície, que ocorrem em cristais de semente em nanoescala, ampliando e observando como reações redox heterogêneas em macroeletrodos, usando a voltametria para realizar este estudo. Para isto, em vez de soluções de crescimento contendo a semente, nenhuma semente foi adicionada a essas soluções com a finalidade de evitar a redução espontânea do AuBr_2^- . No lugar das sementes, eletrodos de Au(111) e Au(100) modelaram as facetas presentes em sementes de ouro pentageminado. A partir disso, foi possível comparar efeitos da estrutura da superfície do ouro na cinética de adição atômica. A partir dos experimentos e cálculos, os autores observaram que a face Au(111) obteve uma taxa de adição atômica $42 \pm 7\%$ e $46 \pm 8\%$ maior que a face Au (100) em solução de CTACl, contendo 50mM de NaBr e solução 50mM de CTAB, respectivamente. Os autores observaram que os valores indicadores de adição atômica coletados na face Au(111) permaneceram inalterados em todas as soluções (CTACl, CTACl + NaBr ou CTAB), porém os valores indicadores de adição atômica coletados na face Au(100) diminuíram na presença de brometo em relação aos ensaios CTACl. A partir destes dados, concluíram que o crescimento anisotrópico dos Au-NBs é devido, em parte, à

adição atômica de ouro seletiva, preferencial em uma face Au (111) devido à passivação que o íon brometo exerce na face Au (100).

Também avaliaram que soluções de crescimento contendo NaBr na ausência de CTA^+ , produziram nanopartículas sedimentadas na forma de agregados de Au. Desta maneira, inferiram que, embora o CTA^+ não cause adição atômica seletiva nas face do cristal, é fundamental para a estabilização coloidal de sementes de ouro e síntese de Au-NBs. Além disso, Brown e Wiley (2020) monitoraram a redução do ouro em função do tempo no sistema contendo CTA^+ e NaBr e no sistema contendo NaBr na ausência de CTA^+ . Observaram que, na ausência de CTA^+ , os íons ouro foram reduzidos em quase sua totalidade em apenas 10 minutos, enquanto que, no sistema que continha CTA^+ , apenas a metade dos íons ouro foram reduzidos em 10 minutos. A conclusão foi que o papel do CTA^+ é diminuir a taxa de reação redox para um grau propício para o crescimento de Au-NBs, bem como evitar a agregação de nanopartículas.

Neste trabalho de doutorado, foram realizadas medidas de espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS), de forma a avaliar o papel das espécies de prata no ambiente químico dos Au-NBs. Porém, são observados íons brometo e CTA^+ na superfície dos nanobastões de ouro, o que nos leva a concordar com as conclusões de Brown e Wiley (2020). No entanto, não foi objetivo deste trabalho avaliar o papel do íon brometo na síntese, portanto, nos limitamos a essa consideração.

Além das espécies químicas citadas anteriormente, CTA^+ e Br^- , o cátion prata (I), Ag^+ , tem papel orientador da forma, assim como o CTA^+ . Existe mais de um tipo de explicação acerca do mecanismo da prata na síntese de nanobastões de ouro. No presente trabalho de doutorado, foi analisado o ambiente químico da superfície dos nanobastões de ouro por meio da espectroscopia fotoeletrônica de Raios-X e foi percebido que a prata presente nos nanobastões de ouro aparecia

em dois estados químicos da prata/ion prata (OLIVEIRA *et al*, 2021). O estado químico da prata aparece na literatura como uma controvérsia e isto dificulta uma compreensão mais ampla do ambiente químico que envolve e/ou permeia os nanobastões de ouro. O entendimento do ambiente químico superficial dos nanomateriais, destacando aqui a espectroscopia fotoeletrônica de Raios-X, de fato é uma oportunidade de contribuir, não somente com a pesquisa dos nanobastões de ouro, como com várias nanoestruturas que têm o ambiente químico das suas superfícies como via para uso destes materiais em inúmeras aplicações.

5.4. O ambiente químico dos nanobastões de ouro e o papel da prata

Como citado anteriormente, o nitrato de prata utilizado na formulação dos nanobastões de ouro na síntese mediada por semente e assistida por íons prata, tem papel importante na razão de aspecto dos Au-NBs, bem como no rendimento destes materiais. (ORENDORFF and MURPHY, 2006; LIU and GUYOT-SIONNEST, 2005). Um resumo relevante de propostas de função da prata na produção dos Au-NBs é citado por Lorse e Murphy (2013). Estes mecanismos estão apoiados em uma série de dados anteriores, a seguir são citados dois exemplos. Os mecanismos envolvem a ação de um complexo íon prata-brometo-CTA⁺, como um agente de cobertura específico para a face, e a deposição subpotencial (UPD) de Ag(0), que ocorre preferencialmente em faces específicas do cristal de Au levando à quebra de simetria e, portanto, à formação dos Au-NBs.

Niidome e colaboradores (2009) utilizaram experimentos de espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção / ionização a laser assistida por superfície (SALDI-MS), uma variação da espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção / ionização a laser assistida por matriz (MALDI-MS), para discutir a forma química da prata nas superfícies de Au-NBs produzidos pela rota fotoquímica. Naquele trabalho, Niidome e outros (2009) observaram que espécies de íon prata-brometo (AgBr₂⁻) e/ou associadas a CTA⁺ apareciam nos nanobastões de ouro. A partir desta e outras observações, os autores propuseram que um complexo de brometo de prata(I) (AgBr₂⁻ ou CTA⁺-Br-Ag⁺) interage com a superfície do ouro nas faces laterais, assistindo o crescimento das partículas na forma de bastões. Outro mecanismo proposto por Guyot-Sionnest (2005), que supõe a deposição de subpotencial (UPD), isto é, um processo que ocorre através da formação de uma camada de metal sobre um

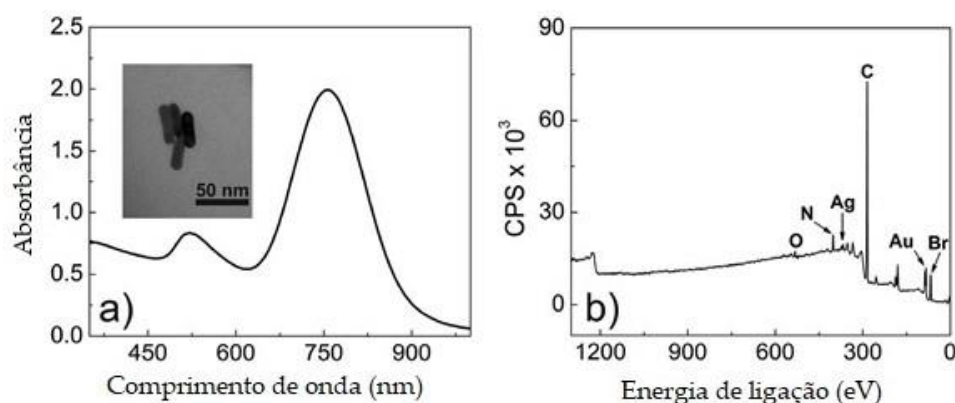
substrato de metal mais nobre, isto é, o metal (prata) pode se depositar em uma superfície de outro metal em um potencial significativamente menos negativo do que para a deposição em massa. A UPD ocorre quando um substrato metálico é catodicamente polarizado e íons de um metal menos nobre podem ser depositados sobre este substrato, neste caso a prata seria o adsorbato e o nanobastão de ouro o substrato. (GRZELCZAK *et al*, 2020.; LIO e GUYOT-SIONNEST 2005). A deposição da prata ocorre preferencialmente na face mais aberta, isto é, menos condensada, pois lá há mais átomos vizinhos para o adsorbato, portanto favorecendo maiores interações quando comparada às outras faces. A face do cristal pentageminado de ouro menos adensada é a [100], comparado com a face [111], portanto há deposição preferencial da prata na face [100], resultando no maior impedimento ao crescimento do cristal de ouro a partir destas faces como resultado observa-se a formação os bastonetes. (LIO e GUYOT-SIONNEST, 2005).

A partir das propostas supracitadas sobre o papel da prata no mecanismo de crescimento do nanobastão de ouro, este trabalho será direcionado a partir do mecanismo de deposição sobrepotencial, UPD, uma vez que os dados de caracterização obtidos e recentemente publicados num artigo intitulado “*Surface studies of the chemical environment in gold nanorods supported by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and ab initio calculations*”, são coerentes com esta proposta (Figura 27).

➤ XPS

Dados de XPS obtidos a partir de Au-NBs preparados via método de semente assistido por íons prata Ag(I) de Nikoobakht e El Sayed (2003), são apresentados na Figura 27:

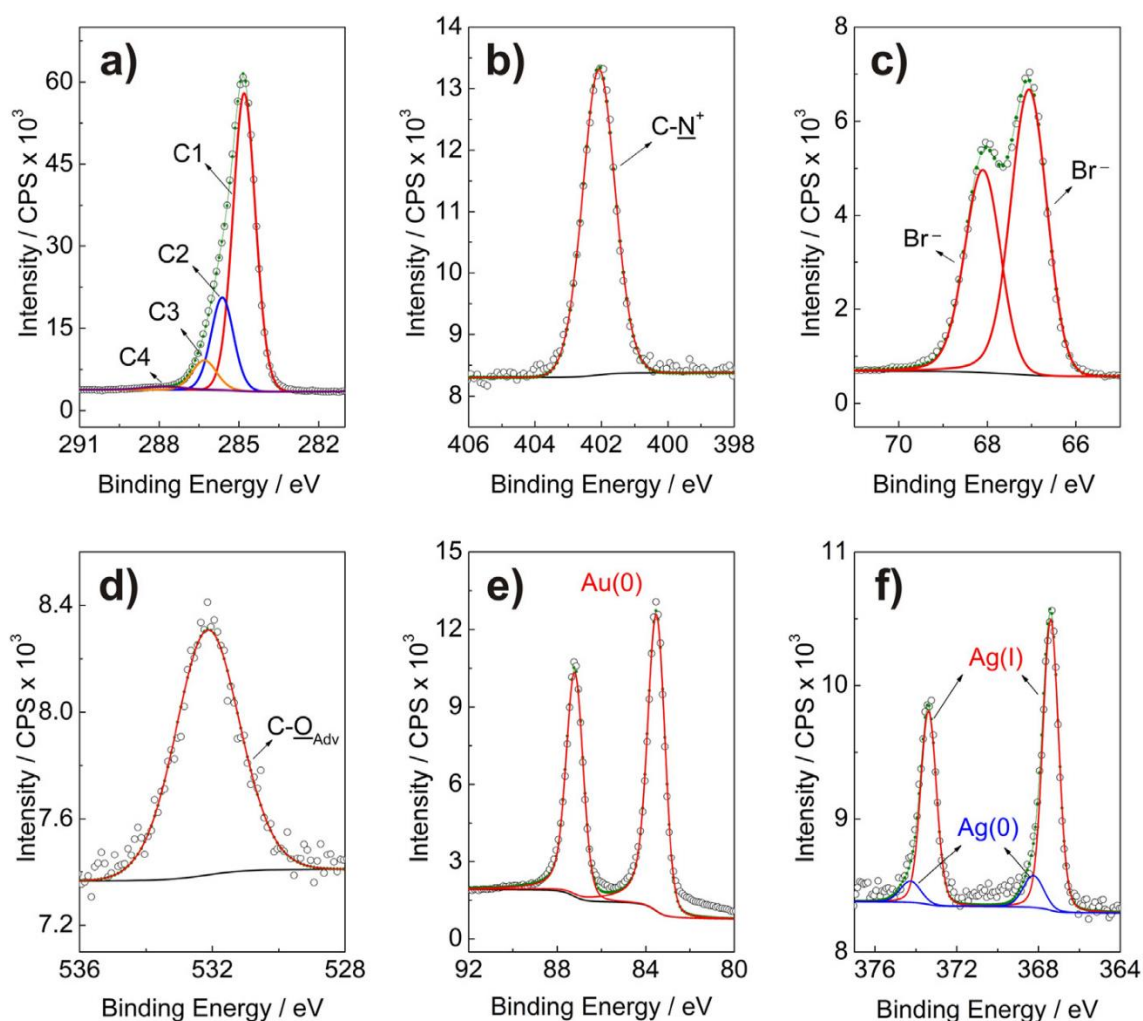
Figura 27: Espectro survey XPS e espectro UV-Vis de Au-NBs.



Fonte: OLIVEIRA *et al* (2021)

A Figura 27 mostra o espectro *Survey* dos nanobastões de ouro, cuja imagem de TEM e espectro de UV-Vis destes materiais, apresentadas à esquerda, permitem inferir que a amostra é composta, de fato, por nanobastões de ouro. No espectro *survey*, pode-se observar a composição elementar presente na amostra, o ouro, a composição da nanopartícula, além disso a prata, carbono, nitrogênio, bromo e oxigênio. A partir destes dados e relacionando com o item 5.1, no qual aparecem as espécies químicas presentes no preparo dos Au-NBs, já é possível, direcionar, em uma análise geral das substâncias, quais são as fontes destes elementos presentes na composição dos Au-NBs. Para melhor compreender a origem e o estado químico dos elementos presentes nos Au-NBs, foram feitas medidas de XPS de alta resolução de C 1s, N 1s, Br 3d, O1s, Ag 3d e Au 4f, conforme apresentado na Figura 28.

Figura 28: Espectros de alta resolução dos Au-NBs tratados por deconvolução dos elementos nas regiões (a) C 1s, (b) N 1s, (c) Br 3d, (d) O 1s, (e) Au 4f e (f) Ag3d.



Fonte: OLIVEIRA *et al* (2021)

Na Figura 28, podem ser observados gráficos de círculos abertos que se referem aos dados brutos (CPS), a linha cheia é o envelope, os demais picos correspondem às espécies químicas indicadas. Na Figura 28-a, pode-se observar o sinal de energia de ligação na faixa de 284,8eV, sinal de maior destaque relativamente aos demais, que pode ser associado ao carbono ligado a carbono ou hidrogênio, C-C e C-H, da cadeia carbônica. Ao analisar brevemente as espécies químicas utilizadas na síntese dos Au-NBs no item 3.1, bem como espécies formadas após transformações químicas, item 3.2, pode-se atribuir este

sinal à cadeia carbônica do CTA⁺ presente na amostra. Para melhor fundamentar a atribuição deste sinal, uma vez que este foi utilizado para calibrar todos o espectro, calculou-se a relação entre o carbono e nitrogênio, por meio do dado experimental da concentração relativa porcentual, observado na tabela a seguir, $C1/N = 63.19/3.77 = 16.8$, dado coerente com a relação teórica $C1/N=15$. (DEL CANO *et al*, 2020; BOUFI *et al*, 2013; JASMIN *et al*, 2017; TECHANE, GAMBLE CASTNER, 2011)

O sinal com energia de ligação em 285,6 eV identificado no gráfico como C2 foi atribuído ao carbono ligado ao nitrogênio de amina ($-N-(\underline{C}H_3)_3$). Pode-se associar este, aos carbonos ligados ao grupo amina terminal do CTA⁺. O componente de maior energia C3, 286,3 eV, foi atribuído ao carbono ligado a nitrogênio ($\underline{C}-N-(CH_3)_3$). E, foi utilizado a razão carbono C2, carbono C3, $C2/C3$, para respaldar a referida atribuição. De acordo com os dados da tabela 2, a relação experimental carbono C2 e carbono C3 ($C2/C3$), a partir da concentração relativa porcentual, foi $C2/C3 = 19,64/6,9 = 2,84$, bastante próximo da razão teórica presente no CTA⁺, $3C2/1C3 = 3$. (LI *et al*, 2017; BOUFI *et al*, 2013; JASMIN *et al*, 2017; TECHANE, GAMBLE CASTNER, 2011). O componente de maior energia C4 foi atribuído ao carbono ligado a Oxigênio um componente fraco próximo de 287,8 eV atribuído ao carbono adventício ($C_{adv} = O$) ou grupo amida. (TECHANE, GAMBLE CASTNER, 2011; BOUFI *et al*, 2013) Estas atribuições de carbono adventício podem estar associadas a compostos extrínsecos adsorvidos na superfície da amostra.

O espectro (Fig. 28-b) de energia de ligação 402,1eV associado a nitrogênio N1s, foi atribuído à amina completamente substituída do grupo terminal do surfactante CTA⁺. (LIU *et al* 2007; AHMAD *et al* 2014; HAMAD *et al*, 2008; HUBERT, TESTARD e SPALLA, 2008; BOUFI *et al*, 2013). O espectro (Fig.28-d) do oxigênio O1s foi identificado com energia de ligação na faixa de 532,1eV, que

pode ser associada ao oxigênio ligado a carbono adventício C=O. (ROUXHET e GENET, 2011; BOUFI *et al*, 2013).

O pico e seu dubleto, na faixa de energia de ligação 67,0 e 68,1 eV, Figura. 28-c, é atribuído ao bromo, correspondente a 3d_{5/2} e 3d_{3/2}, respectivamente, e pode ser associado ao ânion brometo oriundo do CTAB. (HUBERT, TESTARD e SPALLA, 2008).

Tabela 2: Composição química da superfície dos Au-NBs obtidos por espectro de alta resolução de XPS

Regiões do elemento	Energia de ligação	Atribuições sugeridas	Concentração relativa (at. %)	Total (%)
C 1s	284.8	<u>C</u> -H, <u>C</u> -C (C1)	63.2	91.0
	285.6	-N-(<u>C</u> H ₃) ₃ (C2)	19.6	
	286.3	<u>C</u> -N (C3)	6.9	
	287.8	<u>C</u> _{adv} = O (C4)	1.3	
N 1s	402.1	- <u>N</u> ⁺	3.8	3.8
Br 3d _{5/2}	67.0	<u>Br</u>	1.8	3.1
Br 3d _{3/2}	68.1		1.3	
O 1s	532.1	C- <u>O</u>	0.8	0.8
Au 4f _{7/2}	83.5	Au(0)	1.1	1.1
Au 4f _{5/2}	87.2			
Ag 3d _{5/2}	368.2	Ag(0)	0.03	0.23
Ag 3d _{3/2}	374.3			
Ag 3d _{5/2}	367.4	Ag(I)	0.2	
Ag 3d _{3/2}	373.4			

Fonte: OLIVEIRA *et al*, 2021 (modificada)

Nos espectros, foram identificados picos na faixa de energia de ligação 83,5 eV e 87,2 eV, Fig.28-e, associado ao sinal Au4f7/2 e seu dubleto Au4f5/2 respectivamente. Estes sinais correspondem ao Au(0) dos nanobastões de ouro, presente na amostra, foi também identificado Au-NBs por meio do espectro de UV-Vis e a microscopia eletrônica de transmissão. Os picos do fotoelétron Au 4f possuem valores de energia de ligação, observados na literatura, por volta de 84,0 eV e 87,0 eV para o Au 4f7/2 e Au 4f5/2, respectivamente, geralmente atribuídos ao ouro zerovalente. Outros parâmetros experimentais do presente trabalho, como FWHM e spin-orbita split apresentaram valores de 0,94 eV e $D = 3,7$ eV, corroboram a atribuição do Au4f ao espectro Figura 28-e. Do ponto de vista químico, a origem dessas energias de ligação em energias mais baixas pode ser evidência da interação do ouro superficial com diferentes espécies (ânion brometo, CTA⁺ e prata) acomodadas na superfície do cristal. (HOSTETLER, 1998; WATANABE, 2016; YANG, WANG, LIU, 2019; PETERS *et al*, 2013; FIGUEIREDO *et al*, 2011; JASMIN *et al*, 2017; RADNIK, MOHR, CLAUS, 2002; FUGGLE, 1980.)

Nos espectros Figura 28-f, foram observados os sinais na faixa de 367,4eV e 373,4eV, que podem ser associados ao íon prata (Ag(I)), e o sinal e seu dubleto, respectivamente, Ag⁺3d5/2 e Ag⁺3d3/2. Estas espécies provêm do nitrato de prata utilizado na síntese dos nanobastões de ouro (WATANABE *et al*, 2016). Além do sinal de Ag(I), os dados mostram outro sinal num estado químico distinto, da prata Ag 3d5/2 e Ag 3d3/2, na faixa de 368,2 eV e 374,3 eV, respectivamente, atribuídos à prata no estado de oxidação zero (Ag(0)). A proposta de formação da Ag(0), na superfície do ouro é baseada no mecanismo de crescimento dos Au-NBs proposto por Lio e Guyot-Sionnest (2005). A característica de destaque no espectro da Figura 28-f é a grande diferença na concentração entre duas espécies de prata nos nanobastões: Ag(I) compreende 85,7% da prata total, enquanto Ag(0) compreende 14,3%. Os experimentos realizados no presente trabalho nos levam a concluir que o estado químico da prata pode estar de acordo com a

hipótese proposta por Ye e colaboradores (2020), que explica a oxidação da monocamada de Ag(0) sobre Au-NBs. Naquele trabalho, os autores detectaram a presença de uma camada superficial de prata nos Au-NBs. Monitorando a evolução do sinal de espalhamento de plasmon, observou-se que, na lavagem do Au-NBs, a camada de prata inicialmente protegida pelo surfactante CTA⁺, é oxidada assim que o surfactante é desorvido devido ao processo de solubilização do CTA⁺ associado as nanobastões na solução de lavagem. Em nossos experimentos, foi necessário remover o excesso de surfactante dos Au-NBs, lavando as amostras com uma solução de CTAB diluída para realizar as medições de XPS. Portanto, durante o processo de lavagem e/ou manuseio de Au-NBs no ar, pode ter ocorrido a oxidação dos átomos de Ag na superfície dos nanobastões. (WATANABE, 2017; YE *et al*, 2020; OLIVEIRA *et al*, 2021)

A Partir dos dados de XPS Figura 28-f, em que foram detectados dois estados químicos para Ag, pode-se propor que há formação de Ag(0) pelo mecanismo de sobrepotencial UPD e sucedendo o procedimento de lavagem, pós síntese, também pôde levar a um processo de oxidação parcial da camada de prata, gerando a presença de duas espécies Ag(0) e Ag(I) na superfície do ouro. (OLIVEIRA *et al*, 2021)

A partir dos dados experimentais obtidos via XPS dos Au-NBs, pensou-se em obter dados a partir de cálculos teóricos, com a finalidade de comparação e para complementar as informações experimentais sobre a contribuição de diferentes espécies de Ag nos Au-NBs. Foi realizado cálculos *ab initio* para simular estado químico dos nanobastões de ouro. Foi comparado os dados experimentais de energia de ligação dos componentes de Au e Ag com àqueles obtidos via aquisição teórica usando o pacote WIEN2K/VASP. Importante destacar que o suporte computacional foi significativamente simplificado, considerando apenas a nanoestrutura metálica e os átomos se comportando de forma massiva. Pequenos clusters com aproximadamente 50 átomos metálicos se comportam

como moléculas grandes, enquanto os clusters grandes com 300 ou mais átomos metálicos se comportam com metal massivo. (HOSTETLER et al, 1998). Na tabela 3, os dados experimentais e teóricos de energia de ligação (EL) do Au-NBs, podem ser observados e comparados.

Tabela 3: Parâmetros adquiridos via XPS dos Au-NBs de elementos metálicos em eV obtidos via experimental e cálculos *ab initio*.

	Experimentais	Teóricos
Dubleto Au 4f		
EL (eV)	83,5 e 87,2	83,4 e 87,4
FWHM (eV)	0,94	---
Spin-orbital <i>split</i> (eV)	3,7	4,0
Dubleto Ag 3d		
EL (eV)	368,2 e 374,3	365,5 e 372,0 (superficial) 366,5 e 372,8 (intersticial) 365,8 e 372,2 (substitucional)
FWHM (eV)	1,01	---
Spin-orbital <i>split</i> (eV)	6,0	6,5 (superficial) 6,3 (intersticial) 6,4 (substitucional)

5.5. Importância do XPS na elucidação do ambiente químico das nanoestruturas metálicas.

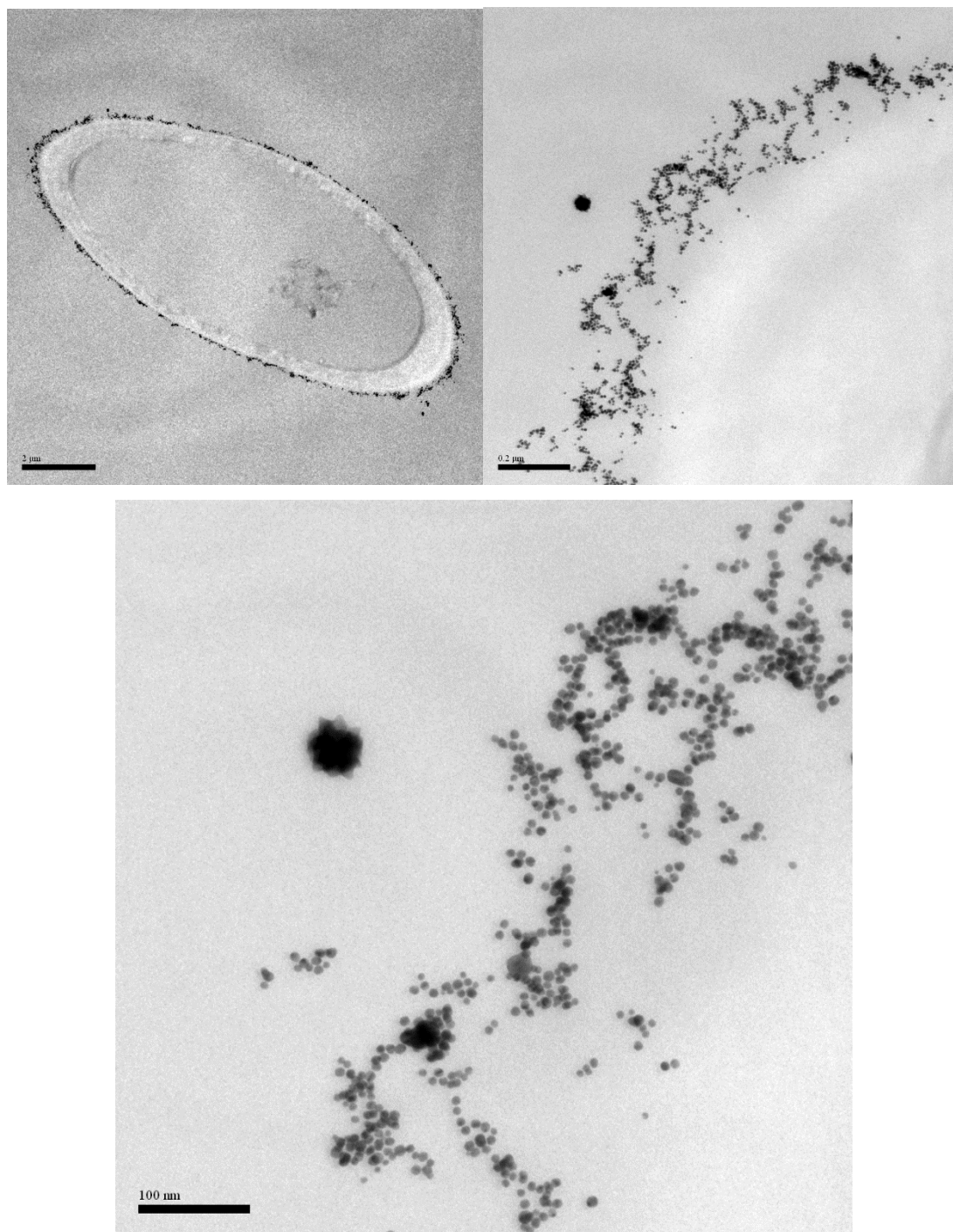
A aplicação dos diversos nanomateriais, nanofios, nanotubos, nanoesferas, nanobastões, nanopirâmides, presentes na literatura, requer funcionalização de suas superfícies. Assim estas nanoestruturas podem atuar em grande variedade de aplicações. (WANG *et al*, 2022; FONTES *et al*, 2014; EL SAYED, I., HOUANG, EL SAYED, 2005; HUANG *et al*, 2006). A funcionalização envolve a interação ou ligação de substâncias às superfícies dos nanomateriais. Portanto conhecer o ambiente da superfície das nanoestruturas é relevante. O ambiente químico dos nanobastões de ouro produzidos no presente trabalho foi discutido no item 5.4.1, onde foi possível observar que várias espécies químicas, Ag^0 , Ag^+ , Br e CTA^+ , interagiram com a superfície do nanomaterial. Este entendimento é relevante para a pesquisa destes materiais em especial suas aplicações. (OLIVEIRA *et al*, 2021). Pode-se observar na literatura que nanopartículas metálicas são funcionalizadas e as espécies químicas citadas tais como CTA^+ , podem ser substituídas por outras substâncias, ou até mesmo por interfaces tais como fungos e bactérias, para finalidades diversas. (BIGALL *et al*, 2008; FAKHRULLIN *et al*, 2012; NEL *et al*, 2009).

A importância de conhecer o ambiente químico para nanomateriais, por exemplo, àqueles funcionalizados em interfaces biológicas é também relevante para as finalidades a que os bio-nanohíbridos se destinam. Neste quesito, o XPS tem grande significado, pois nos permite, associado a outras técnicas, conhecer a forma química das substâncias que estão presentes na superfície dos nanomateriais, trazendo luz a detalhes dos nanomateriais intrigantes e, muitas vezes, fundamentais para o avanço da pesquisa. Um exemplo da contribuição do XPS, associado a outras técnicas é marcado no artigo intitulado “*Evidence for fungi and gold redox interaction under Earth surface conditions*”. Neste trabalho, Bohu *et al* (2019) apresentam fungos como responsáveis pelo biointemperismo de minerais,

levando a oxidação do ouro metálico (Au^0). O trabalho de Bohu e colaboradores (2019) nos fez olhar, mais uma vez, para dados experimentais (XPS) do nosso grupo de pesquisa, em que foram preparados materiais bio-nanohíbridos os quais são constituídos por fungos filamentosos decorados com nanopartículas metálicas, ouro e paládio.

Estes bio-nanohíbridos nomeados de fungos@NPs-AuPd, cujo fungo é o *Aspergillus niger*, foram produzidos através de método em que os fungos foram previamente cultivados por 2 meses em suspensões coloidais de Au-NPs, após o crescimento do fungo, a suspensão de NPs foi substituída por água deionizada esterilizada. Em seguida, estes bio-híbridos foram transferidos para frascos de penicilina e misturados com ácido ascórbico e após isto, foi adicionada solução de PdCl_2 e água deionizada esterilizada. A solução contendo o bio-híbrido foi agitada em shaker fechado overnight. A coloração do fungo escureceu após o período de agitação. No fim, obteve-se o bionanohíbrido fungos@NPs-AuPd ao qual foram feitas diversas caracterizações incluído MET, Figura 29 e destacando medidas de XPS. (FONTES, A. 2016; FONTES *et al*, 2021)

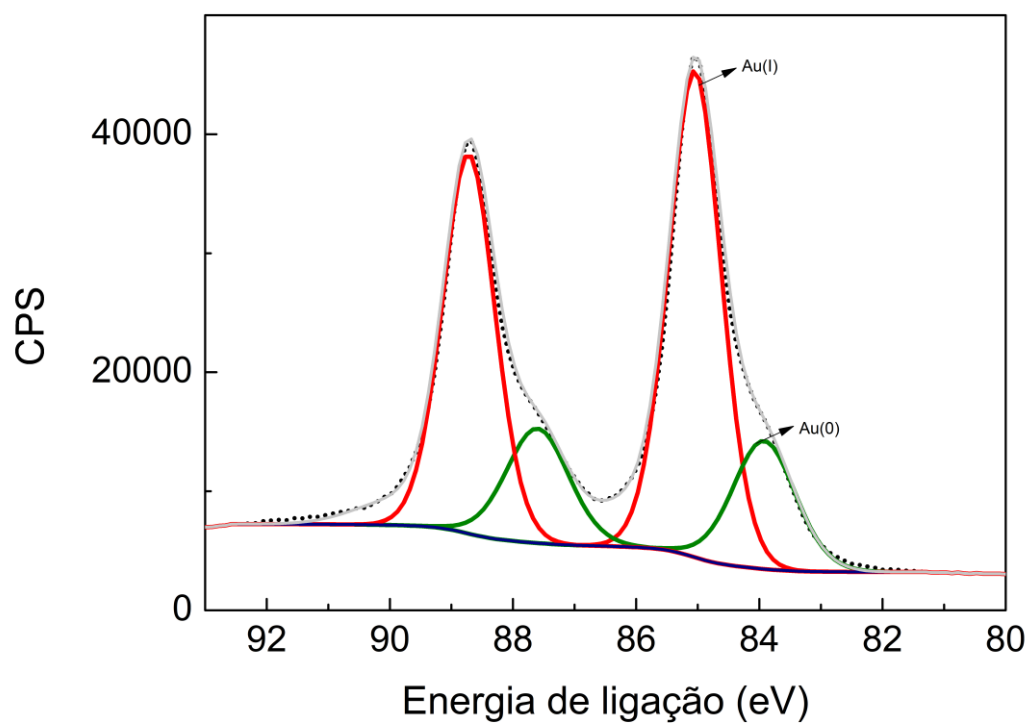
Figura 29: Microscopia eletrônica de transmissão do bionanohíbrido fungos@NPs-AuPd em corte transversal.



Pode-se notar, no preparo dos fungos@NPs-AuPd, que as nanopartículas de ouro, cujo estado de oxidação é ouro zero foram inseridas no sistema contendo o fungo. Essas nanopartículas interagiram com o fungo, associando-se à sua

superfície a qual é posteriormente decorada com nanopartículas de paládio. Ao analisar o XPS deste nano-biohíbrido, observamos, na Figura 30, sinais de ouro no estado químico Au(0) e Au(I), no entanto, antes do fungo crescer, havia ouro(0) na composição das nanopartículas. No preparo das mesmas foi usado agente redutor potente, borohidreto de sódio e após o crescimento do fungo, em meio a suspensão das nanopartículas de ouro, Au NPs, o material foi lavado com água repetidas vezes. Ainda assim, o ouro no estado de oxidação (I), Au⁺, está presente na composição do fungos@NPs-AuPd. Ao analisar, comparativamente, o espectro de XPS do ouro do fungos@NPs-AuPd com o dos nanobastões de ouro, do presente trabalho de doutorado, neste último, após etapas de lavagem e centrifugação, não é observado a presença de ouro (I), mesmo destacando que os nanobastões são produzidos com agente redutor brando, ácido ascórbico. Analisando estes dados, à luz do trabalho de Bohu e colaboradores (2019), podemos propor que, na produção do bio-nanohíbrido o fungo oxida parte do ouro do Au(0)→Au(I). Estas informações marcam a importância do XPS para o entendimento do ambiente químico dos diversos nanomateriais, destacando aqueles que estão associados em interface biológica complexa tal como fungos filamentosos. O avanço na pesquisa e aplicações destes materiais podem ter grandes contribuições com a elucidação das substâncias e a forma química presente em suas superfícies. Salientamos, aqui, caminhos que os dados de XPS citados trazem como perspectivas de trabalhos futuros.

Figura 30: Espectros de XPS de alta resolução do ouro dos fungos@NPs-AuPd



Fonte: Própria

5.6. Au-NRs síntese NINA

A busca pela produção de nanobastões de ouro de qualidade, em quantidade adequada, baixa polidispersividade e com controle de razão de aspecto desejado, como mencionado anteriormente, e reforçado aqui, define as últimas duas décadas de pesquisa deste nanomaterial. Até o momento, a metodologia mais popular é a síntese mediada por semente assistida por íons prata(I). No entanto, devido a questões relativas i- à baixa reprodutibilidade e ii- a pequena quantidade do material obtido de uma única síntese de Au-NBs, surgiu a necessidade de buscar alternativas de produzir maior quantidade de nanobastões de ouro. Além disso, a utilização de Au-NBs em dispositivos práticos ou comercialmente viáveis se faz necessária através da produção de NPs em larga escala. Baseamo-nos no trabalho de NIKOOBAKHT e EL-SAYED (2003) e, a partir deste ponto, surgiu uma proposta de síntese que possa ser utilizada universalmente às sínteses mediadas por semente e assistidas por prata presentes na literatura. O objetivo foi adaptar a estratégia de síntese NINA, para obter grandes volumes de Au-NBs de sínteses já estabelecidas na literatura. A estratégia de síntese NINA foi desenvolvida no presente trabalho, a partir da síntese clássica de Nikoobakht e El-Sayed (2003), cujo volume é 10 mL e possui baixa reprodutibilidade. (NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003; BURROWS *et al*, 2017). Na Figuras 31 e 32, são apresentados esquemas comparativos da síntese de El-Sayed original e a síntese NINA.

Figura 31: Esquema da síntese da semente (a) NiKoobakht e El-Sayed (2003) (b) Síntese NINA

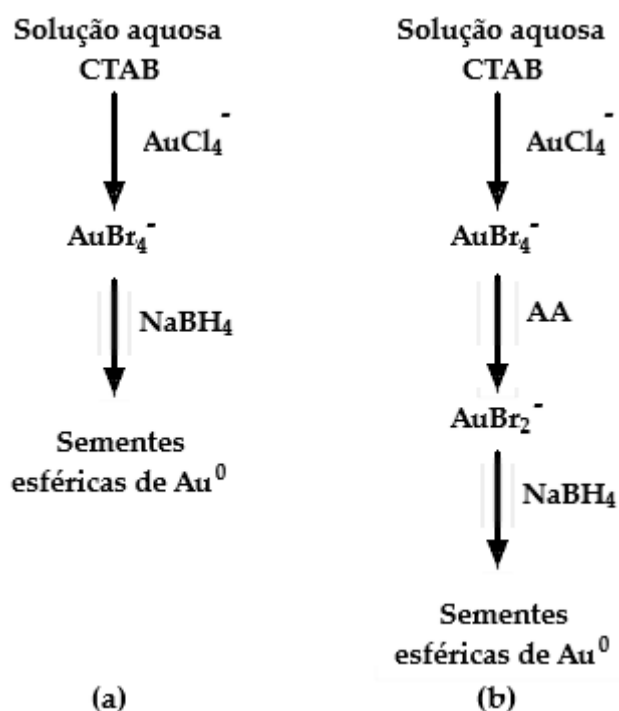
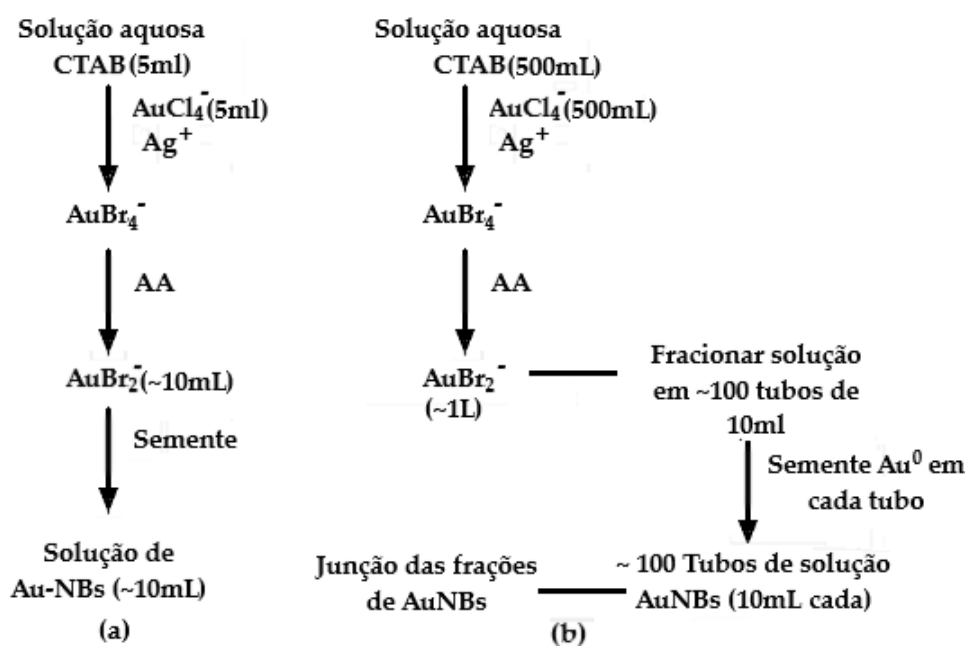


Figura 32: Esquema da síntese da solução de crescimento e nanobastões (a) NiKoobakht e El-Sayed (2003) (b) Síntese NINA



A fim de melhor entender os pontos supracitados, podemos analisar a baixa reprodutibilidade da síntese mediada por semente como sendo devida a vários motivos: (BURROWS *et al*, 2017; GOLE e MURPHY, 2004)

- Temperatura do ambiente interno (laboratório)
- Massa do borohidreto de sódio medido, devido ao fato de ser higroscópico.
- Velocidade de agitação da solução semente na adição do NaBH_4 .
- Tempo de envelhecimento da semente.
- Quantidade da semente adicionada à solução de crescimento.
- Quantidade de ácido ascórbico adicionado e sua concentração.
- Tempo entre a adição do ácido ascórbico na solução de crescimento e a adição da solução semente à solução de crescimento.

Diante dos diversos experimentos de sínteses realizado ao longo do trabalho de doutorado, que não foram reprodutivos ao longo do tempo, e dos fatores citados acima, que contribuem com a baixa reprodutibilidade da síntese, pensou-se em uma estratégia em que se pudesse obter grande quantidade de nanobastões de ouro com propriedades uniformes, evitando reproduzir (replicatas) a síntese diversas vezes para obter quantidade de material homogêneo suficiente para caracterizar, funcionalizar e aplicar estes Au-NBs.

Apoiados nessa ideia, foram realizados testes até que foi obtida a rota de síntese, Figura 32-b, na qual foi possível sintetizar quantidades maiores dos nanobastões de ouro a partir da produção de grandes quantidades de solução de crescimento, seguido do seu fracionamento para a introdução da solução semente e, por fim, após o crescimento dos Au-NBs, as frações serem agrupadas. Nesta estratégia de síntese, também foi modificada a forma que produzimos a semente de ouro, inspirado nos trabalhos de GONZÁLEZ-RUBIO e colaboradores (2019). Antes da adição de borohidreto de sódio, realizou-se uma

pré-redução de Au(III) para Au(I) com ácido ascórbico, como apresentado na Figura 15-b. Além da obtenção de quantidades 10 e 100 vezes maiores de suspensão aquosa de nanobastões de ouro, estima-se ser possível sintetizar quantidades ainda maiores, tais como, 800 vezes a suspensão de Au-NBs da síntese clássica. Este valor de 800 vezes, foi estimado com base na quantidade de semente produzida na síntese proposta, 10 mililitros, que é suficiente para ser adicionada em pouco mais de 800 frações da síntese NINA.

A partir dos espectros de UV-Vis da síntese NINA, foi possível analisar a sua viabilidade, comparativamente, à síntese clássica de NIKOBAKHT e EL-SAYED (2003).

Observou-se na síntese de NIKOBAKHT e EL-SAYED (2003), assim como na literatura do Au-NBs, que o ponto crítico para o crescimento dos Au-NBs é a etapa que se segue à adição da semente na solução de crescimento, chamada do inglês "*Symetry breaking*", ou quebra de simetria, como mencionado anteriormente. Este é um ponto importante da síntese mediada por semente e assistida por íons prata, de forma será destacado novamente. (GONZALEZ-RUBIO, 2019; WALSH *et al*, 2017). É, neste momento, que ocorre a mudança da simetria esférica, característica da semente, para o alongamento desta, com a adição de átomos de ouro, preferencialmente em certas faces do cristal em detrimento de outras. Nas faces nas quais não há significativa inclusão de átomos de ouro, ocorre isto pois aquelas faces encontram-se passivadas por espécies químicas, Br⁻, prata (Ag⁰ e Ag⁺), CTA⁺. Desta forma, devido ao crescimento seletivo de faces específicas do cristal, surge um nanobastão. (WALSH *et al*, 2017; BROWN e WILEY, 2019).

Para resolver esta questão, foi pensado em preservar os parâmetros na etapa de quebra de simetria, de forma tal que seria preparada grande quantidade da solução de crescimento e esta seria fracionada para a realização da etapa de

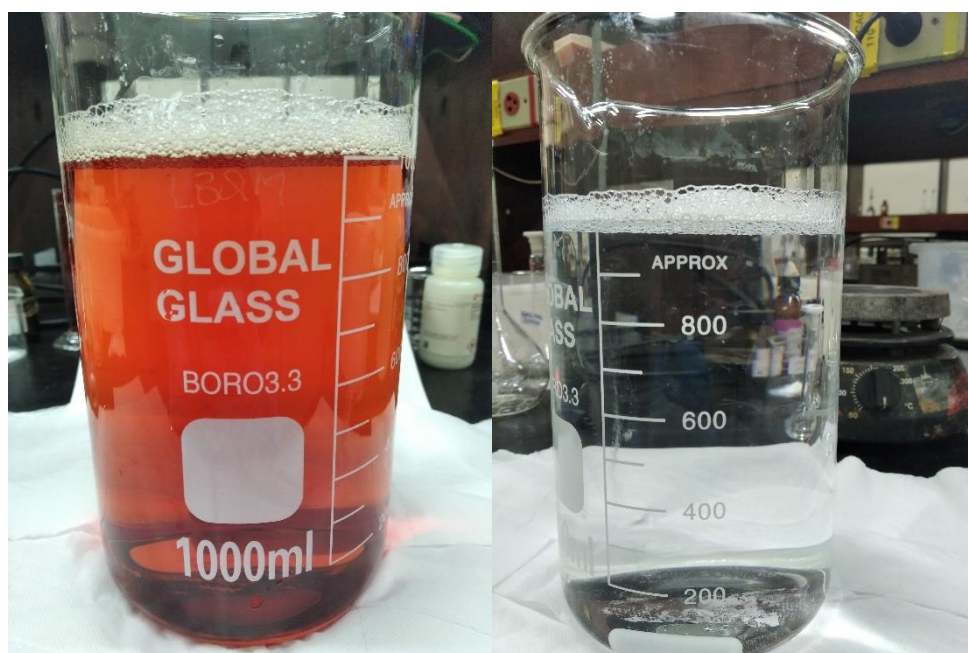
quebra de simetria, após esta etapa crítica, as frações seriam unidas. Esta estratégia se mostrou como uma possibilidade para obtenção de grandes quantidades de Au-NBs, desta forma demos seguimento aos experimentos, e eles são descritos a seguir.

A síntese de nanobastões de ouro NINA, foi realizada numa rota de 5 etapas:

- i-Produção de grande quantidade da solução de crescimento;
- ii-Fracionamento da solução de crescimento em frações de 10 mL cada unidade;
- iii- Preparação da semente;
- iv- Introdução da semente em cada porção da solução seguido do crescimento do Au-NBs;
- v- Junção das porções de Au-NBs.

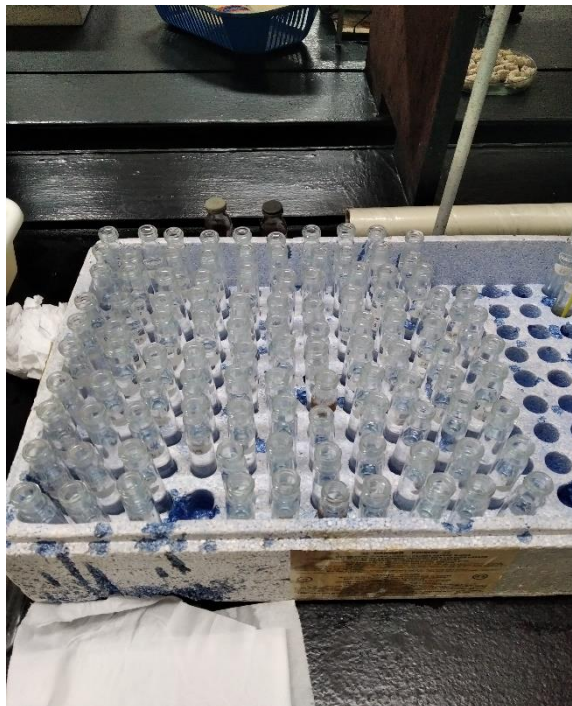
A Figura 33, mostra imagem digital da solução de crescimento, 1 litro de solução reproduzida na estratégia de síntese NINA.

Figura 33: Solução de crescimento antes (esquerda) e depois (direita) da redução com AA



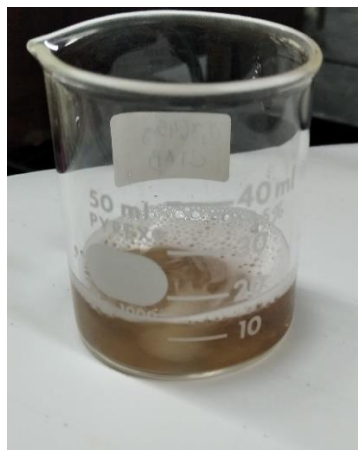
Nesta etapa da síntese, o preparo é similar ao da síntese original, porém a quantidade de reagentes é proporcional ao volume da solução desejada. Em seguida, a solução de crescimento, cujo volume é aproximadamente 1 litro, é fracionada em 100 tubos contendo aproximadamente 10 ml cada, Figura 34.

Figura 34: Fracionamento da solução de crescimento



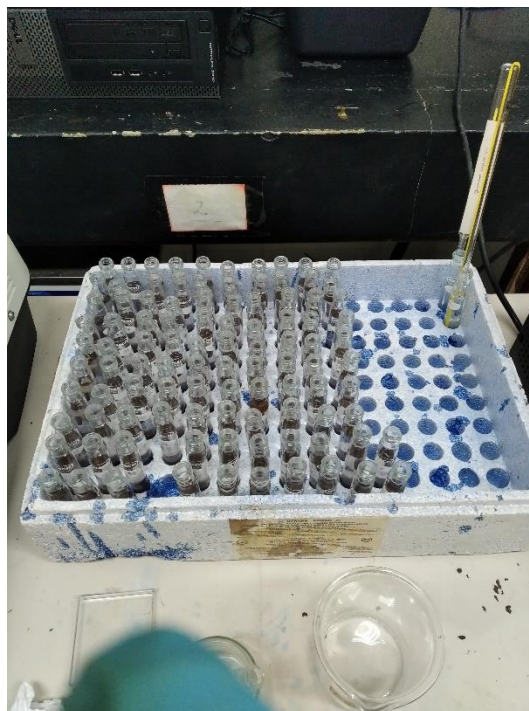
Em cada tubo, contendo uma fração do sistema, o processo de quebra de simetria pode ocorrer de forma satisfatória, levando à produção dos Au-NBs. Uma proposta, em substituição ao sistema da Figura 34, poderia ser a produção de um reator, com recipientes cilíndricos (poças) com capacidade para 10 mililitros. O número destes recipientes (poças) seria tanto quanto fosse necessário para a produção do volume desejado.

Figura 35: Imagem digital da Solução semente recém preparada.



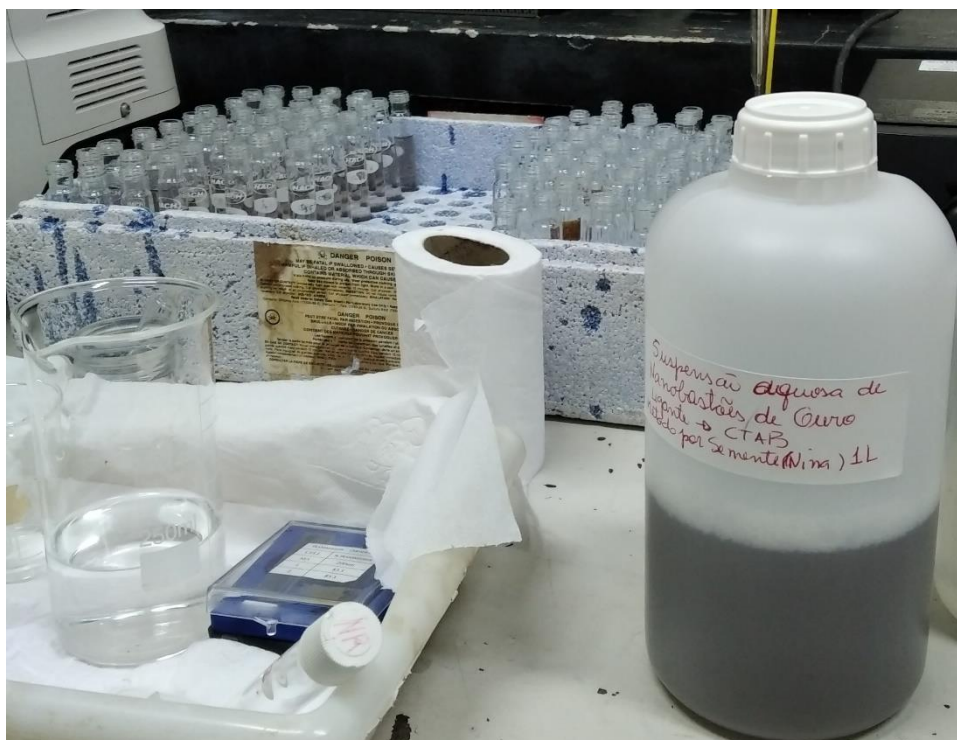
Na Figura 35, é apresentado um béquer contendo sementes de Au. Produzindo 10 mililitros de solução de semente é suficiente para adicionar 12 microlitros da solução em cada fração. Para cem frações, ou 1L de síntese, pode-se usar apenas 1,2 mililitros da solução semente. O preparo desta solução, conforme item 2.2, foi adaptado adicionando-se a etapa de redução ($\text{Au(III)} \rightarrow \text{Au(I)}$) com ácido ascórbico, seguido da redução com borohidreto de sódio ($\text{Au(I)} \rightarrow \text{Au(0)}$), cujo objetivo é tornar as sementes mais homogêneas para que, nas etapas seguintes, fossem obtidos nanobastões menos polidispersos. (GONZÁLEZ-RUBIO *et al* (2019). A síntese da semente na estratégia de síntese NINA, ocorre após a síntese da solução de crescimento, porque o fracionamento desta com adição da semente demanda um certo tempo. Além disso, como o envelhecimento da solução semente deve ser controlado, (GONZÁLEZ-RUBIO *et al*, 2019, NIKOOBAKHT e EL-SAYED, 2003), deve-se seguir esta ordem das etapas a fim de exercer de forma eficiente o controle do tempo de envelhecimento da semente.

Figura 36: Fotografia dos 100 tubos de ensaio contendo solução de crescimento após adição da solução semente (frações da síntese NINA).



Na Figura 36, em cada um dos 100 tubos contendo as frações da solução de crescimento, foram adicionados 12 microlitros da solução semente. Reservou-se os sistemas estáticos, protegidos apenas com um filme de polietileno, que foi delicadamente colocado sobre os tubos, para o processo de quebra de simetria ocorrer de forma adequada e, no dia seguinte, um percentual das frações foi monitorado por medidas de UV-Vis.

Figura 37: Processo de junção das frações após medidas de UV-Vis



Um percentual de 70% das frações da síntese NINA, para o volume de 1L foram analisados via espectrofotometria de UV-Vis. Após as análises individuais de UV-Vis, as porções foram agrupadas e homogeneizadas em um frasco plástico e foi realizada uma análise de UV-Vis da amostra composta de todas as frações.

As Figuras 33 a 37 representam as 5 etapas da estratégia de síntese NINA para 1L, no entanto, os primeiros testes desta síntese foram preparados para o volume de 100 mL, no fim dos experimentos, foi reproduzida para 1L (mostrado nas figuras). Os dados de UV –Vis obtidos em todos os casos, serão analisados.

5.6.1. Síntese NINA – 10 vezes a síntese clássica

Com a finalidade de avaliar a viabilidade da síntese NINA, foram realizadas análises de espectrofotometria UV-Vis de forma a observar semelhança e coerência nos perfis espectrais das diferentes amostras, avaliando se há reprodutibilidade entre as frações desta rota de síntese e, portanto, se esta estratégia de síntese é viável. Como mencionado anteriormente, a técnica de UV-Vis é um meio rápido e simples para verificar o sucesso na formação de nanobastões de ouro. Foi partido do pressuposto de que a síntese gerou produtos semelhantes se o espectro UV-vis coincidir para diferentes amostras. Além disto, foi analisado, comparativamente, àqueles Au-NBs preparados através da síntese clássica de NIKOOBAKHT e EL-SAYED (2003), cujas replicatas foram sintetizadas paralelamente, com as amostras de Au-NBs produzidas via estratégia de síntese NINA.

Com o propósito de avaliar a homogeneidade entre as diversas frações de Au-NBs NINA, na etapa iv, obteve-se o perfil espectral, UV-Vis, e foi feita a superposição dos espectros das diversas frações. A análise da semelhança baseou-se:

- na posição do sinal longitudinal, referente ao eixo “x”, comprimento de onda, obtido via software “Origin”;
- no fwhm, *full width at half maximum* (largura total na metade da altura), obtido via software “origin”;
- na intensidade dos sinais, via observação dos gráficos.

A análise também contempla a comparação dos dados dos Au-NBs da síntese NINA com os Au-NBs da síntese clássica produzidos paralelamente, isto é, em replicatas, cuja superposição dos espectros das replicatas foi obtido, para permitir analisar a semelhança destes comparativamente aos da síntese NINA.

Na Figura 38, são apresentados os dados de absorbância das amostras diferentes (frações) obtidas via síntese NINA, podemos observar os espectros das frações sobrepostas, da primeira síntese NINA-1 e da Figura 39, segunda síntese NINA-2.

Observa-se excelente semelhança para os sinais transversais, aproximadamente 510-520 nm e ótima coerência entre os sinais longitudinais no que diz respeito a máximo do sinal RPLS (Ressonância de plasmons localizado de superfície) em aproximadamente 780-840nm. Nota-se, também, semelhança entre a intensidade dos sinais das diferentes curvas, tanto na Figura 38, quanto na Figura 39.

Figura 38: Espectros de UV-Vis das frações de Au-NBs da síntese de NINA-1

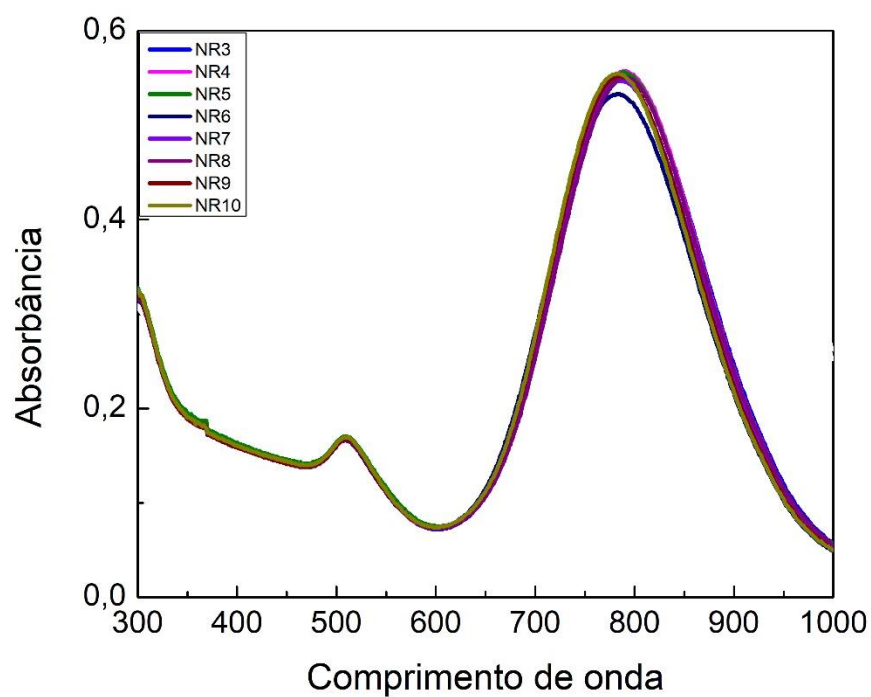
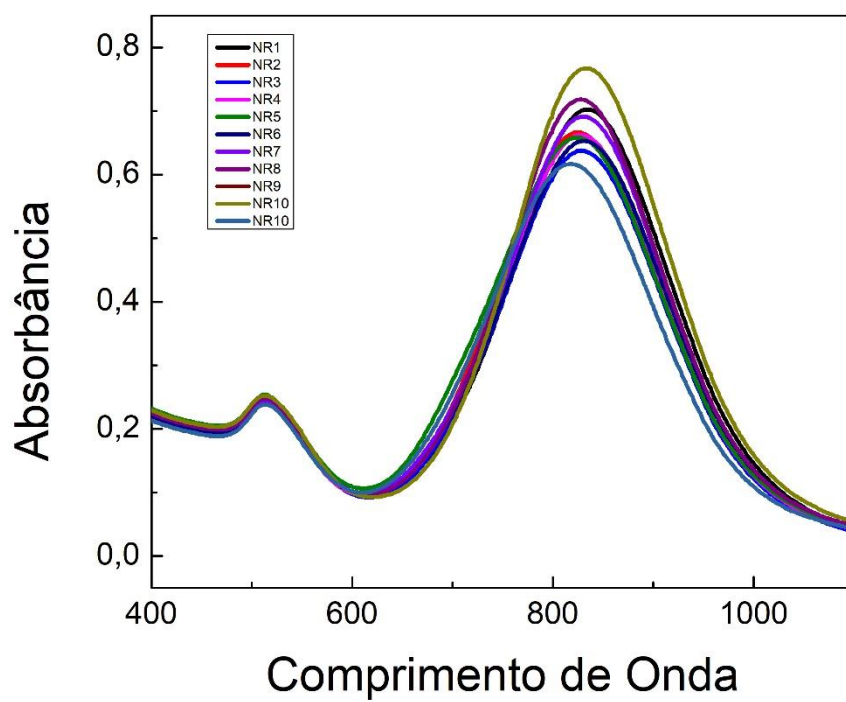


Figura 39: Espectros de UV-Vis das porções de Au-NBs da síntese NINA-2.

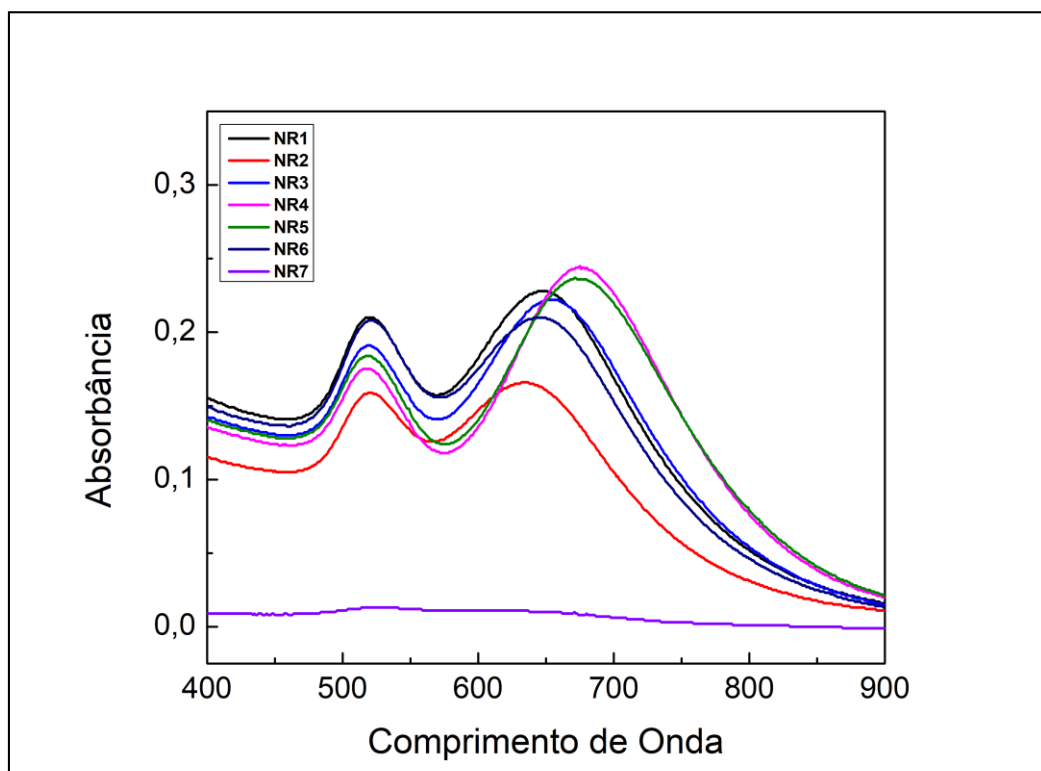


Quando se compara a semelhança entre os espectros da síntese NINA-1 e NINA-2, Figuras 38 e 39, com os espectros da Figura 40, da síntese original, pode-se notar que, na Figura 40, entre os espectros das replicatas, há pouca semelhança. Apesar de reconhecermos que o perfil espectral é similar, há significativa diferença no máximo do sinal longitudinal, que será chamado a partir daqui de máximo do sinal RPLS. Há significativa diferença, também, nas intensidades das bandas das diferentes curvas na Figura 40. Inclusive uma das replicatas, NR7, Figura 40, não apresenta perfil espectral característico de nanobastões, o que é observado na reprodução da síntese original, na qual, algumas vezes não são formados nanobastões de ouro.

Estas variações observadas entre as replicatas da síntese original, certamente são explicadas por um dos fatores citados anteriormente, indicados por Burrows e colaboradores (2017), que justificam a baixa reprodutibilidade da síntese.

As frações NR1 e NR2 da síntese NINA-1, Figura 38, não aparecem, pois, houve erro na normalização, branco, destes espectros, corrigidos para os demais (NR3-NR10), porém não foi possível repetir as medidas para estas duas frações. Desta maneira, decidiu-se por retirar as curvas nesta análise.

Figura 40: Espectros de UV-Vis de sínteses de Au-NBs realizadas paralelamente a partir da síntese original Nikoobakht e El-Sayed (2003)



Para melhor entender o comparativo feito anteriormente entre os espectros de UV-Vis das sínteses NINA e das replicatas da síntese original, foram produzidas Tabelas contendo os dados retirados dos espectros, tais como os dados do máximo do sinal longitudinal (máximo do sinal RPLS) e o fwhm.

Pode-se observar, nas Tabelas 4 e 5, que os valores do máximo do sinal RPLS são próximos dentro do conjunto de suas respectivas frações. O mesmo é observado para os sinais de fwhm, quando se compara com os dados das replicatas da síntese clássica, Tabela 6, observamos que esta última tem maior variação principalmente do máximo do RPLS da banda longitudinal.

Tabela 4: Máximo do RPLS e fwhm das frações da síntese NINA-1

Frações	Máximo do RPLS	fwhm aproximado
NR3	796	173,7
NR4	795	170,9
NR5	795	170,6
NR6	789	171,9
NR7	792	170,9
NR8	796	164,8
NR9	791	164,9
NR10	789	163,3

Tabela 5: Máximo do RPLS e o fwhm das Frações da síntese NINA-2

Frações	Máximo do RPLS	fwhm aproximado
NR1	836	186,5
NR2	826	189,4
NR3	829	188,1
NR4	829	185,8
NR5	822	198,8
NR6	832	189,6
NR7	831	187,9
NR8	830	182
NR9	837	180,3
NR10	837	179,3

Tabela 6: Máximo do RPLS e o fwhm do UV-Vis das replicatas da síntese original

Frações	Máximo do RPLS	fwhm aproximado
NR1	644	175,9
NR2	630	174,7
NR3	650	181,8
NR4	677	163,4
NR5	676	167,6
NR6	640	175,8
NR7	(*)	(*)

(*) Não há banda longitudinal (RPLS)

Para melhor avaliar os dados tabelados, foram calculados o desvio padrão (σ) do máximo do pico longitudinal, o RPLS, e do fwhm de todas as três sínteses, que podem ser observados na Tabela 7. Obteve-se para o máximo do sinal longitudinal das sínteses NINA os desvios padrão no valor de $\sigma=3,63$ e $\sigma=4,85$. Quando comparamos estes desvios com àquele das replicatas da síntese clássica, que é $\sigma=19,46$, pode-se concluir que há maior dispersão nos dados entre as replicatas da síntese original, portanto sugere que as frações das sínteses NINA possuem maior repetitividade, contribuindo para apoiar a proposta da viabilidade desta síntese, no que tange ao objetivo central, que é a uniformidade dos Au-NBs produzidos nesta quantidade.

Outros dados calculados, observados na tabela 7 são os desvios padrão (σ) do fwhm, nas sínteses NINA, foram $\sigma=3,69$ e $\sigma=5,62$. Comparando com o desvio padrão das replicatas da síntese clássica ($\sigma=6,60$), que é um pouco superior, indicando maior dispersão e, portanto, menor reprodutibilidade desta comparado com as sínteses NINA, tabela 7.

Tabela 7: Desvio padrão do RPLS e fwhm das frações das sínteses NINA e original.

Sínteses	DESVIO PADRÃO DO MAX.RPLS	DESVIO PADRÃO DO FWHM
NINA-1	3,63	3,69
NINA-2	4,85	5,62
Replicatas da síntese original*	19,46	6,60

(*) A síntese original refere-se ao trabalho de Nikoobakht e El-Sayed (2003)

Pode-se associar a boa repetitividade das frações da síntese NINA ao fato de que toda a preparação da solução de crescimento é idêntica para todas as frações, uma vez que são frações oriundas da mesma solução. Inclusive os

recipientes em que estão contidas as frações têm mesma forma (tubos) e isto minimiza ou exclui fatores que contribuem com a baixa reprodutibilidade da síntese, citados anteriormente. Propõem-se que alguns destes fatores, que influenciam na baixa reprodutibilidade da síntese, que se excluíu nesta estratégia NINA comparada às várias reproduções da síntese original, são pequenas variações nas quantidades de ácido ascórbico adicionado e sua concentração, pequenas diferenças entre o tempo de adição do ácido ascórbico na solução de crescimento e a adição da solução semente na solução de crescimento.

Na etapa v da síntese NINA, podemos observar o espectro referente à reunião de “parte das frações” (amostra composta) nas figuras a seguir. Após isto, foi feita centrifugação e lavagem do nanomaterial. Podemos comparar os valores de fwhm, da amostra composta, Figuras 41 e 42, com a média calculada das frações. Comparando os valores de fwhm, tabela 8, síntese NINA-1, média das frações 168,57 e da amostra composta 173,3, bem como síntese NINA-2, cujo fwhm médio foi 186,8 e da amostra composta foi 182,2. A partir destes dados podemos observar que não houve grande variação comparativa no FWHM. Vale destacar que, quanto maior os valores de fwhm, ou seja, mais larga a banda, representa maior polidispersividade do material em questão. Portanto, não houve significativa mudança na polidispersividade da amostra, comparando as frações (etapa vi) com a amostra composta (etapa v).

Figura 41: Espectro da Síntese NINA-1 após junção parcial das frações, centrifugação, lavagem com CTAB 1mM e re-suspensão em CTAB 1mM para realizar a medida

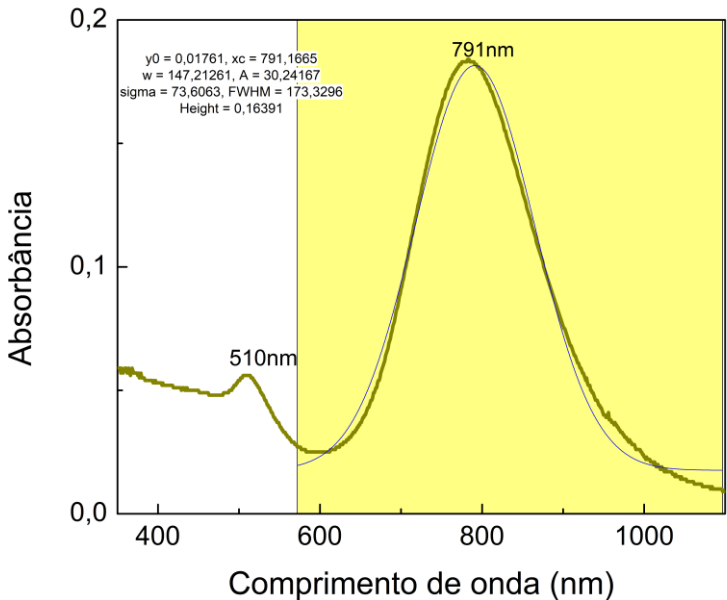
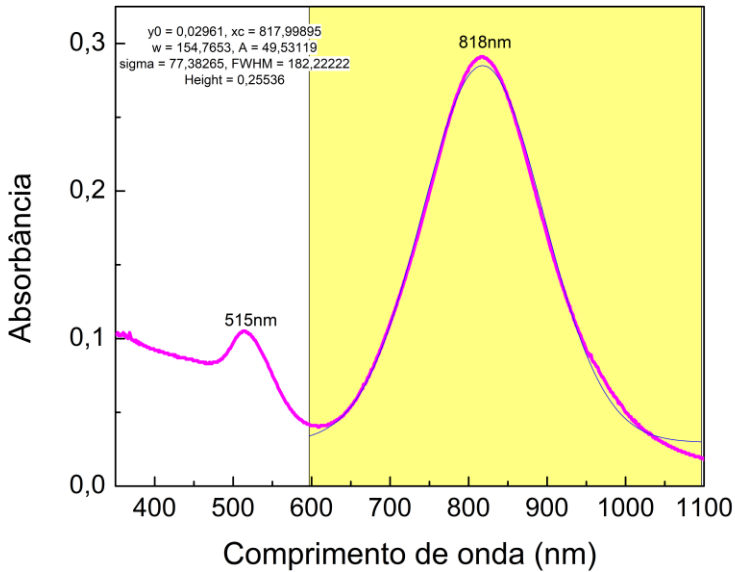


Figura 42: Espectro da Síntese NINA- 2 após junção parcial das frações, centrifugação, lavagem com CTAB 1mM e re-suspensão em CTAB 1mM para realizar a medida.



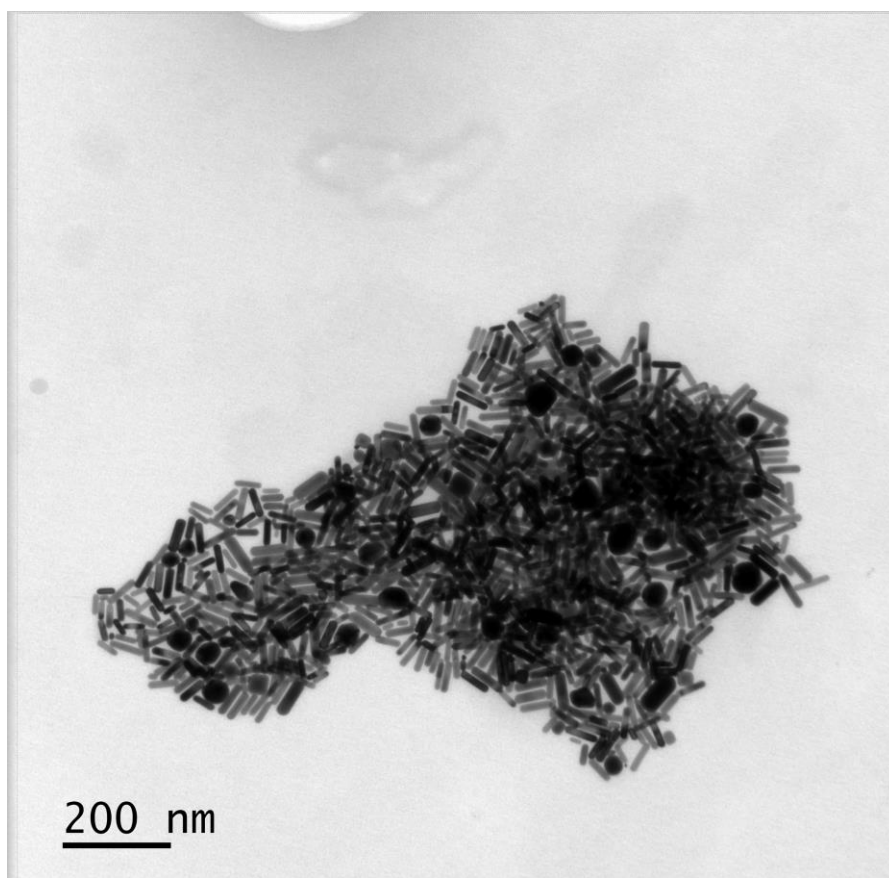
Os espectros da amostra composta das sínteses NINA1 e NINA2 nos permitem estimar a razão de aspecto dos nanobastões produzidos nestas sínteses. (LINK, MOHAMED, EL SAYED, 1999; YAN, YANG, WANG, 2003; LINK, EL SAYED 2005). A síntese NINA1 prouziu Au-NBs com razão de aspecto médio 3,9. A síntese NINA2 produziu Au-NBs com razão de aspecto médio 4,2.

Tabela 8: Média do fwhm das frações comparado ao fwhm da composta das sínteses NINA.

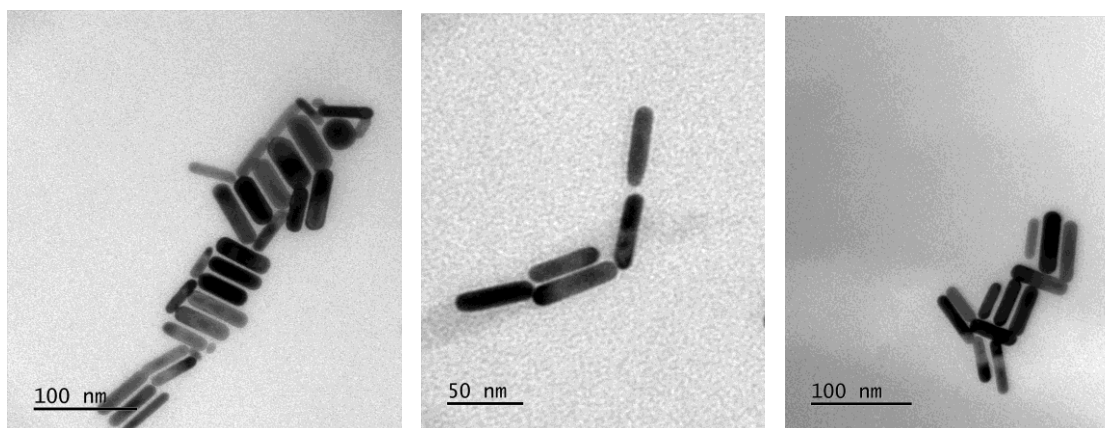
Sínteses	Média do fwhm das frações	fwhm da composta
NINA-1	168,57	173,3
NINA-2	186,8	182,2

Para ratificar a presença dos nanobastões de ouro nos materiais preparados na síntese NINA, são apresentados, a seguir, imagens de microscopia eletrônica de transmissão TEM da composta NINA-2, Figura 43.

Figura 43: Micrografia da amostra composta das frações síntese NINA



Continuação da Figura



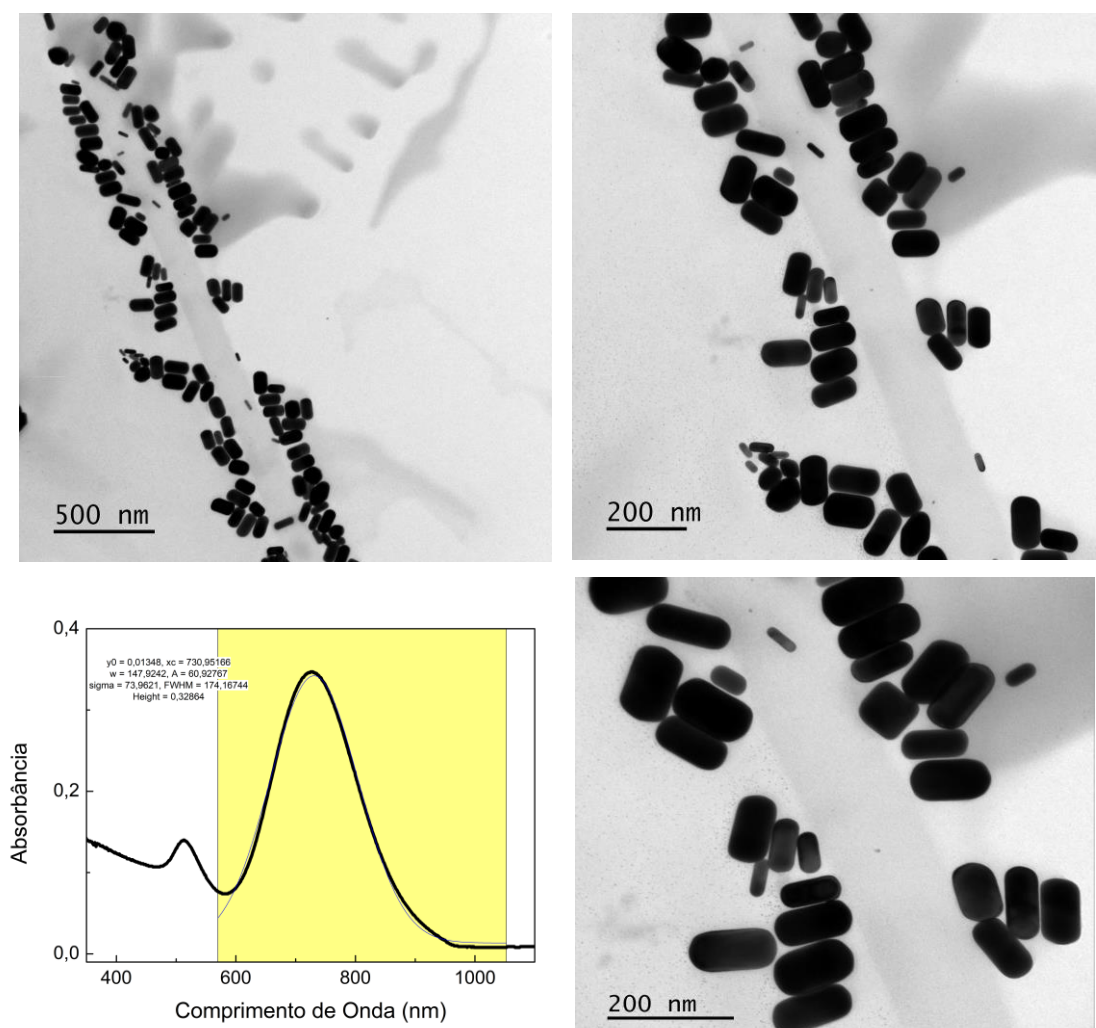
Com base no que foi discutido, inferimos que a síntese NINA provê uma rota para a produção de Au-NBs via síntese mediada por semente assistida por prata, em larga escala, com elevado grau de simplicidade para a produção de nanobastões com baixa polidispersividade.

É importante ressaltar que, por razões experimentais, parte das sínteses, que foram realizadas, apresentaram baixo rendimento, ainda observou-se que, em sínteses de baixo rendimento, ao longo do tempo, os nanobastões que tinham sido produzidos se transformavam, uma vez que ainda existia muito reagente no meio reacional. Como medida preventiva as sínteses de baixo rendimento, devem ser guardadas na geladeira, com a finalidade de desfavorecer cineticamente as reações paralelas e com maior brevidade possível, realizar a centrifugação, retirada do líquido sobrenadante e lavagem do material com CTAB 1mM. A finalidade é retirar as espécies reagentes que ainda estavam presentes no meio reacional. A esse sobrenadante propõe-se, como perspectivas futuras, a possibilidade de semeá-los novamente e tentar crescer mais Au-NBs.

5.6.2. Síntese NINA – 100 vezes a síntese clássica

A síntese NINA foi reproduzida para quantidade 100 vezes maior que a síntese clássica, do Nikoobakht e El-Sayed (2003), a fim de avaliar se o aumento da escala influencia na qualidade da amostra composta, isto é, se aumenta a dispersividade deste Au-NBs, comparado àquelas replicatas da síntese clássica e a NINA para 100 ml. A análise da síntese NINA para quantidade 100 vezes maior, à luz dos espectros UV-Vis, é similar àquela análise feita no item 5.6.1, porém mais resumida. Para avaliação criteriosa e adequada desta síntese, apresentaremos a caracterização dos dados de UV-Vis das frações tabeladas e o gráfico apenas da composta. Mostraremos, também, a microscopia eletrônica de transmissão, TEM, da amostra composta para ratificar a presença dos nanobastões de ouro da composição do material em estudo.

Figura 44: Micrografias em diferentes magnificações e espectro UV- Vis da amostra composta



Pode-se observar, na Figura 44, o perfil de bastonetes das nanopartículas, indicando a presença dos nanobastões de ouro, cuja razão de aspecto é 3,3, calculada a partir do espectro de UV-Vis da amostra composta, cujo máximo do sinal longitudinal é 731 nm. O perfil espectral é coerente com o da síntese original de NIKOOBAKHT e EL-SAYED (2003), reiterando a presença dos Au-NBs no material preparado. A tabela 9 contribui para apresentar similaridade dos máximos do sinal longitudinal das várias frações, o mesmo se observa para os valores de largura a meia altura fwhm.

Para uma avaliação mais adequada, obteve-se a média dos máximos do sinal longitudinal das frações tabela 9, e obteve-se o valor de 729,9nm, bastante próximo ao valor obtido por meio do espectro de UV-Vis da composta das frações, 730,9nm, indicando que a junção das frações não produz alterações significativas no perfil dos nanobastões, levando-nos a concluir que esta etapa da síntese não produz perturbações no sistema da suspensão dos Au-NBs, sendo, assim, adequada a manutenção da qualidade dos nanobastões obtidos.

Tabela 9: Máximo do sinal longitudinal e fwhm dos espectro UV-Vis das frações síntese NINA

Frações	Máximo do RPLS	fwhm	Frações	Máximo do RPLS	fwhm
1	745	160,1	36	745	162
2	737	179,5	37	745	161,9
3	728	169,4	38	728	179,2
4	743	163	39	733	170,8
5	747	160,5	40	722	176,8
6	738	168,3	41	721	176,6
7	742	163,6	42	729	167,8
8	748	167,7	43	719	180,2
9	731	169,5	44	723	186,6
10	720	176,4	45	714	181,8
11	728	170,2	46	724	182,5
12	732	178,6	47	725	172,3
13	729	173,9	48	729	170,1
14	722	176,5	49	720	180,1
15	733	174,7	50	732	165
16	734	179,9	51	724	178,6
17	741	169,2	52	729	169
18	718	175,4	53	732	170,6
19	726	167,7	54	732,6	178,2
20	729	179,88	55	713	181,1
21	726	172,2	56	721	183,7
22	729	168,5	57	719	173,9
23	717	185,7	58	732	175
24	718	175,4	59	720	178,9
25	741	169,2	60	723	173,2
26	748	162	61	733	173,6
27	747	162,6	62	736	178,6
28	744	163,5	63	732	181,2
29	709	174,6	64	738,4	163,9
30	725	169,13	65	723	182,8
31	718	170,3	66	735	173,2
32	732	166	67	721	178,8
33	740	163,1	68	734	166,2
34	722	173,6	69	727	177,7
35	728	178	70	743	162,2

O desvio padrão, Tabela 10, do máximo do sinal longitudinal foi $\sigma=9,4$, que é baixo, quando comparado com as replicatas da síntese original $\sigma=19,46$, Tabela 7, indicando que a homogeneidade das frações na síntese NINA é significativa para a quantidade de 100 vezes a síntese clássica e, portanto, essa estratégia é viável para obtenção de Au-NBs em larga escala.

Tabela 10: Média e desvio padrão do sinal longitudinal e fwhm das frações da síntese NINA para quantidade de 100 vezes a síntese clássica.

	Máximos do RPLS	Fwhm
Média	729,9	172,7
Desvio Padrão	9,4	6,8

CAPÍTULO 6

6. Considerações Finais

O presente trabalho de doutorado propôs uma estratégia de síntese simples, que viabilizou a produção em larga escala de nanobastões de ouro, de alta qualidade. Essa metodologia foi baseada na síntese mediada por semente assistida por prata, cuja finalidade foi a obtenção de quantidade suficiente de material adequado para realização de caracterizações e futuras aplicações. A síntese foi realizada na quantidade de 10 vezes e 100 vezes a síntese original, confirmando a produção dos Au-NBs por medidas de MET. As frações da síntese NINA foram submetidas a medidas dos espectros UV-Vis e comparadas com a série de replicatas da síntese original. Observou-se que as variações do máximo do pico longitudinal e fwhm foram menores entre as frações da síntese NINA, comparadas às replicatas da síntese original. Com base nestes dados, observou-se que a síntese a NINA produz grande quantidade de solução de Au-NBs de qualidade. Portanto, a síntese NINA provê uma estratégia para a produção em larga escala de Au-NBs via síntese mediada por semente assistida por prata, reproduzindo as condições da síntese original e o que ela se propõe em termos de rendimento, baixa polidispersividade e faz isto com alto grau de simplicidade para a produção de nanobastões.

Este trabalho também se propôs analisar via espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) o ambiente químico dos nanobastões de ouro produzidos via síntese mediada por semente assistido por íons prata com a finalidade de contribuir com o entendimento dos mecanismos que envolvem a formação dos Au-NBs. E, a partir dos dados de XPS, foram observados dois estados químicos para Ag e pôde-se concluir que houve formação de Ag(0) pelo mecanismo de

sobrepotencial UPD na síntese dos Au-NBs, sucedendo o procedimento de lavagem, pós síntese, que levou a um processo de oxidação parcial da camada superficial de prata, gerando a presença de duas espécies Ag(0) e Ag(I) na superfície do nanobastão de ouro.

Como perspectivas tem-se:

A síntese NINA oferece uma estratégia universal para a reproduzir, em larga escala, grande parte das sínteses mediada por semente e assistida por Ag⁺ aprimorada por diversos grupos de pesquisa presente na literatura dos nanobastões de ouro.

A projeção inicial da síntese NINA prevê, no formato apresentado nesta tese, a possibilidade de produzir 8 litros de síntese. Porém, com mais alguns testes pode-se obter volumes maiores. Há, inclusive, a possibilidade de desenvolver reator adequado ao formato desta síntese NINA e produzir Au-NBs de forma mecanizada.

O estudo do ambiente químico dos nanobastões de ouro pós síntese, funcionalizados com diversas interfaces, proporciona o avanço no entendimento da atuação dos Au-NBs em suas variadas funcionalidades. O XPS é valioso para este estudo e pode-se extrapolar para o estudo de diversas nanoestruturas.

Referências

ANDERSON, Will et al. A comparative study of submicron particle sizing platforms: accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. **Journal of colloid and interface science**, v. 405, p. 322-330, 2013.

BARROS, Haroldo, L. C.; Química inorgânica: Uma introdução. Belo Horizonte. 1992.

BASOLO, F.; JOHNSON, R.C. Química de los compuestos de coordinación. Reverté S.A. Barcelona, 1976. p.147 e p.163.

BOHU, Tsing et al. Evidence for fungi and gold redox interaction under Earth surface conditions. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2019.

BURROWS, Nathan D. et al. Understanding the seed-mediated growth of gold nanorods through a fractional factorial design of experiments. **Langmuir**, v. 33, n. 8, p. 1891-1907, 2017.

BAI, Lihua et al. Synergic effect of graphene and core– shells structured Au NR@ SiO₂@ TiO₂ in dye-sensitized solar cells. **Nanotechnology**, v. 30, n. 46, p. 465401, 2019.

BIGALL, Nadja C. et al. Fungal templates for noble-metal nanoparticles and their application in catalysis. **Angewandte Chemie**, v. 120, n. 41, p. 7994-7997, 2008.

BOUFI, Sami et al. In situ photochemical generation of silver and gold nanoparticles on chitosan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 151-158, 2013.

BROWN, Micah; WILEY, Benjamin J. Bromide Causes Facet-Selective Atomic Addition in Gold Nanorod Syntheses. **Chemistry of Materials**, v. 32, n. 15, p. 6410-6415, 2020.

CEPAK, Veronica M.; MARTIN, Charles R. Preparation and stability of template-synthesized metal nanorod sols in organic solvents. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 49, p. 9985-9990, 1998.

CHANG, Shuai et al. Enhancement of low energy sunlight harvesting in dye-sensitized solar cells using plasmonic gold nanorods. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 11, p. 9444-9448, 2012.

CHEN, Wei-Hai et al. Overcoming the heat endurance of tumor cells by interfering with the anaerobic glycolysis metabolism for improved photothermal therapy. **ACS nano**, v. 11, n. 2, p. 1419-1431, 2017.

CHOI, Jongseon; KIM, So Yeon. Photothermally enhanced photodynamic therapy based on glutathione-responsive pheophorbide a-conjugated gold nanorod formulations for cancer theranostic applications. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2020.

DREADEN, Erik C. et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2740-2779, 2012.

DEL CAÑO, Rafael et al. Effective replacement of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) by mercaptoalkanoic acids on gold nanorod (AuNR) surfaces in aqueous solutions. **Nanoscale**, v. 12, n. 2, p. 658-668, 2020.

DICKERSON, E. B. et al. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer Letters*, v. 269, n. 1, p. 57–66, 2008.

DING, Qianqian et al. Quantitative and sensitive SERS platform with analyte enrichment and filtration function. **Nano Letters**, v. 20, n. 10, p. 7304-7312, 2020.

DURR, N. J. et al. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Letters*, v. 7, n. 4, p. 941–945, 2007.

EDGAR, Jonathan A.; MCDONAGH, Andrew M.; CORTIE, Michael B. Formation of gold nanorods by a stochastic “popcorn” mechanism. **ACS nano**, v. 6, n. 2, p. 1116-1125, 2012.

FAKHRULLIN, Rawil F. et al. Cyborg cells: functionalisation of living cells with polymers and nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 11, p. 4189-4206, 2012.

FONTES, Adriana M. et al. Unveiling the Surface and the Ultrastructure of Palladized Fungal Biotemplates. **Langmuir**, v. 37, n. 44, p. 12961-12971, 2021.

FORNARO, Adalgiza; COICHEV, Nina. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. **Química Nova**, v. 21, p. 642-650, 1998.

FOSS JR, Colby A. et al. Template-synthesized nanoscopic gold particles: optical spectra and the effects of particle size and shape. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 11, p. 2963-2971, 1994.

FOSS JR, Colby A.; TIERNEY, Michael J.; MARTIN, Charles R. *Template synthesis of infrared-transparent metal microcylinders: comparison of optical properties with the predictions of effective medium theory.* **The Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 22, p. 9001-9007, 1992.

FOSS JR, Colby A. et al. Optical properties of composite membranes containing arrays of nanoscopic gold cylinders. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 19, p. 7497-7499, 1992.

FUGGLE, John C.; MÅRTENSSON, Nils. Core-level binding energies in metals. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 21, n. 3, p. 275-281, 1980.

GARG, Niti et al. The role of bromide ions in seeding growth of Au nanorods. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 10271-10276, 2010.

GONZÁLEZ-RUBIO, Guillermo; Kumar, Vished; Llombart, Pablo, Díaz-Núñez, Pablo; Bladt, Eva, Altantzis, Thomas , Bals, Sara; Peña-Rodríguez, Ovidio, Noya, Eva G., MacDowell, Luis G, Guerrero-Martínez ,Andrés, Liz-Marzán, Luis M. Disconnecting symmetry breaking from seeded growth for the reproducible synthesis of high quality gold nanorods. **ACS nano**, v. 13, n. 4, p. 4424-4435, 2019.

GUO, Ruya et al. A colorimetric immunosensor for determination of foodborne bacteria using rotating immunomagnetic separation, gold nanorod indication, and click chemistry amplification. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 4, p. 1-9, 2020.

GRZELCZAK, Marek et al. Shape Control in Gold Nanoparticle Synthesis. In: **Colloidal Synthesis of Plasmonic Nanometals**. Jenny Stanford Publishing, 2020. p. 197-220.

HINMAN, Joshua G. et al. Seed mediated growth of gold nanorods: towards nanorod matryoshkas. **Faraday Discussions**, v. 191, p. 9-33, 2016.

HUANG, Junfeng et al. Metal organic framework-coated gold nanorod as an on-demand drug delivery platform for chemo-photothermal cancer therapy. **Journal of nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2021.

JAIN, Prashant K. et al. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. **Accounts of chemical research**, v. 41, n. 12, p. 1578-1586, 2008.

JANA, Nikhil R. Nanorod shape separation using surfactant assisted self-assembly. **Chemical Communications**, n. 15, p. 1950-1951, 2003.

JANA, Nikhil R. Gram-scale synthesis of soluble, near-monodisperse gold nanorods and other anisotropic nanoparticles. **Small**, v. 1, n. 8-9, p. 875-882, 2005.

JANA, Nikhil R.; GEARHEART, Latha; MURPHY, Catherine J. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. **Chemistry of materials**, v. 13, n. 7, p. 2313-2322, 2001-a.

JANA, Nikhil R.; GEARHEART, Latha; MURPHY, Catherine J. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 19, p. 4065-4067, 2001-b.

JANA, Nikhil R.; GEARHEART, Latha; MURPHY, Catherine J. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant *template*. **Advanced Materials**, v. 13, n. 18, p. 1389-1393, 2001-c.

JASMIN, Jean-Philippe et al. XPS and NRA investigations during the fabrication of gold nanostructured functionalized screen-printed sensors for the detection of metallic pollutants. **Applied Surface Science**, v. 397, p. 159-166, 2017.

JOHNSON, Christopher J. et al. Growth and form of gold nanorods prepared by seed-mediated, surfactant-directed synthesis. **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 1765-1770, 2002.

JOKERST, Jesse V. et al. Gold nanorods for ovarian cancer detection with photoacoustic imaging and resection guidance via Raman imaging in living mice. **ACS nano**, v. 6, n. 11, p. 10366-10377, 2012.

LI, Yanping et al. Improved performance for polymer solar cells using CTAB-modified MoO₃ as an anode buffer layer. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 171, p. 72-84, 2017.

LIU, Xian-Hao et al. A novel cetyltrimethyl ammonium silver bromide complex and silver bromide nanoparticles obtained by the surfactant counterion. **Journal of colloid and interface science**, v. 307, n. 1, p. 94-100, 2007.

Liu MZ, Guyot-Sionnest P. Mechanism of silver(I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids. *J Phys Chem B* 2005;109(47):22192e200

LOHSE, Samuel E.; MURPHY, Catherine J. The quest for shape control: a history of gold nanorod synthesis. **Chemistry of Materials**, v. 25, n. 8, p. 1250-1261, 2013.

KIM, Franklin; SONG, Jae Hee; YANG, Peidong. Photochemical synthesis of gold nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 48, p. 14316-14317, 2002.

KRAHNE, R; Manna, L.; MORELLO, G.; FIGUEROLA, A.; GEORGE, C.; DEKA, S. **Physical Properties of Nanorods**. E-book. Spring. 2013.

KUMAR, Rahul et al. Determination of the Aspect-ratio Distribution of Gold Nanorods in a Colloidal Solution using UV-visible absorption spectroscopy. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

LEONTIDIS, Epameinondas et al. Gold colloids from cationic surfactant solutions. 1. Mechanisms that control particle morphology. **Langmuir**, v. 18, n. 9, p. 3659-3668, 2002.

LIOPO, Anton et al. Seedless synthesis of gold nanorods using dopamine as a reducing agent. **RSC advances**, v. 5, n. 111, p. 91587-91593, 2015.

HAMAD, B. et al. Transesterification of rapeseed oil with ethanol over heterogeneous heteropolyacids. **Catalysis Communications**, v. 10, n. 1, p. 92-97, 2008.

HOSTETLER, Michael J. et al. Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size. **Langmuir**, v. 14, n. 1, p. 17-30, 1998.

*HUBERT, Fabien; TESTARD, Fabienne; SPALLA, Olivier. Cetyltrimethylammonium bromide silver bromide complex as the capping agent of gold nanorods. **Langmuir**, v. 24, n. 17, p. 9219-9222, 2008.

HU, Yingwen; CRIST, Rachael M.; CLOGSTON, Jeffrey D. The utility of asymmetric flow field-flow fractionation for preclinical characterization of nanomedicines. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 412, n. 2, p. 425-438, 2020.

MEYER, Sean M.; MURPHY, Catherine J. Anisotropic silica coating on gold nanorods boosts their potential as SERS sensors. **Nanoscale**, v. 14, n. 13, p. 5214-5226, 2022.

MIRANDA, Oscar R.; DOLLAHON, Norman R.; AHMADI, Temer S. Critical concentrations and role of ascorbic acid (vitamin C) in the crystallization of gold nanorods within hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)/tetraoctyl

ammonium bromide (TOAB) micelles. **Crystal growth & design**, v. 6, n. 12, p. 2747-2753, 2006.

MAYER, Kathryn M. et al. A label-free immunoassay based upon localized surface plasmon resonance of gold nanorods. **ACS nano**, v. 2, n. 4, p. 687-692, 2008.

MURPHY, Catherine J. et al. Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications. 2005.

NIIDOME, Yasuro et al. Characterization of silver ions adsorbed on gold nanorods: surface analysis by using surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Chemical communications**, n. 13, p. 1754-1756, 2009.

NIKOOBAKHT, Babak; EL-SAYED, Mostafa A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 10, p. 1957-1962, 2003.

NIKOOBAKHT, Babak; EL-SAYED, Mostafa A. Evidence for bilayer assembly of cationic surfactants on the surface of gold nanorods. **Langmuir**, v. 17, n. 20, p. 6368-6374, 2001.

OLIVEIRA, Camila; CHAVES, Claudilene R; BARGIELA, Pascal; ROCHA, Maria G. C.; DA DILVA, Antônio F.; CHUCACI, José F. D.; BOSTROM, Mathias; PERSSON, Clas; MALTA, Marcos. Surface studies of the chemical environment

in gold nanorods supported by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and ab initio calculations. **journal of materials research and technology**, v. 15, p. 768-776, 2021.

ORENDORFF, Christopher J.; MURPHY, Catherine J. Quantitation of metal content in the silver-assisted growth of gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 9, p. 3990-3994, 2006.

PETERS, S. et al. Size-dependent XPS spectra of small supported Au-clusters. **Surface Science**, v. 608, p. 129-134, 2013

PARVEEN, Rashida. **Síntese de nanopartículas de ouro com forma e tamanho controlados utilizando glicerol como um agente de redução e estabilização ecológico e de baixo custo**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PÉREZ-JUSTE, Jorge et al. Gold nanorods: synthesis, characterization and applications. **Coordination chemistry reviews**, v. 249, n. 17-18, p. 1870-1901, 2005.

QIU, Liping et al. A cell-targeted, size-photocontrollable, nuclear-uptake nanodrug delivery system for drug-resistant cancer therapy. **Nano letters**, v. 15, n. 1, p. 457-463, 2015.

REQUEJO, Katherinne I.; LIOPO, Anton V.; ZUBAREV, Eugene R. Gold nanorod synthesis with small thiolated molecules. **Langmuir**, v. 36, n. 14, p. 3758-3769, 2020.

SCARABELLI, Leonardo et al. A “tips and tricks” practical guide to the synthesis of gold nanorods. 2015.

SHAH, Monic et al. Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. **Front Biosci**, v. 19, n. 8, p. 1320-1344, 2014.

SOLIMAN, Mahmoud G. et al. Development of amyloid beta gold nanorod aggregates as optoacoustic probes. **PloS one**, v. 17, n. 3, p. e0259608, 2022.

SONG, Sojin et al. Real-time monitoring of distinct binding kinetics of hot-spot mutant p53 protein in human cancer cells using an individual nanorod-based plasmonic biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 322, p. 128584, 2020.

SUBRAMANYAM, Palyam et al. Bismuth sulfide nanocrystals and gold nanorods increase the photovoltaic response of a TiO₂/CdS based cell. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 159, p. 296-306, 2017.

TECHANE, Sirnegeda D.; GAMBLE, Lara J.; CASTNER, David G. X-ray photoelectron spectroscopy characterization of gold nanoparticles functionalized with amine-terminated alkanethiols. **Biointerphases**, v. 6, n. 3, p. 98-104, 2011.

TONG, W.; WALSH, M. J.; MULVANEY, P.; ETHERIDGE, J.; FUNSTON, A. M. Control of Symmetry Breaking Size and Aspect Ratio in Gold Nanorods: Underlying Role of Silver Nitrate. *J. Phys. Chem. C* 2017, 121, 3549–3559.

WATANABE, et al, Fumiya et al. X-ray photoelectron spectroscopy and transmission electron microscopy analysis of silver-coated gold nanorods designed for bionanotechnology applications. **Nanotechnology**, v. 28, n. 2, p. 025704, 2016.

WALSH, M. J.; TONG, W.; KATZ-BOON, H.; MULVANEY, P.; ETHERIDGE, J.; Funston, A. M. A Mechanism for Symmetry Breaking and Shape Control in Single-Crystal Gold Nanorods. *Acc. Chem. Res.* 2017, 50, 2925–2935

VAN DER ZANDE, Bianca MI et al. Aqueous gold sols of rod-shaped particles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, n. 6, p. 852-854, 1997.

XIAO, Yuling et al. Gold nanorods conjugated with doxorubicin and cRGD for combined anticancer drug delivery and PET imaging. **Theranostics**, v. 2, n. 8, p. 757, 2012.

*YANG, Tingting; WANG, Donghui; LIU, Xuanyong. Assembled gold nanorods for the photothermal killing of bacteria. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 833-841, 2019.

YE, Xingchen et al. Using binary surfactant mixtures to simultaneously improve the dimensional tunability and monodispersity in the seeded growth of gold nanorods. **Nano letters**, v. 13, n. 2, p. 765-771, 2013.

YU, Yu-Ying et al. Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, n. 34, p. 6661-6664, 1997.

ZIJLSTRA, Peter *et al.* High-temperature seedless synthesis of gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 39, p. 19315-19318, 2006.

ANEXO A: Artigo sobre as medidas de XPS da superfície dos Au-NBs



Available online at www.sciencedirect.com

jmr&t
Journal of Materials Research and Technology
journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmrt



Original Article

Surface studies of the chemical environment in gold nanorods supported by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and *ab initio* calculations



Camila Oliveira^a, Claudilene Ribeiro Chaves^b, Pascal Bargiela^a,
Maria da Graça Carneiro da Rocha^a, Antonio Ferreira da Silva^{c,d},
José Fernando Diniz Chubaci^c, Mathias Boström^e, Clas Persson^{e,f,**},
Marcos Malta^{a,*}

^a Instituto de Química, Departamento de Físico-Química, Universidade Federal da Bahia, Campus Ondina, Salvador, BA, Brazil

^b Rede Multidisciplinar de Pesquisa, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Patos de Minas, Patos de Minas, MG, Brazil

^c Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Laboratório de Cristais Iônicos, Filmes Finos e Datação, Butantã, São Paulo, SP, Brazil

^d Instituto de Física, Universidade Federal da Bahia, Campus Ondina, Salvador, BA, Brazil

^e Centre for Materials Science and Nanotechnology, Department of Physics, University of Oslo, NO-0316, Oslo, Norway

^f Department of Materials Science and Engineering, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, SE, 100 44, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 May 2021

Accepted 14 August 2021

Available online 21 August 2021

Keywords:

Gold nanorods

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

nanoparticles

Simulation

ab initio

ABSTRACT

In this manuscript, we prepared gold nanorods (Au-NRs) through “silver-assisted seeded methodology” and studied their outermost layer using XPS spectroscopy and *ab initio* calculations to compare the chemical states of the constituents of the metallic core. Supporting first-principles calculations employing a relativistic, full-potential and all-electron method, with augmented plane waves plus local orbitals as a basis set, ensure proper treatment of the core electron states. Three significant findings can be reported. First, we found that besides Au (0), there are two chemical states for silver, namely Ag (0) and Ag(I), on the Au surface. Our results corroborate with recent results reported in the literature, indicating that Ag monolayer can be oxidized to Ag(I) during the steps of centrifugation and washing with diluted CTAB solution. Second, *ab initio* simulations showed that Ag atoms have different binding energies, depending on their configuration in Au-NRs (whether silver atoms are found on the surface or if they are spread in bulk as interstitial or substitutional defects). Third, theoretical studies showed that silver atoms located at

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: clas.persson@fys.uio.no (C. Persson), marcosmalta@ufba.br (M. Malta).

<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.059>

2238-7854/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

interstitial sites could distort the crystalline structure, and, therefore, we do not expect interstitial Ag to occur in Au-NRs.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Noble metal nanostructures have been the subject of significant research in recent years. The interest in these materials is derived from new physicochemical properties achieved at the nanoscale, such as variable optoelectronic properties or maximization of the surface-to-volume ratio [1,2]. Usually, metallic nanoparticles are obtained by treating metal salts with reducing agents in a medium containing capping ligands that bind to the metal surface [3]. The capping ligands are crucial in forming and stabilizing nanoparticles because they prevent disordered growth and avoid agglomeration [4].

Gold nanorods (Au-NRs) are intriguing nanostructures that have attracted much attention due to plasmonic optical properties, which are very sensitive to their aspect ratio (i.e., length/diameter), dispersion, and homogeneity [5,6]. Localized surface plasmon resonance (LSPR) originates from the interaction between an incident electromagnetic radiation with free electrons on the metallic surface [7]. When the wavelength of light is much larger than nanoparticle size, the electromagnetic field of the light induces a collective oscillation of the free electrons relative to the lattice of positive nuclei. As a result, Au-NRs will exhibit intense light absorption and scattering at specific resonant wavelengths, depending on the aspect ratio and dielectric environment [8]. Besides, Au-NRs can release heat to the media through exposure to near-infrared radiation (NIR) [9]. These characteristics make Au-NRs promising for various applications such as bioanalytical essays, biomedical imaging, drug delivery, and photothermal therapy [5]. Single Au-NR can be modeled as an elongated inorganic particle (i.e., distinct length and diameter dimensions) surrounded by a dense layer of organic molecules, generally cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). It is essential to notice that while the inorganic particle is found in the nanoscale, with behavior and properties inherent to this size regime, the organic ligand affects the particle itself [10]. For instance, studies have shown that CTAB exerts toxic effects on the cells. Thus, it makes necessary to replace CTAB with another biocompatible shell such as thiolated polyethylene glycol (PEG-SH) before *in vivo* applications of Au-NRs [11,12].

Currently, the “silver-assisted seeded methodology” is the most popular route to obtain Au-NRs in considerably high yields. The synthesis is divided into two steps: firstly, CTAB capping Au seeds with an average diameter of 2.0 nm are prepared through reduction with sodium borohydride. In the second step, the Au seeds are added to a growth solution containing HAuCl_4 , CTAB, AgNO_3 , and a mild reducing agent such as ascorbic acid. The final morphology concerning dimensions and aspect ratio can be regulated by varying the concentration of silver nitrate [13,14].

Despite considerable advances in understanding the processes of synthesis and formation of Au-NRs, the constitution of the metallic core is still a point of scientific controversy [15,16]. For example, in single-crystal rods obtained by “seed methodology”, there is still a debate regarding the role of Ag in the composition and structure of the metallic core. Two hypotheses describe the role of Ag depending on the oxidation state of deposited silver, whether $\text{Ag}(0)$ or $\text{Ag}(I)$. For the case of $\text{Ag}(I)$, it is supposed that silver ions may form a complex with Bromine on particular surface facets, preventing growth on these facets [17,18]. In a second hypothesis, $\text{Ag}(I)$ is preferentially reduced onto higher energy surface facets of gold through underpotential deposition (UPD), forming an $\text{Ag}(0)$ monolayer on the nanorods. More recently, Moreau and co-workers proposed a new mechanism regarding the role of trace Ag in the synthesis of Au nanorods. Accordingly, Ag participates in the anisotropy of structure because it deposits initially on the Au surface, making the length growth rate exceeds the diameter growth rate. However, as the reaction evolves, Ag is progressively incorporated into the bulk of the nanorods due to the subsequent deposition of gold atoms. According to this proposal, in the final stages of the reaction, most surface atoms are Au [15].

Here, we report our findings on the surface characterization of Au-NRs using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) to access the outermost layer of the metallic core. To complement information regarding the contribution of different Ag species on Au-NRs by experimental XPS, we carried out *ab initio* calculations to simulate the chemical state of the metallic core. Thus, based on XPS experimental data, we compare the values of binding energy (BE) of the Au and Ag components with the theoretical acquisition of BE using the WIEN2k/VASP package. Important to note that computational support was substantially simplified, considering only the metallic core and the atoms behaving as in bulk. Small clusters with approximately 50 metal atoms behave like large molecules, while large ones with 300 or more atoms exhibit characteristics of a bulk sample [19]. The main results regarding the chemical environment of the metallic core of Au-NRs obtained by “silver-assisted seeded methodology” are presented below. Our results also suggest that silver coexists on the outermost surface in two oxidation states, namely Ag^0 and Ag^+ , in addition to metallic gold.

2. Experimental and theory

Hydrogen tetrachloroaurate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99.999%), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, > 98.0%), sodium borohydride (NaBH_4), and ascorbic acid were purchased from Aldrich. Silver nitrate (AgNO_3 , 99.999%) was obtained from Merck. All chemicals were used as received without further purification. Samples were prepared using deionized water

(Millipore Milli-Q Water System), and whole glassware was previously cleaned using aqua regia solution (3:1 HCl/HNO₃). Caution: aqua regia is a highly oxidizing solution and must be handled with extreme care.

The synthetic route of process following the methodology described by Nikoobakht and El-Sayed [13]. Firstly, Au seeds were synthesized by adding 5.0 mL of a 0.5 mmol L⁻¹ solution of HAuCl₄ in 5.0 mL of a 200.0 mmol L⁻¹ solution of CTAB. Next, 600 μ L of 10.0 mmol L⁻¹ of an ice-cold NaBH₄ was added under vigorous agitation for 3 min. In the second part, Au-NRs were prepared by adding 1.0 mmol of CTAB in 5.0 mL of deionized water at 27–30 °C. Then, sequentially it was added 100 μ L of 4.0 mmol L⁻¹ of AgNO₃, 5.0 mL of 1.0 mmol L⁻¹ of HAuCl₄, and 100 μ L ascorbic acid 78.8 mmol L⁻¹. Finally, 12 μ L of the seed solution was gently added, resting it on the liquid surface and keep undisturbed for about 12 h.

The absorbance spectrum of the solution containing Au-NRs was acquired over a range from 350 to 1000 nm using a UV–Vis Rigol Ultra-3560 spectrophotometer. The particle morphologies were analyzed using a Transmission Electron Microscopy Tecnai G2-12- SpiritBiotwin FEI - 120 kV from UFMG Electronic Microscopy Center. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was carried out using a Kratos Axis Ultra DLD using a monochromatic Al K α (1486.6 eV) X-ray source, 150 W, 10 mA and 15 kV. The survey spectrum was recorded with a pass energy of 80 eV and 1 eV per step, and high-resolution spectra were recorded with a pass energy of 40 eV and 0.1 eV per step. The binding energy (BE) of the core level C 1s set at 284.8 eV was used for spectra calibration to compensate for surface-charging effects. The elemental relative sensitivity factors (RSF) provided by the instrument's manufacturer were used for elemental quantification. Casa XPS (version 2.3.17) was employed for data treatment. For sample preparation, Au-NRs were separated by centrifugation, then washed with diluted CTAB solution to remove the excess of surfactant and unreacted gold and silver and separated again by centrifugation. The detailed procedure for this treatment is presented as follow: as-prepared Au-NRs solutions were centrifuged for 2:30 h at 2000 rpm; after deposition of the nanoparticles on the bottom of the centrifuge tube, the supernatant was removed and subsequently 10 mL of diluted 1.0 mmol L⁻¹ of CTAB solution was added, homogenized and centrifuged again at 3000 rpm for at least 2 h. After removal of the supernatant, samples were transferred to an Eppendorf vial and dried by lyophilization.

The theoretical modeling of gold crystal was analyzed within the density functional theory (DFT), employing the Kohn–Sham equation and using the all-electron augmented plane wave method with local orbitals as provided in the WIEN2k package version 18.2 [20]. Bulk gold structures, either defect-free or with Ag as defect were described by unit cells of 3 \times 3 \times 3 primitive cells. Atom configuration of Au was [Xe]:4f¹⁴_{core} 5d¹⁰6s¹_{val} and configuration of Ag was [Kr]:_{core} 4d¹⁰5s¹_{val}, where the subscripts indicate if the orbitals are treated as fully-relativistic core states or as valence states for which the spin-orbit coupling is neglected. The experimental lattice constant $a = 4.0782$ Å was used, and the ionic relaxation was performed with VASP until forces on the atoms were smaller than 8.0 meV/Å [21,22]. For these metallic systems, the

Perdew–Burke–Ernzerhof (PBE) exchange-correlation functional was chosen. The energy cutoff was determined by $R_{\text{mt}} \cdot K_{\text{max}} = 8$, with the muffin-tin radius of $R_{\text{mt}} = 1.2$ Å. The wavefunctions were constructed with maximum azimuthal number $l = 12$ inside atomic spheres and with non-muffin-tin matrix elements up to $l = 6$. Silver defects in gold bulk structures were modeled with 3 \times 3 \times 3 face-centered primitive cells. Silver surface adatom was described by an atom at the three-fold hollow site of the Au [111] surface modeled with a trilayer of 3 \times 3 hexagonal primitive cells. Since metals require a reasonably accurate Fermi level, we used a k -meshes of 20 \times 20 \times M grid with $M = 20$ for bulk and $M = 1$ for the layer structure. The binding energies were calculated utilizing the Slater transition theory with $\frac{1}{2}$ electron excitation to vacuum, compensated by a corresponding background charge. For more details about the computational model, check the Electronic Supplementary Information (ESI).

3. Results and discussion

Although Au-NRs obtained by “seed methodology” have been extensively studied since the initial works of Murphy and El-Sayed groups [13,23,24], the chemical environment of the metallic core still generates debate in the scientific community. The modeling and characterization of this material class (and other types of gold nanostructures) is challenging because the modification of few experimental parameters, such as the ratio of reactants and temperature of synthesis, can lead to products with very distinct morphological characteristics [25–27]. Additionally, chemical models are puzzling and often contrasting each other because the structure of Au-NRs is elucidated in diverse media and using different experimental tools, such as ultraviolet–visible spectroscopy (UV–Vis), nuclear magnetic resonance (NMR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), transmission electrons microscopy (TEM) or surface-assisted laser desorption/ionization (SALDI-MS) and, therefore, a reliable figure of the system is still sought [17,18,28]. Our research was motivated by recent works published in the literature showing two different proposals for the chemical state of silver in gold nanorods: first, the suggestion of Moreau and co-workers [15] reporting the internalization of Ag atoms into Au crystal during the growth of nanorods; the second proposal was elaborated by Ye et al. [16] suggesting the oxidation of silver surface monolayer due to the desorption of the CTAB molecules when the nanoparticles are rinsed with water or ethanol. In this manuscript, XPS was used to determine the surface chemistry of the outermost layer of Au-NRs in parallel with *ab initio* calculations to increment information about the binding energy of silver atoms (Ag⁰) in different configurations (or chemical states) in gold crystals. The simulated systems were bulk gold, either defect-free or with Ag as a defect (Ag-on-Au site, i.e., substitutional defect, and Ag interstitial defect in Au crystal) and silver surface adatom over Au crystal.

Fig. 1a shows a typical UV–Vis–NIR spectrum and the corresponding transmission electron microscopy of Au-NRs prepared by seed-methodology. As expected, the image shows the Au-NRs absorption profile, which presents two

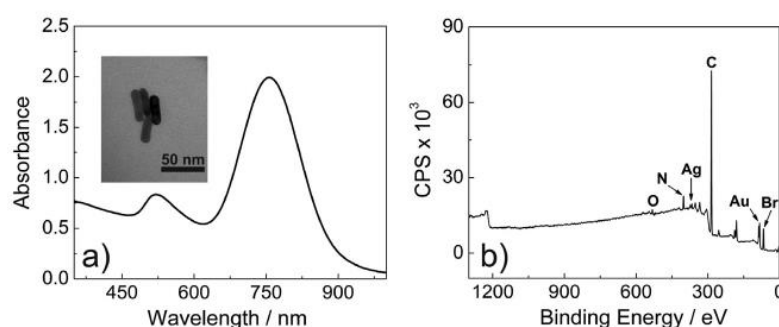


Fig. 1 – (a) UV–Vis–NIR spectrum of an aqueous solution containing CTAB-capped Au-NRs. Inset: TEM micrograph of typical Au-NRs. (b) XPS survey spectrum of the Au-NRs.

distinct plasmon bands associated with the anisotropy in the structure: one corresponding to the transverse band (short axis) at 520 nm and one corresponding to the longitudinal band (long axis) at 757 nm. TEM micrograph presented in the inset of Fig. 1 shows the typical rod-like structure of these NPs. The nanoparticles aspect ratio was estimated to be 3.5 from the UV–Vis spectrum presented in Fig. 1a (check ESI for details) [29–31]. XPS is a powerful technique for characterization and determination of surface chemistries of the (nano)materials. Owing to the inelastic scattering of the electrons in the analyzed sample, the information obtained is regarding only to the outermost surface layer in the range of 5–10 nm [32]. Analysis of the surface layer using XPS has been conducted to the speciation of organic components and the metallic core of Au-NRs. The wide scan XPS spectrum is presented in Fig. 1b. As expected, it was detected the signals corresponding to carbon, nitrogen, Bromine, gold and silver. These elements are the chemical constituents of the CTAB bilayer and the metallic core. Important to notice, it was not observed the signals corresponding to chlorine in the sample, indicating that centrifugation and redispersion of Au-NRs in 1.0 mmol L⁻¹ CTAB solution was efficient in removing the excess of CTAB and reactants in the samples. Additionally, the presence of oxygen was observed. The oxygen is assigned to the presence of adventitious carbonaceous compounds due to sample

handling under environmental conditions [33]. The high-resolution spectra in the regions of the C 1s, N 1s, Br 3d, O 1s, Ag 3d and Au 4f were registered in order to determine the atomic concentrations (%) and binding energies (eV) of the elements.

Table 1 presents the surface composition of Au-NRs in terms of relative atomic concentration (%) and binding energies (eV) determined by XPS. The components of the cationic surfactant C, N and Br, presented atomic concentrations of 91.01, 3.77 and 3.11%, respectively. Oxygen was observed in an atomic concentration of 0.83%. The metal concentrations of Au and Ag are 1.07 and 0.21%, respectively. The calculus of the percentage of silver compared to gold is approximately 16% of the metallic layer. This value is considerably higher than that found by Liz-Marzán and co-workers in a former XPS study (around 9% of silver) [34]. Previous inductively couple plasma spectroscopic (ICP) experiments carried out by Orendorff and Murphy found values of silver percentage ranging from 2.5 to 4.5% of total metal concentration in nanorods [35]. The reason for this difference in the amount of silver is still unclear. However, given the complexity of the medium, with several reactions co-occurring and several parameters that affect the final product (such as temperature, pH and the ratio between reagents), it may cause some lack of reproducibility between the final products [36].

Table 1 – Surface chemical composition of Au-NRs as obtained by high-resolution XPS spectra.

Element regions	Peak-Binding energy (eV)	Suggested attributions	Surface concentration (at. %)	Total (%)
C 1s	284.8	C–H, C–C (C1)	63.2	91.0
	285.6	C–N (C2)	19.6	
	286.3	–N–(CH ₃) ₃ (C3)	6.9	
	287.8	C _{adv} = O (C4)	1.3	
N 1s	402.1	–N ⁺	3.8	3.8
Br 3d _{5/2}	67.0	Br [–]	1.8	3.1
Br 3d _{3/2}	68.1		1.3	
O 1s	532.1	C–O	0.8	0.8
Au 4f _{7/2}	83.5	Au(0)	1.1	1.1
Au 4f _{5/2}	87.2			
Ag 3d _{5/2}	368.2	Ag(0)	0.03	0.2
Ag 3d _{3/2}	374.3			
Ag 3d _{5/2}	367.4	Ag(I)	0.2	
Ag 3d _{3/2}	373.4			
				100.0

A large amount of silver in the rods can be rationalized considering three different mechanisms of growth summarized by Lohse and Murphy [37]. In the first mechanism, it is supposed that a silver(I) bromide complex (AgBr_2^- or $\text{CTA}-\text{Br}-\text{Ag}^+$) blocks the gold surface in the longitudinal facets, favoring the anisotropic growth of the rods. That is, the silver–bromide complex forms a stable surfactant bilayer strongly adsorbed on the gold surface, which binds to particular faces of Au crystal. Thus, there is a prevention of the growth on these faces, leading to elongation of the crystal. The second mechanism assumes that Ag^+ ions change the shape of CTAB micelles, from spherical to cylindrical, directing the formation to Au nanorods. Finally, the third mechanism was proposed by Liu and Guyot-Sionnest, suggesting that underpotential deposition (UPD) of $\text{Ag}(0)$ occurs at different Au faces leading to symmetry-breaking and thus, the rod formation [38]. Underpotential deposition is a process that occurs through the formation of a metal adlayer onto a more noble metal substrate. That is, when a metal substrate is cathodically polarized, ions of a less noble metal can be deposited coating the substrate [39]. Specifically, the stabilization of an adsorbate layer is higher when the substrate has open facets. Because of this, the reduction of Ag adatoms on gold occurs preferentially on the higher energy crystal facets with more atoms to be coordinated, i.e., [110] facets, followed by [100] and [111] facets, respectively. It assumes that Ag adatoms act as strong binding agents on longitudinal [110] facets, leading to one-dimensional growth along [100] direction [35,40]. In this work, we adopted the model proposed by Liu and Guyot-Sionnest to analyze and

discuss the binding energies observed by XPS and to carry out *ab initio* simulations.

Fig. 2a–f show the high-resolution spectra of the constituents of the gold nanorods. Fig. 2a shows the C 1s spectrum that was deconvoluted into four components. The most intense C 1s signal identified as C1 corresponding to carbon bound to carbon or hydrogen at 284.8 eV, derived from the aliphatic chain of CTAB. As aforementioned, all other values of binding energy have been referenced for that specific energy component. The first remark indicates a large percentage of aliphatic carbon (63.2%), even after washed away part of CTAB molecules in the preparation step. The signal at 285.6 eV identified as C2 was assigned to carbon bound to an amine [41]. These observations are consistent with previous reports that C 1s can be resolved in two main components corresponding to C–C and C–N bonding [42]. Important to notice that the atomic ratio $\text{C1/N} = 63.19/3.77 = 16.8$ is close to the atomic ratio $\text{C1/N} = 15$ of the alkane chain and nitrogen of CTAB. The concentration of the second observed carbon C2 is 19.6% and its ratio $\text{C2/N} = 19.64/3.77 = 5.21$, nearly to the atomic ratio of the CTAB head charged group ($4\text{C}/1\text{N} = 4$). Finally, the components at higher energy C3 and C4 were ascribed to carbon bound to nitrogen ($\text{H}_2\text{C}-\text{N}-\text{C}$) at 286.3 eV and a weak component near 287.8 eV attributed to adventitious carbon ($\text{C}_{\text{adv}} = \text{O}$) or amide group [41,43,44].

The N1s spectrum (Fig. 2b) was fitted in one component at 402.1 eV and that was ascribed to the protonated amine of the surfactant head-group [45,46]. Bromine presented a doublet peak corresponding to $3d_{5/2}$ and $3d_{3/2}$ at 67.0 and 68.1 eV,

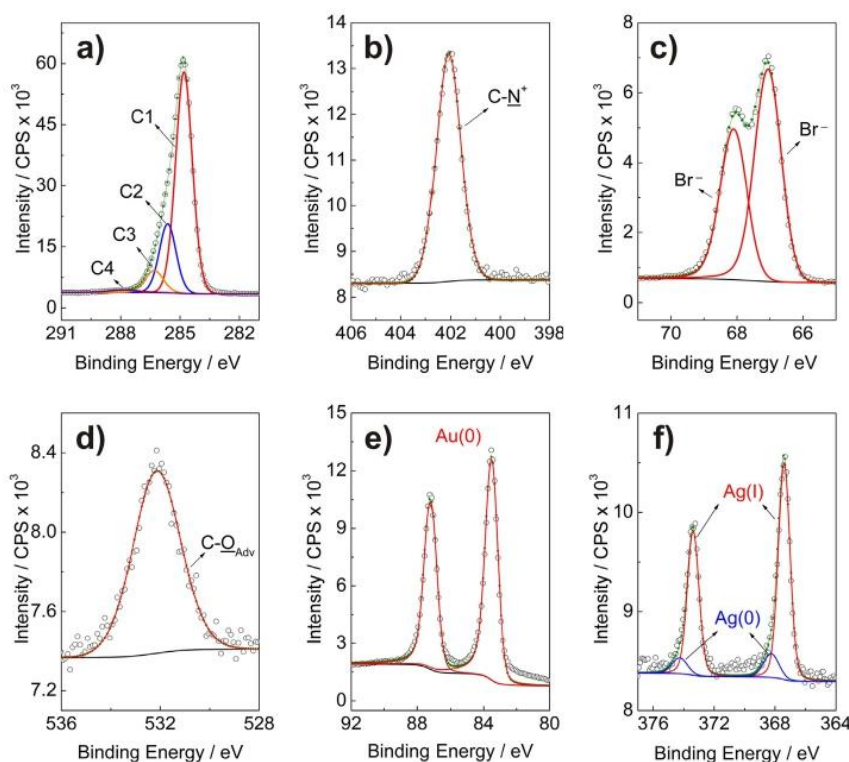


Fig. 2 – Deconvolution of high-resolution spectra of the elements in the regions (a) C 1s, (b) N 1s, (c) Br 3d, (d) O 1s, (e) Au 4f and (f) Ag 3d. Open circles represent the CPS signal while the green line is the envelope.

respectively (Fig. 2c) that can be associated to the bromide anion in CTAB [45]. The O1s spectrum shown in Fig. 2d was resolved in one component at 532.1 eV attributed to oxygen bound to nitrogenated carbon.

The high-resolution gold spectrum in the Au 4f region is shown in Fig. 2 (e). The Au 4f_{7/2} photoelectron peak is located at 83.5 eV and 4f_{5/2} is located at 87.2 eV. Other experimental parameters such as FWHM and spin-orbit split presented values of 0.94 eV and $\Delta = 3.7$ eV. These binding energy values are smaller than 84.0 eV and 87.0 eV for the Au 4f_{7/2} and Au 4f_{5/2}, respectively, usually ascribed to zerovalent gold [47]. From a chemical perspective, the origin of these BE at lower energies could be evidence of the interaction of surface gold with different species (bromide anion, CTA⁺ and silver) accommodated on the crystal surface [41].

To gain insight into the chemical state of components in the metallic core, we carried out computation experiments to estimate the binding energies through the Slater transition state with the WIEN2k package. The starting structure considered for computation correspond to the bulk fcc Au crystal. Initially, it was calculated the binding energy of Au crystal, which presented the following values: 83.4 and 87.4 eV for the doublets 4f_{7/2} and 4f_{5/2}, respectively. As can be seen in Table 2, theoretical binding energies are in excellent agreement with experimental data obtained by XPS (i.e., 83.5 and 87.2 eV for the same Au 4f doublets) even bear in mind that calculations were done considering Au bulk crystal and ignoring the interactions with CTAB.

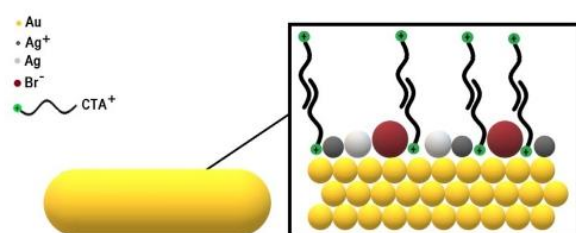
Our experimental results for the binding energy of silver indicate the presence of two components, as shown in Fig. 2f. The figure shows the XPS Ag 3d spectrum and the curve fitting presents characteristic Ag 3d_{5/2} and Ag 3d_{3/2} peaks at 367.4 eV and 373.4 eV, respectively. Similar values were observed by other research groups that attributed this particular energy to the Ag(I) species [34]. Furthermore, in addition to Ag(I) contribution, one additional doublet is necessary to fit the envelope curve: a second Ag chemical state with Ag 3d_{5/2} and Ag 3d_{3/2} peaks at 368.2 eV and 374.3 eV, respectively, attributed to zerovalent silver (Ag(0))

[48,49]. The most significant feature in the Ag 3d spectrum is the large difference in the concentration between two silver species in the nanorods: Ag(I) comprises 85.7% of the total silver signal while Ag(0) comprises 14.3%, respectively. Based on the XPS results for Ag(0), we decide to model some configurations of silver atoms on a gold crystal. Firstly, the binding energy of Ag adatom on an Au [111] crystal was computed, and the values obtained were 365.5 and 372.0 eV for the Ag 3d_{5/2} and Ag 3d_{3/2}, respectively (Table 2). These values are approximately 1.9 eV smaller than experimental Ag(0) doublet (i.e., 368.2 and 374.3 eV), which is quite reliable since we do not consider any chemical interactions with CTAB. It should be mentioned that the binding energy of the core electrons usually increases when the valence electrons are involved in bonds (such as Ag and bromide bonds in the Au-NRs) and, therefore, it is expected that BE obtained from theory is smaller than experimental XPS [50].

In the case of Ag located in the inner of Au-NRs, knowledge of different chemical configurations is a critical issue because this information is not available through experimental XPS. Therefore, calculations were performed to estimate the binding energy of the Ag atoms in the inner of Au-NRs. As mentioned in the previous section, the chemical state of silver in Au-NRs remains unclear and controversial. Moreau and co-workers recently reported a new model to explain the chemical state of silver in Au-NRs using a combination of spectroscopic techniques such as X-ray absorption fine structure (XAFS), X-ray fluorescence (XRF), and EDX-mapping [15]. In accord with the authors, silver atoms are reduced by under-potential deposition (UPD) on the surface of Au nanoparticles in the very early stages of nanorods formation. During the step of anisotropic growth of nanoparticles, Ag(0) adsorbs onto nanoparticles surface stabilizing the [110] facets, which leads to an elongation of nanoparticles with preferential reduction of Au in the rod extremities. With the progress of reaction time, Ag is incorporated to nanorod inner due to subsequent deposition of Au atoms until reaction completion (approximately 120 min). In our simulation, we assume the presence of Ag as substitutional (i.e., Ag-on-Au site) and interstitial defects in the crystalline lattice of gold. Our theoretical studies revealed that Ag-on-Au sites are more energetically favorable than interstitial Ag in the gold crystal because the defect formation energy (that is, the difference between the formation energy of an ideal crystal and a defective one) is 0.6 eV higher in crystals with interstitial defects (check Fig. S1a and b at ESI for details). This mean that the interstitial Ag forces a disturbance on the gold lattice, while substitutional Ag has almost no effect, as expected since the two atom types have very similar atomic radii. Therefore, from the defect formation energy data, interstitial Ag is not expected in Au crystals. The calculated binding energy for Ag 3d substitutional was 365.8 and 372.2 eV for 3d_{5/2} and 3d_{3/2}, respectively (see Table 2). Also, the calculated binding energy for Ag 3d interstitial was found at 366.5 and 372.8 eV for 3d_{5/2} and 3d_{3/2}, respectively. Unfortunately, no experimental data are available to compare to these theoretical values of binding energy because the information of a typical layer thickness measured by XPS is around 5–10 nm [32]. Thus, also considering the surfactant bilayer, XPS is not appropriate to infer whether Ag atoms are, in fact, spread to

Table 2 – XPS parameters of zerovalent metallic elements in Au-NRs in eV as obtained by experiments and *ab initio* calculations.

	Experimental	Theory
Au 4f doublets		
BE (eV)	83.5, 87.2	83.4, 87.4
FWHM (eV)	0.94	—
Spin-Orbit Split (eV)	3.7	4.0
Ag 3d doublets		
BE (eV)	368.2, 374.3	365.5, 372.0 (surface) 366.5, 372.8 (interstitial) 365.8, 372.2 (substitutional)
FWHM (eV)	1.01	—
Spin-orbit split (eV)	6.0	6.5 (surface) 6.3 (interstitial) 6.4 (substitutional)



Scheme 1 – Schematic representation of an isolated Au-NR and details of its outermost surface after washing with diluted CTAB solution in air. Adventitious carbon ($C_{adv} = O$) species are not shown in this model.

the bulk of Au-NRs and we cannot test the hypothesis of Moreau and co-workers.

Consequently, our experiments lead us to conclude that the two-chemical state for silver may be in accordance with the hypothesis proposed by Ye and co-workers to explain the oxidation of Ag(0) monolayer over Au-NRs [16]. In this paper, the authors detected the presence of a silver surface layer on Au-NRs. Monitoring the evolution of the plasmon scattering signal, they noticed that the washing of CTAB from gold rods, the silver layer initially protected by the surfactant CTAB, gets oxidized as soon as CTAB desorbs due to a reduced concentration in the flowing solution. In our experiments, it was necessary to remove the excess surfactant from the Au-NRs by washing the samples with a more diluted CTAB solution to perform the XPS measurements. Therefore, during the process of washing and handling of Au-NRs on-air, may be occurred the oxidation of the Ag atoms on the crystal surface as shown in the reactions below: [51,52].



Since it was detected two chemical states for Ag, we assume that this washing procedure may also lead to an oxidation process of the silver layer, generating a mixing Ag(0) and Ag(I) species on the gold surface, as can be visualized in Scheme 1.

4. Conclusion

In summary, we studied the outermost layer of Au-NRs using XPS spectroscopy and *ab initio* calculations in order to get insights regarding the chemical states of the constituents of the metallic core. Three significant results can be extracted from this paper. First, *ab initio* simulations showed that Ag atoms might have different binding energies, depending on the configuration of silver atoms in Au-NRs. Second, our XPS results indicate the presence of a mixed Ag(0)/Ag(I) species on the surface of Au-NRs, corroborating with recent results in the literature that shows that Ag(0) monolayer can be oxidized to Ag(I) during the steps of centrifugation and washing with diluted CTAB solution. Finally, our theoretical studies showed that silver atoms located at interstitial sites could distort the

crystalline structure, and, therefore, this defect should be unlikely to occur in Au-NRs. That is, an interstitial position would imply a rather large relaxation and make the Au-NR more unstable at high Ag concentrations.

Author contributions

C. Oliveira performed the synthesis experiments. C. Oliveira and P. Bargiela performed the XPS experiments. C. R. Chaves helped in the stages of synthesis and characterization by TEM. C. Persson performed the DFT calculations. C. Oliveira, M.G.M.C. Rocha, J.F.D. Chubaci, M. Boström, A. F. Silva, C. Persson, and M. Malta analyzed the data. A. F. Silva, C. Persson, and M. Malta designed the study. C. Persson and M. Malta wrote the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank the funding agencies Capes, Fapesb/CNPq (Pronem: PNE0012/2011, Pronex: PNX0007/2011 and INT0003/2015), CNPq, RCN (project 251131), and Proc. USP 2019.1.971.43.0 for financial support. We would like to thank the technical staff of the CME/UFGM for the help with electronic microscopy characterizations during the execution of this work. Finally, we acknowledge the access to HPC resources provided by SNIC/Sweden and NOTUR/Norway.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.059>.

REFERENCES

- [1] Rajput S, Werezuk R, Lange RM, McDermott MT. Fungal isolate optimized for biogenesis of silver nanoparticles with enhanced colloidal stability. *Langmuir* 2016;32(34):8688–97.
- [2] El-Sayed MA. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc Chem Res* 2001;34(4):257–64.
- [3] Rossi LM, Fiorio JL, Garcia MAS, Ferraz CP. The role and fate of capping ligands in colloiddally prepared nanoparticle catalysts. *Dalton Trans* 2018;47(17):5889–915.
- [4] Grzelczak M, Vermant J, Furst EM, Liz-Marzan LM. Directed self-assembly of nanoparticles. *ACS Nano* 2010;4(7):3591–605.
- [5] Jain PK, Huang XH, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing,

- biology, and medicine. *Acc Chem Res* 2008;41(12):1578–86.
- [6] Murphy CJ, Thompson LB, Alkilany AM, Sisco PN, Boulos SP, Sivapalan ST, et al. The many faces of gold nanorods. *J Phys Chem Lett* 2010;1(19):2867–75.
 - [7] Linic S, Christopher P, Ingram DB. Plasmonic-metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy. *Nat Mater* 2011;10(12):911–21.
 - [8] Cobley CM, Chen JY, Cho EC, Wang LV, Xia YN. Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem Soc Rev* 2011;40(1):44–56.
 - [9] Huang XH, Neretina S, El-Sayed MA. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Adv Mater* 2009;21(48):4880–910.
 - [10] Merrill NA, Sethi M, Knecht MR. Structural and equilibrium effects of the surface passivant on the stability of Au nanorods. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013;5(16):7906–14.
 - [11] Jia YP, Shi K, Liao JF, Peng JR, Hao Y, Qu Y, et al. Effects of cetyltrimethylammonium bromide on the toxicity of gold nanorods both in vitro and in vivo: molecular origin of cytotoxicity and inflammation. *Small Methods* 2020;4(3):11.
 - [12] Grabinski C, Schaeublin N, Wijaya A, D'Couto H, Baxamusa SH, Hamad-Schifferli K, et al. Effect of gold nanorod surface chemistry on cellular response. *ACS Nano* 2011;5(4):2870–9.
 - [13] Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem Mater* 2003;15(10):1957–62.
 - [14] Almora-Barrios N, Novell-Leruth G, Whiting P, Liz-Marzan LM, Lopez N. Theoretical description of the role of halides, silver, and surfactants on the structure of gold nanorods. *Nano Lett* 2014;14(2):871–5.
 - [15] Moreau LM, Jones MR, Roth EW, Wu J, Kewalramani S, O'Brien MN, et al. The role of trace Ag in the synthesis of Au nanorods. *Nanoscale* 2019;11(24):11744–54.
 - [16] Ye WX, Kruger K, Sanchez-Iglesias A, Garcia I, Jia XY, Sutter J, et al. CTAB stabilizes silver on gold nanorods. *Chem Mater* 2020;32(4):1650–6.
 - [17] Hubert F, Testard F, Spalla O. Cetyltrimethylammonium bromide silver bromide complex as the capping agent of gold nanorods. *Langmuir* 2008;24(17):9219–22.
 - [18] Niidome Y, Nakamura Y, Honda K, Akiyama Y, Nishioka K, Kawasaki H, et al. Characterization of silver ions adsorbed on gold nanorods: surface analysis by using surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Chem Commun* 2009;(13):1754–6.
 - [19] Hostetler MJ, Wingate JE, Zhong CJ, Harris JE, Vachet RW, Clark MR, et al. Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir* 1998;14(1):17–30.
 - [20] Blaha P, Schwarz K, Madsen GKH, Kvasnicka D, Luitz J, Laskowski R, et al., WIEN2k. An augmented plane wave plus local orbitals program for calculating crystal properties techn. Universitat; 2018. p. 287.
 - [21] Kresse G, Furthmuller J. Efficiency of ab-initio total energy calculations for metals and semiconductors using a plane-wave basis set. *Comput Mater Sci* 1996;6(1):15–50.
 - [22] Kresse G, Joubert D. From ultrasoft pseudopotentials to the projector augmented-wave method. *Phys Rev B* 1999;59(3):1758–75.
 - [23] Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *J Phys Chem B* 2001;105(19):4065–7.
 - [24] Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Adv Mater* 2001;13(18):1389–93.
 - [25] Chen Y, Gu X, Nie CG, Jiang ZY, Xie ZX, Lin CJ. Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis. *Chem Commun* 2005;(33):4181–3.
 - [26] Personick ML, Langille MR, Zhang J, Mirkin CA. Shape control of gold nanoparticles by silver underpotential deposition. *Nano Lett* 2011;11(8):3394–8.
 - [27] Langille MR, Personick ML, Zhang J, Mirkin CA. Defining rules for the shape evolution of gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2012;134(35):14542–54.
 - [28] Gonzalez-Rubio G, Kumar V, Llombart P, Diaz-Nunez P, Bladt E, Altantzis T, et al. Disconnecting symmetry breaking from seeded growth for the reproducible synthesis of high quality gold nanorods. *ACS Nano* 2019;13(4):4424–35.
 - [29] Link S, El-Sayed MA, Mohamed MB. Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant (vol 103B, pg 3073, 1999). *J Phys Chem B* 2005;109(20):10531–2.
 - [30] Link S, Mohamed MB, El-Sayed MA. Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant. *J Phys Chem B* 1999;103(16):3073–7.
 - [31] Yan BH, Yang Y, Wang YC. Comment on "Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant". *J Phys Chem B* 2003;107(34):9159.
 - [32] Greczynski G, Hultman L. X-ray photoelectron spectroscopy: towards reliable binding energy referencing. *Prog Mater Sci* 2020;107.
 - [33] Tan SF, Raj S, Bisht G, Annadata HV, Nijhuis CA, Kral P, et al. Nanoparticle interactions guided by shape-dependent hydrophobic forces. *Adv Mater* 2018;30(16).
 - [34] Grzelczak M, Sanchez-Iglesias A, Rodriguez-Gonzalez B, Alvarez-Puebla R, Perez-Juste J, Liz-Marzan LM. Influence of iodide ions on the growth of gold nanorods: tuning tip curvature and surface plasmon resonance. *Adv Funct Mater* 2008;18(23):3780–6.
 - [35] Orendorff CJ, Murphy CJ. Quantitation of metal content in the silver-assisted growth of gold nanorods. *J Phys Chem B* 2006;110(9):3990–4.
 - [36] Scarabelli L, Sanchez-Iglesias A, Perez-Juste J, Liz-Marzan LM. A "tips and tricks" practical guide to the synthesis of gold nanorods. *J Phys Chem Lett* 2015;6(21):4270–9.
 - [37] Lohse SE, Murphy CJ. The quest for shape control: a history of gold nanorod synthesis. *Chem Mater* 2013;25(8):1250–61.
 - [38] Liu MZ, Guyot-Sionnest P. Mechanism of silver(I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids. *J Phys Chem B* 2005;109(47):22192–200.
 - [39] Grzelczak M, Perez-Juste J, Mulvaney P, Liz-Marzan LM. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev* 2008;37(9):1783–91.
 - [40] Murphy CJ, Thompson LB, Chernak DJ, Yang JA, Sivapalan ST, Boulos SP, et al. Gold nanorod crystal growth: from seed-mediated synthesis to nanoscale sculpting. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2011;16(2):128–34.
 - [41] del Cano R, Gisbert-Gonzalez JM, Gonzalez-Rodriguez J, Sanchez-Obrero G, Madueno R, Blazquez M, et al. Effective replacement of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) by mercaptoalkanoic acids on gold nanorod (AuNR) surfaces in aqueous solutions. *Nanoscale* 2020;12(2):658–68.
 - [42] Li YP, Yu HZ, Huang XX, Wu ZP, Xu HH. Improved performance for polymer solar cells using CTAB-modified MoO₃ as an anode buffer layer. *Sol Energy Mater Sol Cell* 2017;171:72–84.
 - [43] Boufi S, Vilar MR, Ferraria AM, do Rego AMB. In situ photochemical generation of silver and gold nanoparticles

- on chitosan. *Colloid Surface Physicochem Eng Aspect* 2013;439:151–8.
- [44] Moulder JF, Stickle WF, Sobol PE, Bomben KD. *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*. Eden Prairie, Minnesota: Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corporation; 1992.
- [45] Ahmad R, Boubekeur-Lecaque L, Nguyen M, Lau-Truong S, Lamouri A, Decorse P, et al. Tailoring the surface chemistry of gold nanorods through Au-C/Ag-C covalent bonds using aryl diazonium salts. *J Phys Chem C* 2014;118(33):19098–105.
- [46] Techane SD, Gamble LJ, Castner DG. X-ray photoelectron spectroscopy characterization of gold nanoparticles functionalized with amine-terminated alkanethiols. *Biointerphases* 2011;6(3):98–104.
- [47] Fuggle JC, Martensson N. Core-level binding-energies in Metals. *J Electron Spectrosc Relat Phenom* 1980;21(3):275–81.
- [48] Watanabe F, Nima ZA, Honda T, Mitsuhashi M, Nishida M, Biris AS. X-ray photoelectron spectroscopy and transmission electron microscopy analysis of silver-coated gold nanorods designed for bionanotechnology applications. *Nanotechnology* 2017;28(2).
- [49] Ke SL, Kan CX, Ni Y, Zhu XZ, Jiang MM, Wang CS, et al. Construction of silica-encapsulated gold-silver core-shell nanorod: atomic facets enrichment and plasmon enhanced catalytic activity with high stability and reusability. *Mater Des* 2019;177.
- [50] Tardio S, Cumpson PJ. Practical estimation of XPS binding energies using widely available quantum chemistry software. *Surf Interface Anal* 2018;50(1):5–12.
- [51] Xiu ZM, Zhang QB, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJJ. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett* 2012;12(8):4271–5.
- [52] Liu JY, Hurt RH. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ Sci Technol* 2010;44(6):2169–75.

Unveiling the Surface and the Ultrastructure of Palladized Fungal Biotemplates

Adriana M. Fontes, Camila Oliveira, Pascal Bargiela, Maria da G. C. da Rocha, Regina Geris, Antonio F. da Silva, Mahesh K. Gangishetty, Robert W. J. Scott,* and Marcos Malta*

Cite This: *Langmuir* 2021, 37, 12961–12971

Read Online

ACCESS |



Metrics & More

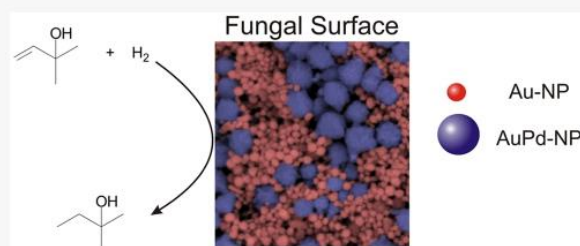


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: In this paper, two biosystems based on filamentous fungi and Pd nanoparticles (NPs) were synthesized and structurally characterized. In the first case, results concerning the integration and distribution of Pd-NPs on *Phialomyces macrosporus* revealed that nanoparticles are accumulated on the cell wall, keeping the cytoplasm isolated from abiotic particles. However, the *Penicillium* sp. species showed an unexpected internalization of Pd-NPs in the fungal cytosol, becoming a promising biosystem to further studies of *in vivo* catalytic reactions. Next, we report a new solution-based strategy to prepare palladized biohybrids through sequential reduction of Pd²⁺ ions over previously harvested fungus/Au-NP composites. The chemical composition and the morphology of the biohybrid surface were characterized using a combination of scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, and photoelectron spectroscopy. The deposition of Pd⁰ over the fungal surface produced biohybrids with a combination of Au and Pd in the NPs. Interestingly, other chemical species such as Au⁺ and Pd²⁺ are also observed on the outermost wall of microorganisms. Finally, the application of *A. niger*/AuPd-NP biohybrids in the 3-methyl-2-buten-1-ol hydrogenation reaction is presented for the first time. Biohybrids with a high fraction of Pd⁰ are active for this catalytic reaction.



1. INTRODUCTION

The integration of nanomaterials in the structure of microorganisms is becoming a focus of intense research due to the opportunity to join the unusual properties of nanosized particles with well-ordered morphology and biological functions of living entities.^{1,2} Various materials may cover the surface of cells, forming (bio)hybrids with physicochemical and biological properties different from native counterparts. The functionalization of cells with nanomaterials is, therefore, an exciting scientific frontier in the interface between biology, chemistry, physics, and materials science.^{1,3,4} For instance, Saraf's research group modified the surface of the Gram-positive bacteria *Bacillus cereus* by depositing a thin layer of gold nanoparticles (Au-NPs).⁴ Subsequently, the authors used the bacteria/Au-NPs hybrids in a bioelectronic humidity sensor, showing a 40-fold increase in the tunneling current when humidity varied from 20% to 0%. In another example, Wang and co-workers have demonstrated that the coating of calcium phosphate nanoflakes over yeast *Saccharomyces cerevisiae* increases cellular viability.⁵ The artificial inorganic layer protects the living cells against harsh environments permitting their survival, even under the attack of the lytic enzyme zymolyase. To date, one of the most successful methodologies for obtaining biohybrids constituted by living entities (prokaryotic and eukaryotic cells) and nanomaterials is based on the layer-by-layer (LbL) technique. The LbL

encapsulation consists of the sequential deposition of oppositely charged polyelectrolytes onto biological cells, radically changing their physicochemical properties. For example, the LBL approach has been extensively used by the Fakhruddin group to encase biological cells with a wide variety of materials such as Au-NPs, Ag-NPs, magnetic iron oxide nanoparticles, DNA, serum bovine albumin, etc.^{6–8} It should be noted that the metabolic activity of coated cells was well-preserved after surface modification with these artificial nanolayers.

Several reports have described the ability of filamentous fungi to acquire a metallic layer during their growth, forming biohybrid structures through a straightforward procedure based on a nutrition-driven process.^{9–12} The critical point of this process is the culturing of fungi in solutions containing colloidal metal NPs (Au, Pd, Pt, or Ag NPs) and a carbon source. Through carbon metabolism, hyphal cells can extend for thousands of microns through the direct progression of the apex, with NPs being simultaneously assimilated and trapped

Received: July 29, 2021

Revised: September 26, 2021

Published: October 29, 2021



ACS Publications

© 2021 American Chemical Society

12961

https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02023
Langmuir 2021, 37, 12961–12971

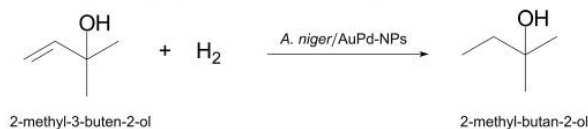
in the fungus wall, forming a dense metallic carapace.¹³ The features of the microorganisms change drastically when metal NPs (and other materials) are integrated into the cell wall. For example, Bigall et al. have shown that fungus T07AS/Pt-NPs biohybrids can be used as catalysts to reduce hexacyanoferrate (III) by thiosulfate, i.e., a new property that native organisms did not possess.¹⁴ Although a large number of potential applications of fungi/metal NPs may be envisioned in areas like catalysis, sensors, and biotechnology, many fundamental aspects of structure/property relationships of such hybrids need to be elucidated before these biosystems become competitive for practical functional uses.^{10,12,15,16} More specifically, it is necessary to clarify the interactions between the nanomaterials and the components of the fungal cell wall, and the affinity of the microorganism for different nanomaterials. Pd nanoparticle (Pd-NP) applications in catalysis, including carbon–carbon couplings in Sonogashira, Mizoroki–Heck, and Suzuki–Miyaura reactions, are well-known.^{17–19} However, several reports in the literature emphasize the toxicity of Pd-NPs for cells and microorganisms.^{20,21} Particularly for fungal biohybrids, there is a low affinity of microorganisms for both Pd and Pt NPs.¹⁴ In fact, very little is known about the chemical environment and the structural details of fungal-bound metal NP biosystems. For example, while most studies focus on the assimilation of NPs on the surface of microorganisms during fungal growth, we and others have also observed the internalization of NPs in the hyphal compartment.^{22–25} Apparently, the size of NPs has critical importance in their assimilation of nanoparticles by different fungal species.

Herein, we wish to report our results regarding the ultrastructural elucidation of two biosystems constituted by fungus/Pd-NPs and a new palladized fungus/AuPd-NPs. In the first case, it will discuss results concerning the integration and distribution of Pd-NPs on the structure of *Phialomyces macrosporus* and *Penicillium* sp. species. As aforementioned, Pd-NPs were revealed to be toxic to the microorganisms, but an unexpected internalization of Pd-NPs in the fungal cytosol was observed for *Penicillium* sp. To the best of our knowledge, this is the first time that the spatial distribution of self-assembled Pd-NPs on fungal cells has been studied using thin-section transmission electron microscopy analyses. Next, we will report a new solution-based strategy to prepare surface Pd-rich biohybrids through sequential reduction of Pd²⁺ ions over previously harvested fungus/Au-NP composites. These results are significant because we developed a straightforward and general methodology for the palladization of the fungal surface. Characterization of the biohybrid surface was focused on the chemical composition and morphology using a combination of scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and photoelectron spectroscopy (XPS). The deposition of Pd⁰ over the fungal surface produced biohybrids with bimetallic AuPd NPs (designated in this article as AuPd-NPs). Surprisingly, other chemical species such as Au⁺ and Pd²⁺ have also been observed on the outermost wall of microorganisms. Finally, the application of *A. niger*/AuPd-NPs biohybrids in the 3-methyl-2-buten-1-ol hydrogenation reaction is presented (Scheme 1).

2. EXPERIMENTAL SECTION

Fungi/metal nanoparticle (Au or Pd-NPs) biohybrids were cultivated in solutions containing only citrate-stabilized metal NPs. Citrate ions play a role as a capping agent, preventing the aggregation of

Scheme 1. Catalytic Hydrogenation of 2-Methyl-3-buten-2-ol Using *A. niger*/AuPd-NPs as Catalyst



nanoparticles while serving as a carbon source for microorganisms. Consequently, the growth conditions were adjusted culturing the filamentous fungi in colloidal solutions with molar ratios [citrate]:[M²⁺] = 0.3, 2.0, 3.7, or 7.1 (M²⁺ = metallic precursor, Au³⁺ or Pd²⁺). Herein, biohybrid samples were identified according to the solutions in which they were originally cultivated.

2.1. Synthesis of Metal Nanoparticles. Au-NPs or Pd-NPs were prepared through chemical reduction of hydrogen tetrachloroaurate (HAuCl₄, Aldrich 99.999%) or palladium chloride (PdCl₂, Aldrich 99.999%) following the methodology previously described by Fontes et al. and Bigall et al.^{13,14} The Pd(II) stock solution was prepared through dissolution of PdCl₂ in concentrated hydrochloric acid (Merck) in a ratio of 1:2 (PdCl₂:HCl) followed by dilution in deionized water. Solutions were prepared to get 0.135 mmol of M²⁺ in a total volume of 500 mL. Before reduction, 1.1 mL of a 0.10 mol L⁻¹ of M²⁺ stock solution was added to boiling water and left to mix for 1 min. Next, 1.1 mL of a citrate stock solution containing 1.0% sodium citrate dihydrate (Aldrich) and 0.05% citric acid (Aldrich) was added. After 20 s, 2.75 mL of a fresh solution of 0.08% sodium borohydride (NaBH₄, Aldrich) containing 1.0% sodium citrate and 0.05% citric acid was injected. The mixture was kept at boiling for 10 min, followed by cooling to room temperature. The resulting colloidal solution had the final molar ratio of [citrate]:[M²⁺] = 0.3. Additional aliquots of the citrate stock solution led to final solutions with molar ratio [citrate]:[M²⁺] = 2.0, 3.7, and 7.1.

2.2. Biohybrids Cultivation. Fungal species *Phialomyces macrosporus* (LBQM-01), *Trichoderma* sp. (LBQM-02) and *Penicillium* sp. (LBQM-07) were isolated from plants found in the Environmental Protection Area (APA) of Lagoas e Dunas do Abaeté, Salvador, Bahia, Brazil, and deposited in the culture collection of the Laboratório de Biotecnologia e Química de Microorganismos (LBQM). The fungus *Aspergillus niger* (ATCC-16404) was purchased from Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brazil. These microorganisms were cultivated in citrate solution containing 1.0% sodium citrate dihydrate and 0.05% citric acid for one month. After this period, small fractions of the mycelium were collected and transferred to Erlenmeyer flasks containing 25 mL of citrate-stabilized metal NPs in an appropriate molar ratio of [citrate]:[M²⁺] (that is, 0.3, 2.0, 3.7, or 7.1). Biohybrid cultures were maintained at undisturbed conditions, in the dark, at 26 °C for two months. After this period, the products were copiously washed with deionized water, dried using critical point drying, and stored in microcentrifuge tubes for further characterization.

2.3. *A. niger*/AuPd-NPs Biohybrid Synthesis. The reduction of Pd²⁺ ions over *A. niger*/Au-NPs biohybrids was made through the methodology shown by Balcha et al. with some modifications.²⁶ Initially, biohybrids cultivated in the solutions with molar ratio [citrate]:[Au³⁺] = 0.3 or 7.1 were transferred to sterilized penicillin vials (capacity 20 mL) and mixed with 1.0 mL of a 0.10 mol L⁻¹ ascorbic acid solution. Then, 1.0 mL of a 0.01 mol L⁻¹ solution of PdCl₂ and 12.5 mL of deionized water were sequentially added to get a final volume of 14.5 mL. The solutions containing the biohybrid were gently shaken by hand for 1 h while being cooled in an ice bath; then, the mixture was shaken overnight (*T* = 24.5 °C, 102 rpm). It was possible to verify the darkening of the mycelia after the period of incubation. After the reaction, palladized *A. niger*/AuPd-NPs biohybrids were rinsed and dried using critical point drying (Leica EM 030 CPD).

2.4. Characterization. The optical properties of metallic NP solutions were monitored on a RIGOL Ultra-3560 spectrophotometer. Scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray analyses (EDX) were performed in a Hitachi SU8010 microscope

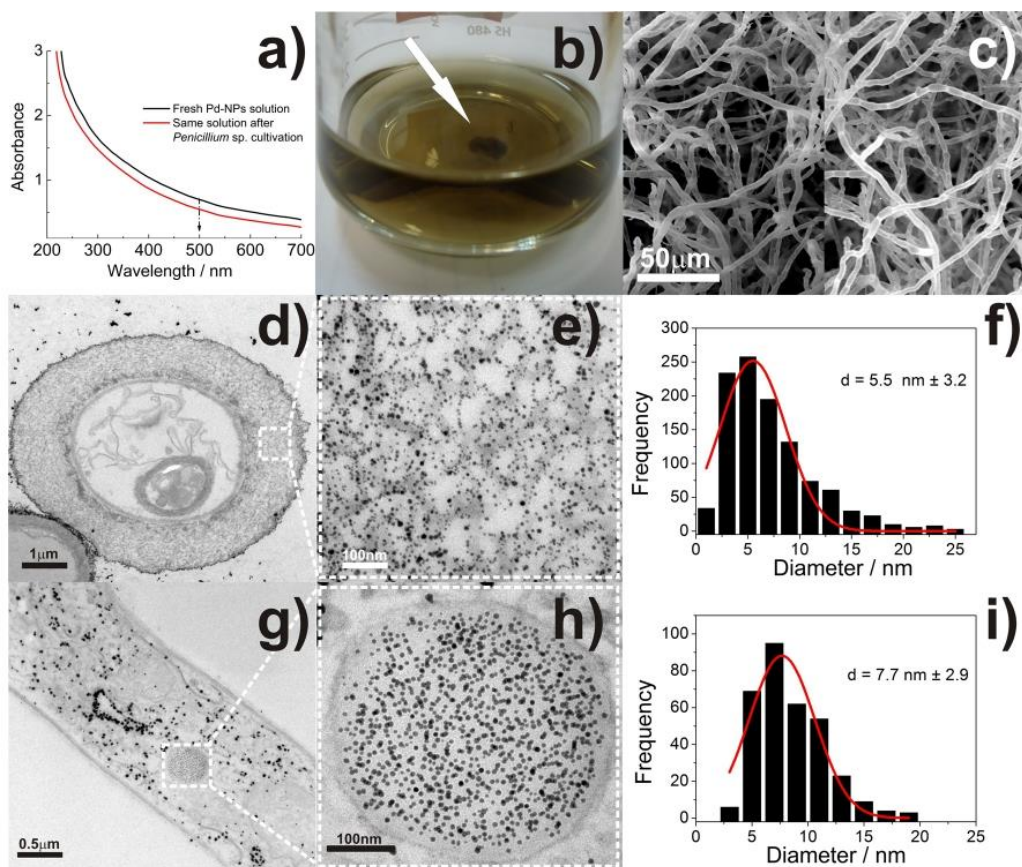


Figure 1. (a) UV–vis spectra of the same solution containing Pd-NPs before and after fungus cultivation, (b) digital image of a solution containing Pd-NPs after two months of fungal growth (mycelium is highlighted by an arrow), (c) SEM micrographs of the *P. macrosporus*/Pd-NPs biohybrid (grown in medium $[\text{citrate}]:[\text{Pd}^{2+}] = 7.1$) obtained by the secondary electron mode (left) and backscattered electron mode (right), (d, e) TEM micrographs of the transversal cross-sectioned region *P. macrosporus*/Pd-NPs biohybrids growth in a solution $[\text{citrate}]:[\text{Pd}^{2+}] = 7.1$ at (d) 20,000 \times and (e) 200,000 \times magnifications, (g, h) TEM micrographs of longitudinal cross-sectioned biohybrid *Penicillium sp.*/Pd-NPs growth in $[\text{citrate}]:[\text{Pd}^{2+}] = 2.0$ at (g) 40,000 \times and (h) 300,000 \times magnifications, and (f, i) Pd-NP size histograms for the biohybrids grown in $[\text{citrate}]:[\text{Pd}^{2+}] = 7.1$ and 2.0, respectively.

(at the WCVI Imaging Center-USask) or in a JEOL JSM 6390LV (at SME, Instituto Gonçalo Muniz-FIOCRUZ-BA). Transmission electron microscopy (TEM) analyses were done in a JEOL EM 1213 (at SME, Instituto Gonçalo Muniz-FIOCRUZ BAHIA) or in a Hitachi HT7700 (at WCVI Imaging Center-USask). All samples for TEM analysis were processed with the following fixation protocol to provide cellular contrast. Fungal biohybrids were fixed at ambient temperature with 2% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde in 0.10 mol L^{−1} sodium cacodylate buffer (SCB) at pH 7.4 for 2 h. After that, samples were rinsed three times in 0.10 mol L^{−1} SCB at pH 7.4 (10 min each time). Specimens were then placed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferrocyanide, and 5 mM calcium chloride in the same buffer for 1 h. Finally, the specimens were rinsed three times in SCB at pH 7.4, gradually dehydrated in acetone, and embedded in Poly/Bed resin. Microtome sections of fungal biohybrids were prepared in a Leica EM UC6 microtome with an average thickness of 70–80 nm and trapezoid form. Ultrathin sections were then mounted on copper EM grids with 300 mesh squares.

X-ray diffraction pattern (XRD) was recorded using a Shimadzu XRD-6000 diffractometer with Cu K α radiation ($\lambda = 1.5416 \text{ \AA}$) at 40 kV. For XPS analyses, the samples were kept in a vacuum desiccator for at least 2 days to minimize atmospheric humidity effects. The mycelial tissue was attached to the sample holder, and XPS measurements were performed on a Kratos Axis Ultra DLD

spectrometer equipped with a hemispherical electron analyzer using monochromatic Al K α X-ray radiation (1486.6 eV, 10 mA, 15 kV). The base pressure in the analysis chamber was below 1×10^{-8} Torr during analysis. Survey spectra were recorded with a pass energy of 160 at 1.0 eV per step. High-resolution spectra were recorded with a pass energy of 40 and 0.1 eV per step in the O 1s, N 1s, Pd 3d, C 1s, and Au 4d regions. The peak of C 1s at 284.8 eV was used to calibrate the binding energy scale. XPS spectra were fit using CasaXPS software version 2.3.22.

2.5. Hydrogenation Reaction. The catalytic activity of *A. niger*/AuPd-NPs biohybrids was tested in the hydrogenation reaction of 2-methyl-3-buten-2-ol. Approximately 2.0 mg of dried biomass cultivated in solutions $[\text{citrate}]:[\text{Au}^{3+}] = 7.1$ was separated to carry out this experiment. Succinctly, the catalyst was placed in a round-bottom flask containing 6.0 mL of deionized water and connected to a Schlenk line with hydrogen gas circulating at an initial pressure of 0.37 atm. Then, 0.1 mL of 2-methyl-3-buten-2-ol substrate was added. Every 30 min, 200 μL aliquots of the reaction solution were transferred by syringe to 500 μL of chloroform-*d* (CDCl_3) and analyzed by a 500 MHz Bruker Avance NMR (at SSSC-USask).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Fungi/Pd-NPs Biohybrids. A significant effort has been made in developing strategies for the immobilization of

Pd-NPs on microbial surfaces.^{27–30} There are two features of these palladized biohybrids that make them especially attractive for catalysis. First, the highly selective reactions promoted by the Pd-NPs facilitate the synthesis of important chemicals at mild conditions. The second point lies in the straightforward recovery/recycling of precious metals immobilized in environmentally friendly substrates when compared to colloidal solutions.¹⁶ There are several excellent examples available in the literature involving biohybrids made of bacterial biomass/Pd-NPs.^{31,32} In these works, individual cells (Gram-negative or -positive strains) are palladized by mixing a concentrated cell suspension and palladium ions. Pd²⁺ ions are adsorbed on the bacterial wall during the incubation period and then reduced into Pd-NPs with H₂.

In the case of fungal biohybrids formed in this paper, the mechanism of organization of nanoparticles around the cell is quite different since preformed nanoparticles are incorporated during microorganism cultivation. What is clear is that the fundamental requirement to produce these biosystems is that fungal cells must grow to accumulate abiotic nanoparticles.^{22,33} From TEM micrographs, the estimated diameter for citrate-stabilized Pd-NPs before fungal inoculation is 4.0 ± 1.2 nm (see SI, Figure S1). In our experiments, the cultivation of fungi took place in submerged culture medium containing only citrate as the carbon source. Therefore, simultaneous hyphal growth through the citrate metabolism and deposition and organization of the nanoparticles on the tubular cell are achieved.¹³

The assimilation of nanoparticles by microorganisms can be observed by attenuation in the absorbance of the colloidal solution before and after fungal cultivation. Figure 1a shows the UV–vis spectra of the as-prepared citrate-stabilized Pd-NPs and the spectrum of the same solution after cultivation of *Penicillium* sp. fungus. In contrast to colloidal Au-NP solutions, whose surface plasmon resonance band is located in the visible region, the solution of Pd-NPs displays no maxima, although it presents a curve that increases monotonically to higher energy, which is consistent with Rayleigh scattering of small colloidal NPs.³⁴ Upon arbitrarily fixing the wavelength at 500 nm, it was verified that absorbance was reduced ca. 23% after fungus growth as a consequence of the assimilation of nanoparticles by the microorganisms. The development of fungal species in solutions containing Pd-NPs is, however, minimal, with low development of mycelial mass, as can be observed by the naked eye in Figure 1b. Morphologically, fungal/metal NPs biohybrids consist of long branched tubular hyphae (Figure 1c), protected by the cell wall, whose framework is still under investigation.^{35,36}

The metal content in the biohybrids was estimated by semiquantitative energy-dispersive X-ray (EDX) analysis and revealed a low affinity of the fungi for the Pd-NPs (Table S1 and Figure S2). A comparison of the fungi *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., and *Phialomyces macrosporus*, grown under similar conditions in solutions of Au-NPs and Pd-NPs, shows that the content of metallic Au can be up to 30 times greater than Pd in the biohybrids. Pd-NPs have been noted to be toxic to microorganisms and cells, affecting some vital functions, reducing the viability, and limiting the lifecycle.^{37–39} For instance, Adams and co-workers investigated the development of bacterial cultures of *E. coli* and *S. aureus* in the presence of Pd-NPs with a well-defined particle size.²⁰ It was observed that nanoparticles with an average size of 2.0 nm exhibit greater toxic effects on bacterial cultures with an

inhibitory growth effect at the concentration of Pd-NPs as low as 10^{-9} mol L⁻¹. On the other hand, the exposition of filamentous fungi species *A. niger* and *C. albicans* to the Pd-NPs led to damage to their cell wall and oxidative stress generation on the cells.⁴⁰ We assume, therefore, that the low micellar development and low affinity for Pd-NPs may be due to the toxic effects of Pd-NPs on the fungal cells.

Figure 1d,e,h,i presents TEM images of two filamentous fungi species, i.e., *P. macrosporus* and *Penicillium* sp., cultured in solutions containing merely citrate-stabilized Pd-NPs. The analysis of these images shows the evident effect on the microbial structure of the assembly of Pd-NPs during cell development. Specifically, Figure 1d presents a transversal cross-sectioned *P. macrosporus*/Pd-NPs micrograph. It was noted that metal NPs are accumulated only on the fungal cell wall, remaining isolated from NPs in the cytoplasmic region. A higher-magnification TEM micrograph (Figure 1e) reveals that roughly spherical Pd-NPs are relatively well-separated from each other and present a particle size distribution falling in the range 2–25 nm with an average size of 5.5 ± 3.2 nm (Figure 1f). The fungal cell wall has pivotal protecting properties, acting as a barrier to separate the inner cell from the external medium. Although cell walls differ widely from each microorganism in terms of composition, biochemistry, and functioning, there is a common foundation for filamentous fungi composed of chitin, β -1,3-glucan, and glycoproteins.^{35,41} At this point, it should be emphasized that the organization of NPs into ordered superstructures around the fungal cell occurs due to specific interactions between NPs and the cross-linked polysaccharides and proteins of the cell wall. Although small biomolecules are frequently employed to cap NPs in solutions through electrostatic stabilization,^{42,43} the biopolymer constituents of the cell wall can act as steric stabilizers that inhibit aggregation of metal NPs.

We and other groups have examined numerous examples of the deposition of different classes of NPs on the fungal wall envelope.^{11,13,22,44–47} However, it came as a surprise from the TEM analyses that the biohybrid *Penicillium* sp./Pd-NPs showed the presence of the nanoparticles inside the fungal cell (Figure 1g,h). The observation of isolated hyphae demonstrated that nanoparticles are internalized by the microorganism forming large agglomerates of Pd-NPs in the cytosol with sizes spanning from 7.0 to 60.0 nm with an average size of 7.7 ± 2.9 nm (see Figure S3 in the SI for more detailed images). Because these Pd-NP agglomerates observed in the cytosol are larger than individual NPs, we assumed that the accretion process occurred after the permeation of the NPs through the cell membrane. More distinctive details were observed in the fungal organelle, probably a vacuole, observed in Figure 1h. Considering that vacuoles have critical cellular functions such as a reservoir and cytoplasm decontaminant by sequestering toxic substances,⁴⁸ these organelles may accumulate nanoparticles with a narrow size distribution. Analyzing other parts of the sample, we were able to confirm internalized Pd-NPs in the vacuole, as well as particles located at the cell wall interface and cytoplasm (Figure S4 in SI). A comparison with TEM micrographs of *Penicillium* sp., grown in a solution containing only citrate ions as a carbon source (i.e., in the absence of Pd-NPs), shows the structural aspects of subcellular components not affected by nanoparticles, including the presence of clearly discernible vesicles (Figure S5 in SI). It is worth mentioning that the internalization of Pd-NPs is an intrinsic characteristic of this *Penicillium* sp. fungus (LBQM-

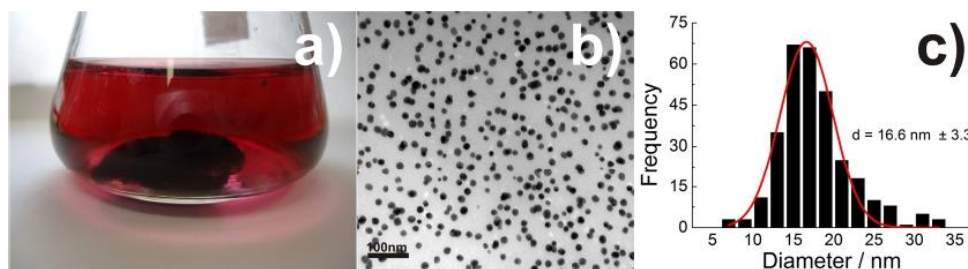


Figure 2. (a) Digital image of a solution containing Au-NPs after two months of fungal cultivation. The mycelium can be observed at the bottom of the Erlenmeyer. (b) TEM micrograph and (c) particle size histogram of thin-section of Au-NPs embedded at the fungal cell wall.

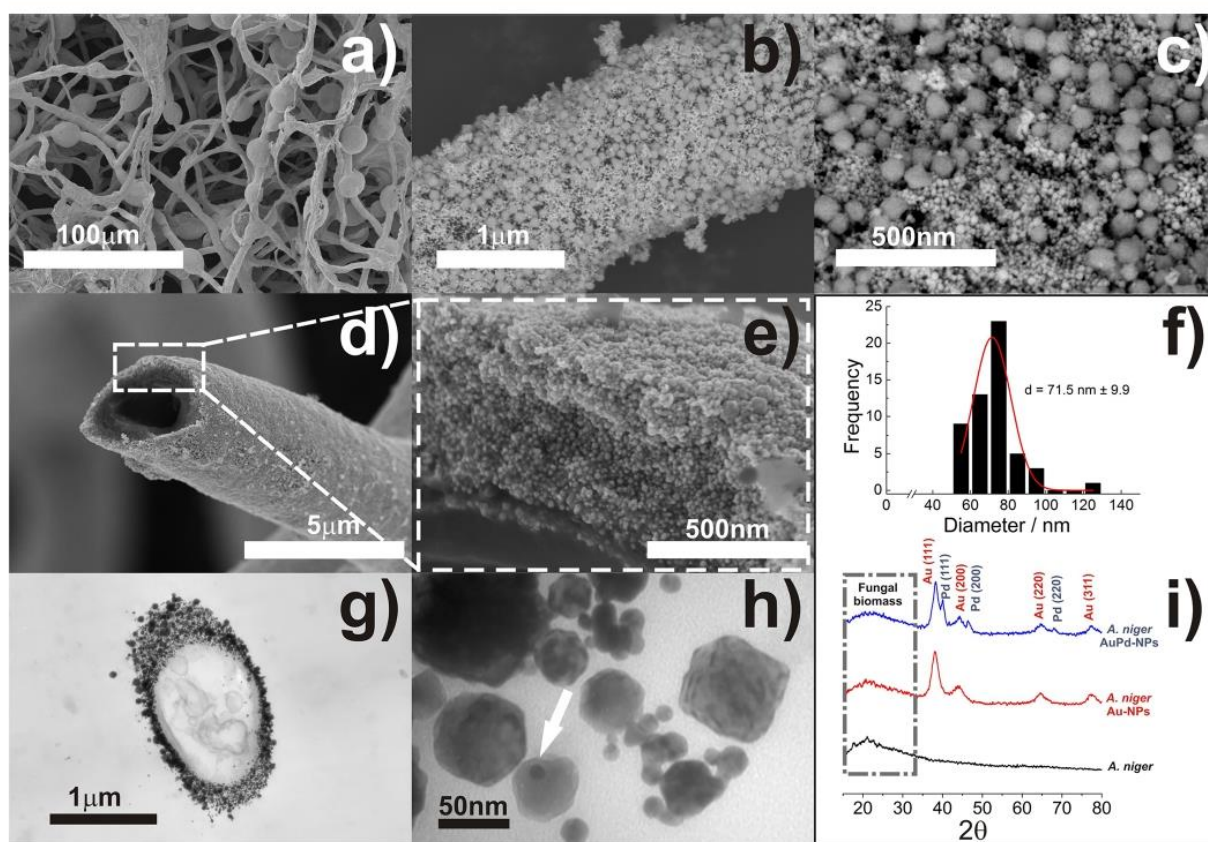


Figure 3. SEM micrographs of palladized fungus/AuPd-NPs biohybrids. (a) Low-magnification *P. macrosporus*/AuPd-NPs micrograph obtained in secondary electron mode. (b, c) Images of an isolated hypha were obtained using the backscattering mode. (d, e) Micrographs of a broken hypha obtained in secondary electron mode. (f) Size distribution for AuPd-NPs as obtained by SEM. (g, h) TEM micrographs of *A. niger*/AuPd-NPs. (i) XRD pattern of *A. niger*, *A. niger*/Au-NPs and palladized *A. niger*/AuPd-NPs.

07) isolated from plants from the Environmental Protection Area (APA) of Lagoas e Dunas do Abaeté. In other words, it is likely that other species of filamentous fungi, even belonging to the genus *Penicillium*, do not have the capacity to accumulate Pd-NPs in the cytosol. Therefore, the observation of metal NPs concentrated inside living cells allows us to envisage *in vivo* catalytic applications, where NPs-Pd may also participate in biochemical transformations in conjunction with cellular enzymatic machinery.^{49,50}

We hypothesize that the small size of Pd-NPs is crucial to the cell wall trafficking of such NPs to the inner of *Penicillium* sp. fungus. Control experiments cultivating the same fungal

species in colloidal solution containing larger Au-NPs (around 17 nm) revealed that an accumulation of NPs occurs only on the fungal wall (see SI, Figure S6). Previous studies by Rispaill and collaborators have shown that CdSe quantum dots (diameter of 3.6–4.5 nm) are also internalized in the *Fusarium oxysporum* fungus while larger SiO₂ nanoparticles (diameter of 100–150 nm) are accumulated on the cell wall.²⁵ Additionally, because *P. macrosporus* has a thick, melanized cell wall (i.e., it has pigmented hyphae), we speculate that the fungal wall effectively blocks the uptake of Pd-NPs, accumulating them in the cell wall.

The internalization of preformed nanomaterials/nanoparticles by filamentous fungi is a complex behavior that has still not been completely elucidated. Although the approach based on biological synthesis allows the observation of nanomaterials in the inner parts of the cells, following nanoparticles from the external media to the cytosol is rarer. For example, Mukherjee et al. reported the presence of Ag-NPs and Au-NPs at the intracellular/surface regions after the reduction of metal precursors by filamentous fungi of the *Verticillium* genus.^{51,52} In previous work, we showed that lanthanide metal–organic frameworks (Ln-MOFs) could also be internalized and concentrated at the fungal vacuoles, which allowed easy visualization of these organelles using fluorescence microscopy.²² In the case of luminescent quantum dots, Whiteside et al.²³ and Rispaal et al.²⁵ confirmed that inorganic NPs with a smaller diameter of ca. 15 nm are internalized during hypha growth. Presumably, the factors that govern the uptake of nanoparticles may be an incidental process regulated by a size exclusion limit of the fungal cell wall. That is, during the acquisition, transport, and assimilation of nutrients from the environment, nanoparticles are also incidentally transported into the fungal cells when their size is smaller than a critical value.

3.2. Fungi/AuPd-NPs. Due to the inherent toxicity of Pd-NPs which inhibit the development of fungal species, our group developed a new synthetic procedure to palladize the surface of the microorganisms in order to overcome the apparent limitation in how many Pd-NPs can be incorporated into the fungal species. From a set of previous experiments performed in our laboratories regarding the restriction of Pd deposition directly on the bare fungal cells and the low assimilation of core–shell Au–Pd nanoparticles by the microorganism, we adopted the strategy to obtain bimetallic AuPd-NPs through deposition of Pd⁰ on fungus/Au-NPs biohybrids. That is, after culturing fungi in a solution containing Au-NPs, the mycelial tissue was subsequently immersed in a solution containing Pd²⁺ ions and ascorbic acid, which promotes the reduction of Pd on preferred metallic sites of the hyphal cell. Therefore, the palladization process of the fungal surface can be visualized as the deposition of Pd⁰ on Au-NPs that act as “seeds” for crystal growth through reduction by ascorbic acid.

Initially, filamentous microorganisms were cultivated in a solution containing citrate-stabilized Au-NPs for two months. As can be exemplified in Figure 2a, microorganisms grow exceptionally well in solutions containing Au-NPs due to the nontoxic nature of the Au.^{53,54} TEM micrograph of a thin-section of Au-NPs located at the cell wall of the *P. macrosporus* biohybrid revealed that nanoparticles have an average diameter of 16.6 ± 3.3 nm (Figure 2b,c). These TEM experiments show that similar stabilization of Au-NPs on the fungal wall occurs through the encapsulation of such particles in the inner cell wall. That means that the components of the fungal wall interact strongly with the NPs, preventing aggregation of the Au-NPs. Subsequently, the fungi/Au-NPs biohybrids were transferred to a solution containing PdCl₂ and ascorbic acid. The innocuous ascorbic acid reduces Pd²⁺ ions to Pd⁰, and deposition of Pd atoms preferentially occurs over Au-NPs.^{26,55} After 24 h, the palladization reaction took place, and the mycelium color changes from red to dark brown. Finally, the biohybrids were copiously rinsed with deionized water to guarantee that only firmly bound NPs remained attached to the cells.

Figure 3 shows scanning electron micrographs of critical point-dried fungal biohybrids after exposure to Pd²⁺ solution and ascorbic acid. Due to the high metallic content embedded on the cell wall, no previous treatment (i.e., deposition of a conductive layer) was required to perform SEM analysis. As can be seen in Figure 3a, the tubular nature of the hyphae and the interconnected 3D network of micellar tissue was preserved after palladization. As a general rule, the surface of the biohybrids is quite rough due to the assimilation of metallic nanoparticles by the microorganisms. SEM micrographs at higher magnification using the backscattering mode (see Figure 3b,c) enabled visualization of two types of nanoparticles that differ in size. We assigned the smaller nanoparticles as Au-NPs, which is consistent with TEM studies of fungus/Au-NPs, as previously mentioned in Figure 2b. Also, Au-NPs appear brighter than AuPd-NPs in the micrographs due to the difference in atomic number between these two metal species (Au ($Z = 79$) and Pd ($Z = 46$)). Thus, larger nanoparticles were assigned to Pd deposited preferentially over Au-NPs, forming a mixed layer of AuPd-NPs on the outermost surface of the biohybrids.

Other features can be assessed by SEM selecting different biohybrid regions. For example, Figure 3d,e presents the structure of a broken hypha showing in detail the arrangement of NPs. This “cross-section” analyses permit us to infer that the cell wall of the biohybrids is composed of two parts: a thin palladized surface constituted by mixed AuPd-NPs and a thicker inner region formed by a nanocomposite of Au-NPs embedded on biopolymers of the cell wall. On the basis of the SEM micrographs, the particle size of AuPd-NPs was estimated to be $ca. 71.5 \pm 9.9$ nm, i.e., approximately 6× larger than Au-NPs (Figure 3f).

Figure 3g,h shows a typical thin-section of TEM micrographs of a fungus/AuPd-NPs. Since biopolymers of the cell wall are constituted by light elements that do not absorb or scatter electrons, the images are dominated by NP assemblies. TEM analyses confirm that the deposition of Pd occurs essentially on the fungal surface. The complex matrix of polysaccharides and protein biopolymers probably does not allow the diffusion of Pd²⁺ ions deeply into the inner cell wall.^{36,56} It is worth mentioning that it is difficult to confirm the Au–Pd core–shell structure directly by phase contrasts of a conventional TEM because the Pd layer is very thick. However, in selected regions, it is possible to observe nonuniform core–shell structures, as indicated by the arrow in Figure 3h. The crystal structure of the *A. niger*/AuPd-NPs was also investigated by X-ray powder diffraction (XRD) and compared to that of the *A. niger*/Au-NPs biohybrid and bare *A. niger* biomass diffractograms (Figure 3i). The XRD pattern confirms that the metallic components have the fcc structure. That is, both Au and Pd peaks are observed, in accordance with pure fcc-structured Au (JCPDS card 04-0784) and Pd (JCPDS card 46-1043). These results strongly suggest the presence of both metals as separate phases (i.e., not alloyed) and the formation of the Au@Pd core–shell nanostructures on the fungal surface.

The investigation of the surface composition of the fungal/AuPd-NPs was further examined through X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Although there are many proposals about how NPs are bound to the cell wall of filamentous fungi, so far, to the best of our knowledge, there are no studies in the literature that describe in detail the chemical state of the abiotic components that decorate these microorgan-

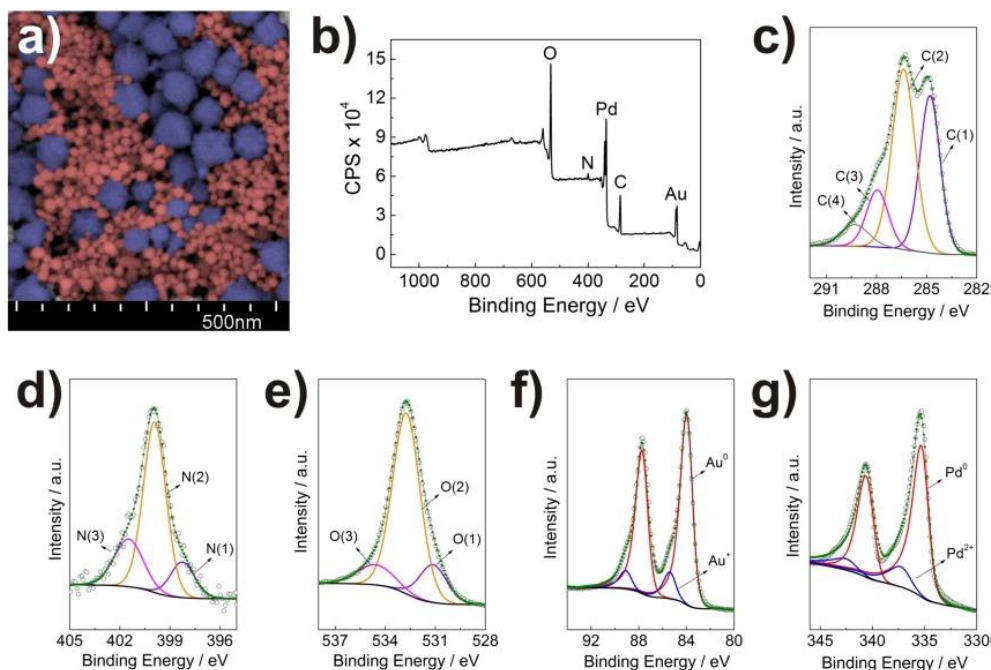


Figure 4. (a) Colored high-magnification SEM micrograph of a typical palladized biohybrid surface. Red nanoparticles correspond to Au-NPs while blue ones correspond to Pd-NPs (both types are represented by false colors). (b) Survey XPS spectrum of critical point drying *A. niger*/AuPd-NPs biohybrids originally cultivated in solution [citrate]:[Au³⁺] = 7.1. High-resolution XPS spectra and curve fitting of (c) carbon, (d) nitrogen, (e) oxygen, (f) gold, and (g) palladium. Open circles represent the CPS signal while the green line is the fitting envelope.

isms.^{9,13,14,46} Figure 4a shows a false-colored SEM image that emphasizes the difference between the Au (red) and AuPd (blue) nanoparticles found on the outermost microbial surface of the *A. niger* fungus. As the XPS analysis has a penetration depth of 4–5 nm,⁵⁷ the surface is precisely analyzed by this spectroscopic technique. Table 1 presents the surface composition of *A. niger*/AuPd-NPs cultivated in ratio solution

Table 1. Surface Chemical Composition of Palladized *A. niger*/AuPd-NPs (Cultivated in Solution [citrate]:[Au³⁺] = 7.1), as Obtained by High-Resolution XPS Spectra

element region	suggested attributions	binding energy (eV)	atom %	total atom (%)
Au 4f doublets	Au ⁰	83.9–87.7	3.2	3.6
	Au ⁺ (Au–O)	85.3–89.0	0.4	
Pd 3d doublets	Pd ⁰	335.2–340.5	6.8	8.2
	Pd ²⁺	337.1–342.4	1.4	
C 1s	C–H, C–C	284.8 (C1)	17.5	49.8
	C–N	286.4 (C2)	22.4	
	C=O, COO–Au	288.0 (C3)	6.7	
	O=C–OH, N–C=O	289.3 (C4)	3.2	
N 1s	N–C=O	398.3 (N1)	0.5	3.2
	N–H	399.9 (N2)	2.0	
	–NH ⁺	401.5 (N3)	0.7	
O 1s	O=C, metal oxide	531.2 (O1)	5.4	35.2
	C–OH, C–O–C–O–C	532.7 (O2)	25.9	
	O=C–OH	534.6 (O3)	3.9	
				100

[citrate]:[Au] = 7.1 in terms of relative atomic concentration (%) and binding energies (BEs). As expected for the biohybrid structures, the main chemical constituents of the outermost fungal surface were carbon, oxygen, nitrogen, Au, and Pd, as can be observed by the survey spectrum in Figure 4b. The main components of the biological part, i.e., C, O, and N, presented atomic concentrations of 49.8%, 35.2%, and 3.20%, respectively. The metal concentrations of Au and Pd were 3.6% and 8.2%, respectively.

The XPS peaks of these elements were analyzed at high resolution, and their deconvolution permitted access to the contribution from each component in different chemical states. In the region of the BE of C 1s, the deconvoluted spectrum consists of four distinct peaks, represented by C1, C2, C3, and C4. The lower binding energy was assigned to carbon (C1) bonded with carbon or hydrogen (C–C and C–H) at 284.8 eV.^{58,59} The binding energy located at 286.4 eV was associated with carbon (C2) bonded with nitrogen (C–N) or bonded with oxygen (C–OH) attributed to amine, amide, or alcohol.^{59,60} At 287.9 eV, the binding energy was attributed to the carbonyl (C=O) and coordinated carboxylate (COO–Au) species (C3).^{58,61} The C4 component at 289.3 eV was attributed to carbon bonded to electronegative atoms in the carboxylate group (O=C–OH).⁵⁸ The N 1s spectrum was fit by three peaks assigned to unprotonated amide or amine groups (with BEs at 398.3 and 399.9 eV, respectively) and protonated amine groups (at 401.5 eV).^{57,62} The deconvolution of the O 1s level generated three main components (O1, O2, and O3): The O1 at 531.2 eV was attributed to oxygen making a double bond with carbon (O=C) and the oxygen related to the metal oxide species (most likely PdO_x).^{60,63} The second one (O2) was associated with a hydroxyl group bonded

to carbon (C–OH), acetal, and Au–O species at 532.7 eV.^{57,58} Finally, the O3 component with the binding energy at 534.6 eV was attributed to the hydroxyl group of the carboxylic acid (O=C–OH).⁵⁸

The significant new findings on palladized fungal biohybrids were the observation of variable oxidation states for the Au and AuPd nanoparticles (Figure 4f,g). In addition to the already expected zerovalent states of Au and Pd, the deconvolution of the high-resolution metal spectra revealed minor contributions of the chemical states at higher binding energies such as Au⁺ and Pd²⁺ species. The Au spectrum is recognized by a Au 4f_{7/2} and Au 4f_{5/2} doublet. The contribution to Au⁰ was found at 83.9 and 87.71 eV for Au 4f_{7/2} and Au 4f_{5/2}, respectively. Additionally, one additional doublet is necessary to fit the envelope curve: a Au⁺ species characterized by Au 4f_{7/2} and Au 4f_{5/2} peaks at 85.3 and 89.0 eV, respectively. We ruled out the presence of ionic Au³⁺ species embedded in the polymeric matrix because the BE for this specific chemical state is higher than observed in our results.^{64,65} The presence of oxidized Au (for instance, on Au–O species) suggests that the encapsulation of the Au-NPs by the components of the cell wall produces charged states of Au atoms. In other words, we speculate that Au surface atoms may donate electrons to functional groups of the biopolymeric cell wall during the process of fungal growth and assembly of NPs. For example, the carboxylic group –COO, quite common in the composition of the cell wall, may accept electrons and thus may establishing a coordination bond with Au.^{66,67} This effect has already been observed for Pt nanoparticles >25 nm in size, where the charge transfer occurs from Pt metal to the polymer side chain of polyvinylpyrrolidone (PVP).⁶⁸ Our results showed that the atomic ratio Au⁺/Au⁰ = 0.4/3.2 = 0.13, and approximately 10% of the Au surface atoms are in the oxidized form for this sample. Although we bear in mind that the analysis by XPS is restricted to the outermost layer, these results show a strong interaction between Au-NPs and the cell wall, and therefore, a larger fraction of Au atoms can be expected to be in the oxidized form in nanoparticles localized in the inner part of the microbial cell wall.

Unlike Au-NPs which are stabilized by cell wall biopolymers, Pd nanoparticles at the surface of biohybrids are permanently exposed to air. The chemical state of Pd-NPs was evaluated from high-resolution spectra of the Pd 3d_{5/2} and Pd 3d_{3/2} doublet region, and the deconvolution of the envelope curve revealed two components. The assignment of these constituents was based on tabulated data collected in ref 63 and indicated the presence of zerovalent Pd with BE at 335.2 eV (Pd 3d_{5/2}) and 340.5 eV (Pd 3d_{3/2}). Another doublet at higher BE was assigned as Pd²⁺ with Pd 3d_{5/2} at 337.1 eV and Pd 3d_{3/2} at 342.4 eV. The significant feature in the Pd 3d spectrum is the distribution of the atomic concentration between two Pd species detected in the biohybrids: Pd⁰ comprises 82.9% of the total Pd atoms while Pd²⁺ comprises 17.1%. Chen and colleagues performed the deconvolution of the Pd 3d_{5/2} peak for Pd nanoparticles deposited on highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) and noted three components.⁶⁹ The authors attributed the following chemical species, in terms of increasing the binding energy, to the zerovalent Pd located on both the surface (Pd1), and in the bulk (Pd2), and also in the form of an oxide (Pd3). The distinction between Pd1 and Pd2 is attributed to a different electronic configuration in small metallic clusters for the atoms located at the surface and bulk. We believe that this description

cannot be applied to our system. AuPd-NPs are anchored in a very complex biological substrate, and they are much larger (~70 nm) than those reported by Chen and co-workers.⁶⁹ Therefore, AuPd-NPs that decorate filamentous fungi must behave as bulk material.⁷⁰ On the basis of XPS results, we may conclude that there is a formation of a thin layer of PdO over AuPd-NPs because they are most exposed to the atmosphere environment.⁷¹

Since fungal biohybrids are rich in Pd distributed over all the fungal surface, they were tested as catalysts for hydrogenation reactions.^{72,73} The catalytic hydrogenation of allyl alcohols using Pd-NPs has been shown to be a relevant research topic, because they are important precursors in the area fine chemistry and pharmaceutical industry.⁷⁴ For example, Ma and Semagina demonstrated that monodisperse Pd nanocubes of 20 nm rib length and Pd nanospheres of 3.0 nm diameter exhibit distinct catalytic activities for hydrogenation of 2-methyl-3-buten-2-ol.⁷⁵ The authors showed that turnover frequencies calculated per all surface atoms are 2.58 s^{−1} for the cubes and 3.86 s^{−1} for the spheres at 313 K, confirming a reaction structure sensitivity.

We have previously shown that AuPd core–shell nanoparticles are effective in hydrogenation reactions at room temperature.^{26,76} Thus, fungal/noble metal nanoparticles may be appropriate biosystems to catalyze organic reactions in aqueous solutions that occur at environmental conditions. From Figure 5, it is possible to observe the catalytic conversion

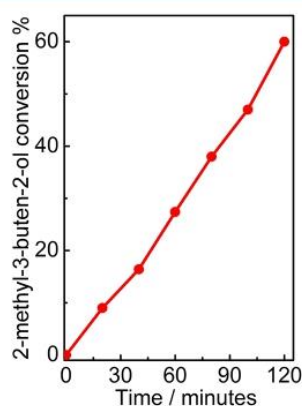


Figure 5. Time course of 2-methyl-3-buten-2-ol hydrogenation catalyzed by *A. niger*/AuPd-NPs biohybrids.

of 2-methyl-3-buten-2-ol substrate to 2-methyl-butan-2-ol using an economically important fungus, *Aspergillus niger*, cultured in solutions with [citrate]:[Au³⁺] = 7.1. This test showed that after 120 min almost 60% of the substrate was transformed into the product. Therefore, we can conclude that palladized biohybrids have catalytically active sites on the surface and can be an attractive alternative to promote hydrogenation reactions in allyl alcohols.

4. CONCLUSIONS

In summary, this work presented two biosystems based on the integration of Pd-NPs on the structure of filamentous fungi. In the first case, microorganisms cultivated in solutions containing Pd-NPs (~4.0 nm diameter) show low micellar development and low affinity for the metallic nanoparticles due to the toxic effects of palladium on the fungal cells. TEM studies of the

Phialomyces macrosporus fungus revealed that nanoparticles are accumulated on the cell wall (~5.5 nm diameter), keeping the cytoplasm isolated from abiotic particles. However, *Penicillium* sp. showed an unexpected internalization of Pd-NPs in the fungal cytosol, becoming a promising biosystem to further studies of *in vivo* catalytic reactions. The second biosystem was obtained through sequential reduction of Pd²⁺ ions over previously harvested fungus/Au-NP composites. The deposition of Pd⁰ over the fungal surface produced biohybrids with a combination of Au and Pd in the NPs. XPS analyses also revealed other chemical species such as Au⁺ and Pd²⁺ on the outermost wall of microorganisms. Finally, *A. niger*/AuPd-NP biohybrids proved to be catalytically active in the 2-methyl-3-buten-2-ol hydrogenation reaction.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.1c02023>.

Complementary TEM micrographs and EDX analysis (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Robert W. J. Scott — Department of Chemistry, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan S7N 5C9, Canada; orcid.org/0000-0003-2155-7652; Email: robert.scott@usask.ca

Marcos Malta — Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil; orcid.org/0000-0002-9580-1032; Email: marcosmalta@ufba.br

Authors

Adriana M. Fontes — Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil

Camila Oliveira — Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil

Pascal Bargiela — Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil

Maria da G. C. da Rocha — Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil

Regina Geris — Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil

Antonio F. da Silva — Institute of Physics, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil

Mahesh K. Gangishetty — Department of Chemistry, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan S7N 5C9, Canada; Department of Chemistry and Physics, Mississippi State University, Mississippi 39762, United States

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.1c02023>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the CNPq/Fapesb (Pronem PNE0012/2011 and Pronex PNX0007/2011) for financial support. A.M.F. thanks the Coordination for the Improvement of Higher-Level Personnel—CAPES for a scholarship (doctoral sandwich grant, PDSE 99999.009761/2014-04). R.W.J.S. acknowledges financial support from the National Sciences

and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. We would like to thank the technical staff of the Instituto Gonçalo Moniz—Fiocruz/BA for the support with the characterizations during the execution of this work.

■ REFERENCES

- (1) Fakhrullin, R. F.; Zamaleeva, A. I.; Minullina, R. T.; Konnova, S. A.; Paunov, V. N. Cyborg cells: functionalisation of living cells with polymers and nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (11), 4189–4206.
- (2) Fakhrullin, R. F.; Lvov, Y. M. Face-Lifting and “Make-Up” for Microorganisms: Layer-by-Layer Polyelectrolyte Nanocoating. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 4557–4564.
- (3) Geng, W.; Wang, L.; Jiang, N.; Cao, J.; Xiao, Y. X.; Wei, H.; Yetisen, A. K.; Yang, X. Y.; Su, B. L. Single cells in nanoshells for the functionalization of living cells. *Nanoscale* **2018**, *10* (7), 3112–3129.
- (4) Berry, V.; Saraf, R. F. Self-assembly of nanoparticles on live bacterium: An avenue to fabricate electronic devices. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44* (41), 6668–6673.
- (5) Wang, B.; Liu, P.; Jiang, W. G.; Pan, H. H.; Xu, X. R.; Tang, R. K. Yeast cells with an artificial mineral shell: Protection and modification of living cells by biomimetic mineralization. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47* (19), 3560–3564.
- (6) Minullina, R. T.; Osin, Y. N.; Ishmukhametova, D. G.; Fakhrullin, R. F. Interfacing Multicellular Organisms with Polyelectrolyte Shells and Nanoparticles: A *Caenorhabditis elegans* Study. *Langmuir* **2011**, *27* (12), 7708–7713.
- (7) Konnova, S. A.; Lvov, Y. M.; Fakhrullin, R. F. Nanoshell Assembly for Magnet-Responsive Oil-Degrading Bacteria. *Langmuir* **2016**, *32* (47), 12552–12558.
- (8) Fakhrullin, R. F.; Zamaleeva, A. I.; Morozov, M. V.; Tazetdinova, D. I.; Alimova, F. K.; Hilmudtinov, A. K.; Zhdanov, R. I.; Kahraman, M.; Culha, M. Living Fungi Cells Encapsulated in Polyelectrolyte Shells Doped with Metal Nanoparticles. *Langmuir* **2009**, *25* (8), 4628–4634.
- (9) Sugunan, A.; Melin, P.; Schnurer, J.; Hilborn, J. G.; Dutta, J. Nutrition-driven assembly of colloidal nanoparticles: Growing fungi assemble gold nanoparticles as microwires. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (1), 77–81.
- (10) Sharma, S.; Srivastava, S. Gold microwires based amperometric biosensor exploiting microbial architecture. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 174–179.
- (11) Kubo, A. M.; Gorup, L. F.; Amaral, L. S.; Filho, E. R.; Camargo, E. R. Kinetic Control of Microtubule Morphology Obtained by Assembling Gold Nanoparticles on Living Fungal Biotemplates. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (10), 2337–2345.
- (12) Sabah, A.; Kumar, P.; Mohammed, W. S.; Dutta, J. Visible-Light-Induced Directed Gold Microwires by Self-Organization of Nanoparticles on *Aspergillus niger*. *Particle & Particle Systems Characterization* **2013**, *30* (5), 473–480.
- (13) Fontes, A. M.; Geris, R.; dos Santos, A. V.; Pereira, M. G.; Ramalho, J. G. S.; da Silva, A. F.; Malta, M. Bio-inspired gold microtubes based on the morphology of filamentous fungi. *Biomater. Sci.* **2014**, *2* (7), 956–960.
- (14) Bigall, N. C.; Reitzig, M.; Naumann, W.; Simon, P.; van Pee, K. H.; Eychmüller, A. Fungal templates for noble-metal nanoparticles and their application in catalysis. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47* (41), 7876–7879.
- (15) Kubo, A.; Gorup, L.; Toffano, L.; Amaral, L.; Rodrigues-Filho, E.; Mohan, H.; Aroca, R.; Camargo, E. Nanostructured Assemblies of Gold and Silver Nanoparticles for Plasmon Enhanced Spectroscopy Using Living Biotemplates. *Colloids and Interfaces* **2017**, *1* (1), 4.
- (16) Bigall, N. C.; Eychmüller, A. Synthesis of noble metal nanoparticles and their non-ordered superstructures. *Philos. Trans. R. Soc., A* **2010**, *368* (1915), 1385–1404.
- (17) Chinchilla, R.; Najera, C. Recent advances in Sonogashira reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (10), S084–S121.

- (18) Moreno-Manas, M.; Pleixats, R. Formation of carbon-carbon bonds under catalysis by transition-metal nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (8), 638–643.
- (19) Ogasawara, S.; Kato, S. Palladium Nanoparticles Captured in Microporous Polymers: A Tailor-Made Catalyst for Heterogeneous Carbon Cross-Coupling Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (13), 4608–4613.
- (20) Adams, C. P.; Walker, K. A.; Obare, S. O.; Docherty, K. M. Size-Dependent Antimicrobial Effects of Novel Palladium Nanoparticles. *PLoS One* **2014**, *9* (1), e85981.
- (21) Iavicoli, I.; Farina, M.; Fontana, L.; Lucchetti, D.; Leso, V.; Fanali, C.; Cufino, V.; Boninsegna, A.; Leopold, K.; Schindl, R.; Brucker, D.; Sgambato, A. In vitro evaluation of the potential toxic effects of palladium nanoparticles on fibroblasts and lung epithelial cells. *Toxicol. In Vitro* **2017**, *42*, 191–199.
- (22) Rosario, J.; da Luz, L. L.; Geris, R.; Ramalho, J. G. S.; da Silva, A. F.; Junior, S. A.; Malta, M. Photoluminescent organisms: how to make fungi glow through biointegration with lanthanide metal-organic frameworks. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7302.
- (23) Whiteside, M. D.; Treseder, K. K.; Atsatt, P. R. The brighter side of soils: Quantum dots track organic nitrogen through fungi and plants. *Ecology* **2009**, *90* (1), 100–108.
- (24) Whiteside, M. D.; Digman, M. A.; Gratton, E.; Treseder, K. K. Organic nitrogen uptake by arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal forest. *Soil Biol. Biochem.* **2012**, *55*, 7–13.
- (25) Risipail, N.; De Matteis, L.; Santos, R.; Miguel, A. S.; Custardoy, L.; Testillano, P. S.; Risueno, M. C.; Perez-De-Luque, A.; Maycock, C.; Fevriere, P.; Oliva, A.; Fernandez-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; de la Fuente, J. M.; Marquina, C.; Rubiales, D.; Prats, E. Quantum Dot and Superparamagnetic Nanoparticle Interaction with Pathogenic Fungi: Internalization and Toxicity Profile. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (12), 9100–9110.
- (26) Balcha, T.; Strobl, J. R.; Fowler, C.; Dash, P.; Scott, R. W. J. Selective Aerobic Oxidation of Crotyl Alcohol Using AuPd Core-Shell Nanoparticles. *ACS Catal.* **2011**, *1* (5), 425–436.
- (27) Bunge, M.; Sobjerg, L. S.; Rotaru, A. E.; Gauthier, D.; Lindhardt, A. T.; Hause, G.; Finster, K.; Kingshott, P.; Skrydstrup, T.; Meyer, R. L. Formation of Palladium(0) Nanoparticles at Microbial Surfaces. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107* (2), 206–215.
- (28) Redwood, M. D.; Deplanche, K.; Baxter-Plant, V. S.; Macaskie, L. E. Biomass-supported palladium catalysts on *Desulfovibrio desulfuricans* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99* (5), 1045–1054.
- (29) Bennett, J. A.; Creamer, N. J.; Deplanche, K.; Macaskie, L. E.; Shannon, I. J.; Wood, J. Palladium supported on bacterial biomass as a novel heterogeneous catalyst: A comparison of Pd/Al₂O₃ and bio-Pd in the hydrogenation of 2-pentyne. *Chem. Eng. Sci.* **2010**, *65* (1), 282–290.
- (30) Hou, Y. N.; Zhang, B.; Yun, H.; Yang, Z. N.; Han, J. L.; Zhou, J. Z.; Wang, A. J.; Cheng, H. Y. Palladized cells as suspension catalyst and electrochemical catalyst for reductively degrading aromatics contaminants: Roles of Pd size and distribution. *Water Res.* **2017**, *125*, 288–297.
- (31) Deplanche, K.; Bennett, J. A.; Mikheenko, I. P.; Omajali, J.; Wells, A. S.; Meadows, R. E.; Wood, J.; Macaskie, L. E. Catalytic activity of biomass-supported Pd nanoparticles: Influence of the biological component in catalytic efficacy and potential application in 'green' synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals. *Appl. Catal., B* **2014**, *147*, 651–665.
- (32) Bennett, J. A.; Mikheenko, I. P.; Deplanche, K.; Shannon, I. J.; Wood, J.; Macaskie, L. E. Nanoparticles of palladium supported on bacterial biomass: New re-usable heterogeneous catalyst with comparable activity to homogeneous colloidal Pd in the Heck reaction. *Appl. Catal., B* **2013**, *140*, 700–707.
- (33) Li, Z.; Chung, S. W.; Nam, J. M.; Ginger, D. S.; Mirkin, C. A. Living templates for the hierarchical assembly of gold nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42* (20), 2306–2309.
- (34) Scott, R. W. J.; Ye, H. C.; Henriquez, R. R.; Crooks, R. M. Synthesis, characterization, and stability of dendrimer-encapsulated palladium nanoparticles. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (20), 3873–3878.
- (35) Bowman, S. M.; Free, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* **2006**, *28* (8), 799–808.
- (36) Latge, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **2007**, *66* (2), 279–290.
- (37) Fang, G.; Li, W. F.; Shen, X. M.; Perez-Aguilar, J. M.; Chong, Y.; Gao, X. F.; Chai, Z. F.; Chen, C. Y.; Ge, C. C.; Zhou, R. H. Differential Pd-nanocrystal facets demonstrate distinct antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 129.
- (38) Dumas, A.; Couvreur, P. Palladium: a future key player in the nanomedical field? *Chemical Science* **2015**, *6* (4), 2153–2157.
- (39) Balbin, A.; Gaballo, F.; Ceballos-Torres, J.; Prashar, S.; Fajardo, M.; Kaluderovic, G. N.; Gomez-Ruiz, S. Dual application of Pd nanoparticles supported on mesoporous silica SBA-15 and MSU-2: supported catalysts for C-C coupling reactions and cytotoxic agents against human cancer cell lines. *RSC Adv.* **2014**, *4* (97), 54775–54787.
- (40) Athie-Garcia, M. S.; Pinon-Castillo, H. A.; Munoz-Castellanos, L. N.; Ulloa-Ogaz, A. L.; Martinez-Varela, P. I.; Quintero-Ramos, A.; Duran, R.; Murillo-Ramirez, J. G.; Orrantia-Borunda, E. Cell wall damage and oxidative stress in *Candida albicans* ATCC10231 and *Aspergillus niger* caused by palladium nanoparticles. *Toxicol. In Vitro* **2018**, *48*, 111–120.
- (41) Gadd, G. M. Interactions of Fungi with Toxic Metals. *New Phytol.* **1993**, *124* (1), 25–60.
- (42) Mandal, S.; Gole, A.; Lala, N.; Gonnade, R.; Ganvir, V.; Sastry, M. Studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen bonds. *Langmuir* **2001**, *17* (20), 6262–6268.
- (43) Zhang, Q.; Li, N.; Goebel, J.; Lu, Z.; Yin, Y. A Systematic Study of the Synthesis of Silver Nanoplates: Is Citrate a "Magic" Reagent? *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (46), 18931–18939.
- (44) Li, W.; Yao, W. T.; Zhu, W. K.; Xi, C. C.; Duan, T. In situ preparation of mycelium/bayberry tannin for the removal of strontium from aqueous solution. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2016**, *310* (2), 495–504.
- (45) Lian, Y. R.; Bai, X. Y.; Li, X. Q.; Gao, Z.; Hu, Z. W.; Hu, G. Z. Novel fungal hyphae/Fe₃O₄ and N-TiO₂/NG composite for adsorption and photocatalysis. *RSC Adv.* **2017**, *7* (12), 6842–6848.
- (46) Zhu, W. K.; Cong, H. P.; Guan, Q. F.; Yao, W. T.; Liang, H. W.; Wang, W.; Yu, S. H. Coupling Microbial Growth with Nanoparticles: A Universal Strategy To Produce Functional Fungal Hyphae Macrospheres. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (20), 12693–12701.
- (47) Li, Y.; Zou, G.; Zhang, X.; Yang, S. Y.; Wang, Z. H.; Chen, T.; Zhang, L.; Lei, J.; Zhu, W. K.; Duan, T. Bio-inspired and assembled fungal hyphae/carbon nanotubes aerogel for water-oil separation. *Nanotechnology* **2019**, *30* (27), 275601.
- (48) Klionsky, D. J.; Herman, P. K.; Emr, S. D. The Fungal Vacuole - Composition, Function, and Biogenesis. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54* (3), 266–292.
- (49) Rebelein, J. G.; Ward, T. R. In vivo catalyzed new-to-nature reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *53*, 106–114.
- (50) Soldevila-Barreda, J. J.; Metzler-Nolte, N. Intracellular Catalysis with Selected Metal Complexes and Metallic Nanoparticles: Advances toward the Development of Catalytic Metallo-drugs. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 829–869.
- (51) Mukherjee, P.; Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Sainkar, S. R.; Khan, M. I.; Parishcha, R.; Ajaykumar, P. V.; Alam, M.; Kumar, R.; Sastry, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett.* **2001**, *1* (10), 515–519.
- (52) Mukherjee, P.; Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Sainkar, S. R.; Khan, M. I.; Ramani, R.; Parischa, R.; Ajaykumar, P. V.; Alam, M.; Sastry, M.; Kumar, R. Bioreduction of AuCl₄⁻ ions by the fungus,

Verticillium sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40* (19), 3585.

(53) Alkilany, A. M.; Nagaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, *5* (6), 701–708.

(54) Carnovale, C.; Bryant, G.; Shukla, R.; Bansal, V. Identifying Trends in Gold Nanoparticle Toxicity and Uptake: Size, Shape, Capping Ligand, and Biological Corona. *ACS Omega* **2019**, *4* (1), 242–256.

(55) Kan, C. X.; Cai, W. P.; Li, C. C.; Zhang, L. D.; Hofmeister, H. Ultrasonic synthesis and optical properties of Au/Pd bimetallic nanoparticles in ethylene glycol. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36* (13), 1609–1614.

(56) Garcia-Rubio, R.; de Oliveira, H. C.; Rivera, J.; Trevijano-Contador, N. The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02993

(57) Tawil, N.; Sacher, E.; Boulais, E.; Mandeville, R.; Meunier, M. X-ray Photoelectron Spectroscopic and Transmission Electron Microscopic Characterizations of Bacteriophage-Nanoparticle Complexes for Pathogen Detection. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (40), 20656–20665.

(58) Rouxhet, P. G.; Mozes, N.; Dengis, P. B.; Dufrene, Y. F.; Gerin, P. A.; Genet, M. J. Application of X-Ray Photoelectron-Spectroscopy to Microorganisms. *Colloids Surf., B* **1994**, *2* (1–3), 347–369.

(59) Dengis, P. B.; Gerin, P. A.; Rouxhet, P. G. X-Ray Photoelectron-Spectroscopy Analysis of Biosurfaces - Examination of Performances with Yeast-Cells and Related Model Compounds. *Colloids Surf., B* **1995**, *4* (4), 199–211.

(60) Dufrene, Y. F.; VanderWal, A.; Norde, W.; Rouxhet, P. G. X-ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of gram-positive bacteria: Comparison with biochemical analysis. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (4), 1023–1028.

(61) Park, J. W.; Shumaker-Parry, J. S. Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (5), 1907–1921.

(62) Das, S. K.; Liang, J.; Schmidt, M.; Laffir, F.; Marsili, E. Biomineralization Mechanism of Gold by Zygomycete Fungi *Rhizopus oryzae*. *ACS Nano* **2012**, *6* (7), 6165–6173.

(63) Moulder, J. F.; Stickle, W. F.; Sobol, P. E.; Bomben, K. D. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*; Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corporation: Eden Prairie, MN, 1992.

(64) Casaletto, M. P.; Longo, A.; Martorana, A.; Prestianni, A.; Venezia, A. M. XPS study of supported gold catalysts: the role of Au-0 and Au+delta species as active sites. *Surf. Interface Anal.* **2006**, *38* (4), 215–218.

(65) Huo, Z. Y.; Tsung, C. K.; Huang, W. Y.; Zhang, X. F.; Yang, P. D. Sub-two nanometer single crystal Au nanowires. *Nano Lett.* **2008**, *8* (7), 2041–2044.

(66) Brewer, S. H.; Glomm, W. R.; Johnson, M. C.; Knag, M. K.; Franzen, S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir* **2005**, *21* (20), 9303–9307.

(67) Ock, K. S.; Dembereldorj, U.; Park, J.; Ganbold, E. O.; Kim, S.; Shin, H. C.; Joo, S. W. Temperature-dependent structural change of D-penicillamine-capped chiral gold nanoparticles investigated by infrared spectroscopy. *Spectrochim. Acta, Part A* **2013**, *102*, 419–424.

(68) Qiu, L. M.; Liu, F.; Zhao, L. Z.; Yang, W. S.; Yao, J. N. Evidence of a unique electron donor-acceptor property for platinum nanoparticles as studied by XPS. *Langmuir* **2006**, *22* (10), 4480–4482.

(69) Chen, L.; Yelon, A.; Sacher, E. X-ray Photoelectron Spectroscopic Studies of Pd Nanoparticles Deposited onto Highly Oriented Pyrolytic Graphite: Interfacial Interaction, Spectral Asymmetry, and Size Determination. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (16), 7896–7905.

(70) Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C. J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.;

Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W. Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir* **1998**, *14* (1), 17–30.

(71) Lupan, O.; Postica, V.; Hoppe, M.; Wolff, N.; Polonskyi, O.; Pauporte, T.; Viana, B.; Majerus, O.; Kienle, L.; Faupel, F.; Adelung, R. PdO/PdO₂ functionalized ZnO: Pd films for lower operating temperature H₂ gas sensing. *Nanoscale* **2018**, *10* (29), 14107–14127.

(72) Hou, W. B.; Dehm, N. A.; Scott, R. W. J. Alcohol oxidations in aqueous solutions using Au, Pd, and bimetallic AuPd nanoparticle catalysts. *J. Catal.* **2008**, *253* (1), 22–27.

(73) Yao, Y. L.; Rubino, S.; Gates, B. D.; Scott, R. W. J.; Hu, Y. F. In situ X-ray absorption spectroscopic studies of magnetic Fe@Fe₃O₄/Pd nanoparticle catalysts for hydrogenation reactions. *Catal. Today* **2017**, *291*, 180–186.

(74) Di Pietrantonio, K.; Coccia, F.; Tonucci, L.; d'Alessandro, N.; Bressan, M. Hydrogenation of allyl alcohols catalyzed by aqueous palladium and platinum nanoparticles. *RSC Adv.* **2015**, *5* (84), 68493–68499.

(75) Ma, R.; Semagina, N. Nanoparticle Shape Effect Study as an Efficient Tool to Reveal the Structure Sensitivity of Olefinic Alcohol Hydrogenation. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (36), 15417–15423.

(76) Gangishetty, M. K.; Fontes, A. M.; Malta, M.; Kelly, T. L.; Scott, R. W. J. Improving the rates of Pd-catalyzed reactions by exciting the surface plasmons of AuPd bimetallic nanotriangles. *RSC Adv.* **2017**, *7* (64), 40218–40226.