Cátia Andreia dos Santos Carreira

Estudo da Interacção entre Nanopartículas e Fosfolípidos

U.PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
OUTUBRO/2008

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
D000120132

Cátia Andreia dos Santos Carreira

Estudo da Interacção entre Nanopartículas e Fosfolípidos

U.PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Química

De acordo com o aprovado pelo Ju.
Maria dos Dores Ribeiro de Silva
1/Outubro/2008

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Sala IMUP-207
Coloc.
N.º 10291
Depart. Química

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
OUTUBRO/2008

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Doutor Carlos Pereira, pela disponibilidade, comunhão de conhecimentos e entusiasmo que sempre revelou e que foram preponderantes para o desenvolvimento deste trabalho e por fomentar o meu enriquecimento científico.

Ao Prof. Doutor António Fernando Silva pelas condições proporcionadas e pelo acolhimento no seu grupo de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, com um especial agradecimento para a Dra. Elisa Pereira, Dra. Elisabete Ferreira e Dra. Renata Costa, por todo o apoio e incentivo demonstrados e pela amizade e óptimo ambiente de trabalho proporcionado baseado na cooperação e respeito mútuo.

À Dra. Elisa Pereira pela ajuda prestada na realização do estudo de superfícies no microscópio de força atómica, e à Dra. Renata Costa pela disponibilidade ao desenhar a mólecula de oleamina no *Gaussian*.

À Carina Barosa e Rui Gonçalves Miranda pelo auxílio prestado na tradução de texto, nomeadamente do resumo.

À minha família e amigos que sempre me ajudaram a ultrapassar as pequenas e grandes dificuldades que me deparei ao longo do meu percurso académico.

Resumo

No trabalho desenvolvido no âmbito de Mestrado pretendeu-se investigar a interacção entre fosfolípidos e nanopartículas de ouro modificadas, na interface ar/água, através da técnica de Langmuir-Blodgett.

Numa fase inicial, procedeu-se à síntese e caracterização de nanopartículas de ouro modificadas com oleamina (OLA).

Posteriormente, realizou-se uma série de estudos na balança de Langmuir, com o intuito de avaliar a influência do pH na formação e compressão de monocamadas flutuantes constituídas por diferentes componentes. Deste modo, estudou-se o processo de compressão de filmes constituídos apenas por oleamina ou nanopartículas de ouro modificadas, e monocamadas flutuantes mistas, em que eram utilizados dois componentes: o fosfolípido dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) e as nanopartículas de ouro modificadas. A análise do processo de compressão dos diversos filmes permitiu determinar qual o contributo da amina no comportamento da monocamada flutuante de nanopartículas de ouro modificadas, e permitiu avaliar a influência do pH do meio na interacção entre o DPPC e as nanopartículas.

Numa última fase estudou-se o efeito do pH no processo de deposição de filmes de nanopartículas de ouro num substrato de mica, caracterizando os filmes obtidos por microscopia de força atómica (AFM).

Abstract

The work developed aimed to investigate the interactions between phospholipids and gold nanoparticles modified at the air-water interface.

In an initial stage, gold nanoparticles, in which the molecule used to stabilize them at a thermodynamic level would make them acquire an overall positive charge, were synthesized and characterized.

In the next phase, different studies of the monolayer at the air-water interface were elaborated with the goal of evaluating the influence of pH in the forming of Langmuir films. This study is divided in three sections, depending on the components used for each film. The main purpose would be that of studying the influence of pH in the interaction between dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and the modified gold nanoparticles at the air-water interface. However, in order to assure a good analysis of results, it would be fruitful to know how pH would influence the films composed only of gold nanoparticles stabilized with oleyl amine. The study of oleyl amine monolayers follows the same train of thought, seen that one aimed to determine whether the amine which stabilized the NPs played an important part in the behavior of nanoparticles at the air-water interface. From the gold nanoparticles and oleyl amine study were demonstrated that the nanoparticles films shows several peculiarities that can not be justified based only in the characteristics of oleyl amine.

In the last phase the object of study was the effect of pH in the process of deposition of gold nanoparticles films onto mica subtracts, thus characterizing the films obtained via atomic force microscopy (AFM). In the AFM analysis, the films obtained seem to be more compacted at pH 4.7 and 7.0.

Résumé

Le but du travail développé est l'investigation des interactions entre phospholipides et nanoparticules d'or modifiées dans l'interface air /eau.

Dans une première phase, des nanoparticules d'or dont la molécule utilisée pour les stabilise thermodynamiquement leur donne une charge positive, ont été synthétisées et caractérisées.

Dans la phase suivante différentes études ont été réalisées dans la balance de Langmuir, pour évaluer l'influence du pH dans la formation de filmes de Langmuir. Cette étude est divisée en trois sections, dépendantes des composants utilisés pour chaque filme. L'objectif principal serait d'étudier l'influence du pH dans l'interaction entre le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et les nanoparticules d'or modifiées dans l'interface air/eau. Cependant, pour défendre une bonne analyse des résultats, il serait profitable de savoir comment le pH influencerait les filmes composés seulement par des nanoparticules d'or stabilisé avec de l'oleylamine. L'étude de monocouches de oleylamine viens dans la même ligne de pensée, sachant que l'on était censé déterminer si l'amine qui stabilisait les NPs avait un rôle important dans le comportement des nanoparticules de l'interface air /eau.

Dans la dernière phase, l'effet du pH dans le processus de dépôt de filmes de nanoparticules d'or, dans un substrat de mica, caractérisant les filmes obtenue par microscopie à force atomique (AFM) a été étudié.

Índice Geral

Agradecimentos 3
Resumo 4
Abstract 5
Résumé 6
Índice Geral 7
Índice de Tabelas 10
Introdução 11
1.1. Nanopartículas 12
1.1.1. Propriedades e Aplicações das Nanopartículas 12
1.1.2. Métodos de Síntese de Nanopartículas 14
1.2. Técnica Langmuir-Blodgett 22
1.2.1. História do Desenvolvimento de Filmes Ultra finos 22
1.2.2. Tensão Superficial 23
1.2.3. Filmes de Langmuir 24
1.2.4. Propriedade Termodinâmicas dos Filmes de Langmuir 33
1.2.5. Miscibilidade das monocamadas flutuantes 34
1.2.6. Filmes de Langmuir-Blodgett 36
1.2.7. Componentes dos Filmes 39
Execução Experimental 42
2.1. Instrumentação e Reagentes 43
2.2. Síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina 45
2.3. Estudo de Filmes de Langmuir e LB 45
2.3.1. Preparação de Soluções Tampão 45
2.3.2. Estudo de Filmes de Langmuir 47
2.3.3. Estudo de Filmes Langmuir-Blodgett 49
2.4. Técnicas de Caracterização Complementares 50
2.4.1. Técnicas de caracterização das AuNPs sintetizadas 50
2.4.2. Caracterização dos Filmes LB por Microscopia de Força Atómica 55
Apresentação de Resultados e Discussão 57
3.1. Caracterização das Nanopartículas de Ouro 58
3.2. Estudo de Monocamadas de Langmuir 61
3.2.1. Estudo de Filmes de Oleamina (OLA) 61
3.2.2. Estudo de Filmes de Nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina (OLA-AuNPs) 68
3.2.3. Monocamada de DPPC 75
3.2.3. Estudo de Filmes de DPPC com OLA-AuNPs na subfase 79
3.2.4. Estudo de Filmes de DPPC e OLA-AuNPs 85
3.3. Estudo de Filmes de Langmuir-Blodgett 91
Conclusões 96
Lista de Referências 99

Índice de Figuras

Figura 1 – Mudança de coloração de uma suspensão de nanopartículas de ouro em meio aquoso pelo processo de agregação[13] 13

Figura 2 – Esquema dos principais métodos de síntese de NPs[14] 14

Figura 3 – Exemplos de mecanismos de estabilização de nanopartículas em soluções coloidais 15

Figura 4 – Representação esquemática da preparação da SAM, por imersão do substrato de ouro numa solução de ácido mercapto-succínico 17

Figura 5 – Esquema da preparação sequencial de um filme LbL[29] 18

Figura 6 – Esquema da preparação sequencial de um filme auto-organizável[31] 19

Figura 7 – Deposição de uma monocamada de nanopartículas hidrofóbicas pela técnica LB 20

Figura 8 – Balança usada por Langmuir nos seus estudos de monocamadas flutuantes[64] 23

Figura 9 – Representação esquemática da interacção entre moléculas numa interface 24

Figura 10 – Ilustração esquemática da Balança de Langmuir-Blodgett 25

Figura 11 – Prato de Wilhelmy 25

Figura 12 – Esquema do princípio da formação de filmes de Langmuir 27

Figura 13 – Isotérmica π-A de um fosfolípido 28

Figura 14 – Representação esquemática das alterações na isotérmica π-A com o aumento da temperatura[64] 30

Figura 15 – Representação esquemática de uma sonda de Kelvin 31

Figura 16 – Representação de um condensador de três camadas para uma monocamada condensada na interface ar/água[72] 32

Figura 17 – Isotérmicas π-A para um componente puro (a e b) e para a mistura de dois componentes quando miscíveis (c) ou imiscíveis (d) 35

Figura 18 – Representação da fracção molar em função da área por molécula[71] 36

Figura 19 – Ilustração da deposição de uma monocamada flutuante num substrato sólido 37

Figura 20 – Esquema da deposição de uma monocamada em um substrato sólido. Principais tipos de Filmes de Langmuir-Blodgett 38

Figura 21 – Estrutura do DPPC 39

Figura 22 – Possíveis auto-organizações dos fosfolípidos 40

Figura 23 – Estrutura da oleamina (OLA) 41

Figura 24 – Fotografia da Balança de Langmuir Minitrought utilizada. 44

Figura 25 – Aspecto do Espectrofotómetro UV-Vis Hitachi U-3010 50

Figura 26 – Representação esquemática do aspecto da coluna do TEM 51

Figura 27 – Projecção de várias microestruturas presentes na lâmina fina de material analisado[18] 52

Figura 28 – Aspecto exterior do microscópio electrónico de transmissão (JEOL, modelo JEM 2200 FS) [17] 52

Figura 29 – Representação da dupla camada eléctrica e da variação do potencial zeta com a distância de uma partícula carregada negativamente[92] 53

Figura 30 – Fotografia do Zetasizer Nano ZS e representação de uma célula utilizada na medição 54

Figura 31 – Representação esquemática: do funcionamento do AFM (A) [95]; dos diferentes modos de varrimento (B) 55

Figura 32 – Fotografias do Microscópio de força atómica existente no laboratório 56

Figura 33 – (A) Espectro de Absorção UV-Vis das OLA-AuNPs; (B) Cor da solução coloidal de AuNPs 58

Figura 34 – (A) Imagens obtido por TEM; (B) Histograma da distribuição do tamanho das OLA-AuNPs 59

Figura 35 – Isotérmicas π-A de compressão da Oleamina a pH 4.8 utilizando diferentes soluções tampão com subfase 61

Figura 36 – Isotérmicas π-A e ΔV-A de compressão da Oleamina a diferentes valores de pH 63

Figura 37 – Representação gráfica do potencial de superfície máximo de filmes de Oleamina em função do pH 65

Figura 38 – Variação da compressibilidade k_c dos filmes de oleamina em função do pH da subfase 66

Figura 39 – Efeito do pH na energia de Gibbs de compressão do filme de Oleamina 67

Figura 40 – Isotérmicas de compressão π-A e ΔV-A de filmes de OLA-AuNPs a diferentes valores de pH 69

Figura 41 – Representação gráfica do potencial de superfície máximo de filmes de OLA-AuNPs e de OLA em função do pH 71

Figura 42 – Variação da compressibilidade k_c dos filmes de OLA-AuNPs e Oleamina em função do pH da subfase 72

Figura 43 – Efeito do pH na energia de Gibbs de compressão de filmes de OLA-AuNPs 73

Figura 44 – Efeito do pH na energia de Helmholtz de compressão de filmes de OLA-AuNPs 74

Figura 45 – Isotérmicas de compressão da monocamada de DPPC em água e temperatura de 20°C 75

Figura 46 – Efeito do pH e do sal da subfase na isotérmica π-A da monocamada de DPPC[110] 77

Figura 47 – Isotérmicas de compressão π-A e ΔV-A de DPPC na presença de 60μL de OLA-AuNPs na subfase a diferentes valores de pH 80

Figura 48 – Representação gráfica do potencial de superfície máximo de filmes de DPPC em função do pH da subfase, na presença de 60μL de OLA-AuNPs 81

Figura 49 – Variação da compressibilidade k_c dos filmes de DPPC em função do pH da subfase, na presença de 60μL de OLA-AuNPs 82

Figura 50 – Efeito do pH na energia de Gibbs de compressão de filmes de DPPC na presença de 60 μL de OLA-AuNPs na subfase 83

Figura 51 – Efeito do pH na energia de Helmhotz de compressão de filmes de DPPC na presença de 60 μL de OLA-AuNPs na subfase 84

Figura 52 – Isotérmicas π-A e ΔV-A de compressão de filmes de dois componentes: DPPC e OLA-AuNPs, a diferentes valores de pH 86

Figura 53 – Representação gráfica do potencial de superfície máximo de filmes de DPPC e OLA-AuNPs na interface e na subfase, em função do pH 87

Figura 54 – Variação da compressibilidade k_c dos filmes mistos de DPPC e OLA-AuNPs (na interface) e DPPC com OLA-AuNPs na subfase 89

Figura 55 – Efeito do pH na energia de Gibbs de compressão de filmes de DPPC e OLA-AuNPs 89

Figura 56 – Efeito do pH na energia de Helmholtz de compressão de filmes de DPPC e OLA-AuNPs 90

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Algumas Propriedades Químicas e Físicas da Oleamina[90] 41

Tabela 2 – Lista de material e instrumentação utilizados no estudo das AuNPs 43

Tabela 3 – Lista de reagentes utilizados no estudo das AuNPs 44

Tabela 4 – Lista das soluções tampão usadas como subfase no estudo de filmes de Langmuir 46

Tabela 5 – Dados comuns a todas experiências de Langmuir 48

Tabela 6 – Resultados obtidos para o potencial zeta e para o diâmetro hidrodinâmico das OLA-AuNPs em suspensão coloidal aquosa 58

Tabela 7 – Dados referentes à deposição da monocamada de OLA-AuNPs em mica a diferentes pHs, a pressão superficial de 30 $mN.m^{-1}$ e correspondente imagem topográfica obtida por AFM 91

Tabela 8 – Valores de pka aparentes determinado a partir dos valores de $\Delta V_{máx}$ 98

CAPÍTULO I

Introdução

Este capítulo aborda a evolução do estudo de nanopartículas metálicas, focando as suas principais propriedades, aplicações e métodos de organização em arranjos de duas dimensões. Numa segunda fase são abordados os fundamentos teóricos da técnica de Langmuir-Blodgett, que desempenha um papel central no estudo desenvolvido.

1.1. Nanopartículas

As nanopartículas (NPs) são formadas por aglomerados de átomos ou moléculas que apresentam um tamanho bastante reduzido (1-100 nm), e podem encontrar-se dispersas em meio gasoso, líquido ou sólido.[1]

Um dos registos mais antigos da existência de nanopartículas metálicas remonta a 400 a.C., no célebre copo de Licurgo. A incorporação de nanopartículas de ouro e prata no seu vidro, permite que este copo exiba uma peculiar coloração esverdeada quando visualizada por reflexão da luz, e vermelha quando visualizada por transmissão.[1,2] A descrição de Paracelso sobre a preparação de *ouro potável* (solução de ouro coloidal) incide, sobretudo, na presunção das suas notáveis propriedades curativas. Ideia que, de resto, perdura ainda na Idade Média, em que as soluções de ouro coloidal eram usadas na terapia das mais variadas doenças, tais como a disenteria, a epilepsia ou os problemas cardíacos.[1]

Pode-se afirmar que a pesquisa científica sobre o tema do ouro coloidal começou em 1857, com Michael Faraday, que relatou a formação de uma solução de ouro coloidal a partir da redução aquosa de $[AuCl_4]^-$, usando fósforo em CS_2. Faraday investigou as propriedades ópticas de filmes finos preparados a partir de soluções coloidais, observando-lhes mudanças reversíveis da cor quando sujeitos a compressão mecânica.[1]

Após um período de estagnação, ressurgiram, a partir da segunda metade do séc. XX, vários métodos para a preparação de soluções coloidais de ouro. Todavia, é apenas na década de noventa que desponta o interesse sistemático pelas nanopartículas. Na secção 1.2.1 serão abordados os métodos de síntese que mais influenciaram o desenvolvimento do estudo de nanopartículas de ouro (AuNPs).

1.1.1. Propriedades e Aplicações das Nanopartículas

Sendo as nanopartículas de ouro muito estáveis, entende-se o papel de relevo que desempenham no âmbito da Nanotecnologia e Nanociência, mormente pela sua resistência à oxidação e agregação.[3]

As nanopartículas metálicas têm grandes potencialidades, podendo ser utilizadas nas mais variadas aplicações das mais diversas áreas, tais como a catálise[4,5], sensores químicos[6] e

biológicos[7,8], processos terapêuticos (administração de fármacos)[9], dispositivos ópticos ou electrónicos [10,11].

O que torna as nanopartículas de ouro fonte de aplicação em múltiplas áreas, é o facto de estas possuírem algumas propriedades electrónicas, ópticas e catalíticas únicas, que divergem fortemente das propriedades características do equivalente macroscópico. As propriedades das AuNPs são extremamente dependentes do tamanho e forma das partículas, da distância entre estas e da natureza do ligando que protege o núcleo metálico.[2,12]

Um dos aspectos mais interessantes e intensivamente estudados são as propriedades ópticas das nanopartículas. Em 1908, Gustav Mie explicou a razão da cor vermelha das nanopartículas de ouro através das equações de Maxwell.[1] Mie demonstrou que, quando as NPs são suficientemente pequenas, ocorre uma forte absorção da luz verde a um comprimento de onda de 520 nm, que corresponde à banda de ressonância de plasmões (*plasmon resonance band*). Assim, as nanopartículas de ouro com diâmetros entre 2 e 10 nm apresentam uma intensa coloração vermelha. Com o aumento do tamanho das nanopartículas, há uma tendência para que as soluções obtenham uma coloração violeta, devido ao aumento da densidade de estados electrónicos e, consequentemente, uma diminuição da energia de transição.[1,13]

A banda de plasmões depende de vários factores, tais como o tamanho e a forma das nanopartículas, assim como as características do meio (constante dieléctrica), e a distância entre as partículas. [1,13]

O fenómeno de agregação é um exemplo de como a distância entre as nanopartículas promove o deslocamento da banda de plasmões para regiões de menor energia, surgindo uma nova banda perto dos 650 nm. A Figura 1 ilustra a alteração de cor de uma solução coloidal de nanopartículas de ouro quando há agregação de partículas.

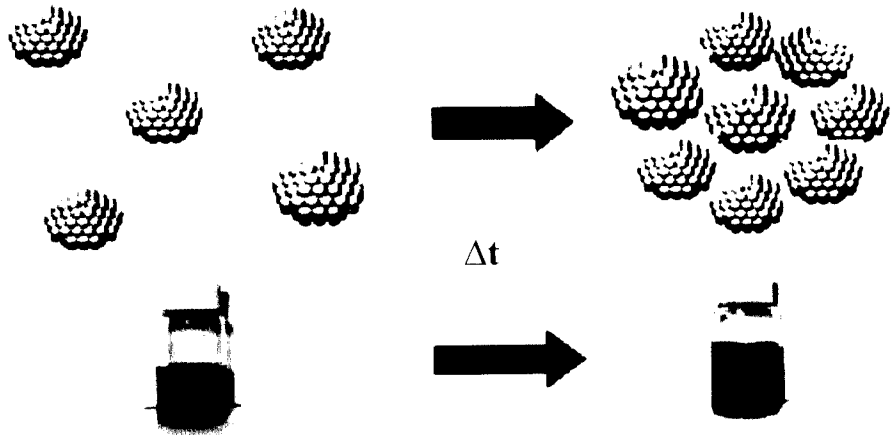


Figura 1 – Mudança de coloração de uma suspensão de nanopartículas de ouro em meio aquoso pelo processo de agregação[13]

1.1.2. Métodos de Síntese de Nanopartículas

A estabilidade, o tamanho e a forma das partículas são fortemente influenciados pelo método de preparação de AuNPs.[14] Por esse factor, surgiram, ao longo de anos de pesquisa, vários métodos que aprimoraram a síntese e caracterização de partícula de nanodimensões, de modo a obter as propriedades pretendidas. Na Figura 2 estão representados esquematicamente alguns dos métodos *top down* e *bottom up* utilizados para produzir nanopartículas.

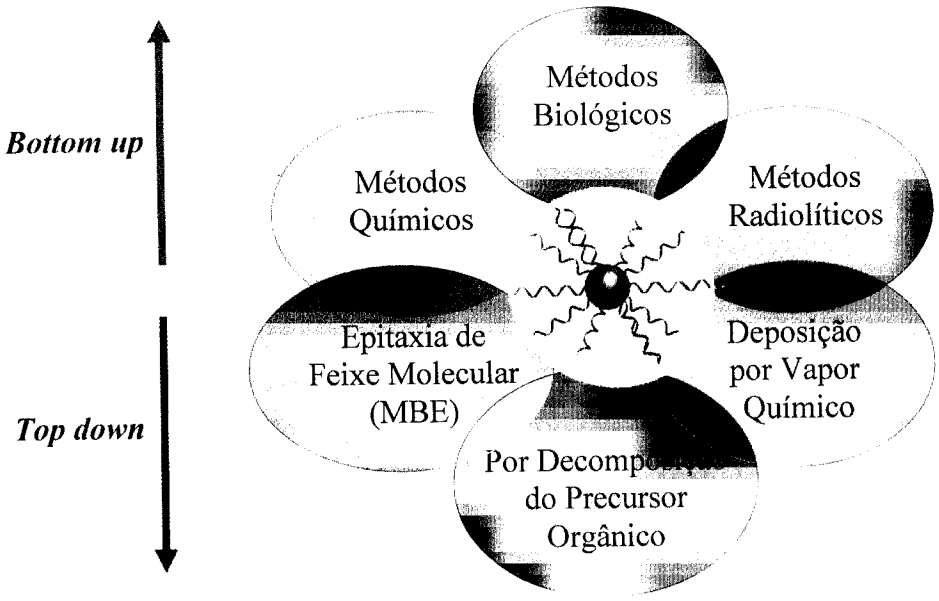


Figura 2 – Esquema dos principais métodos de síntese de NPs[14]

Os métodos químicos são baseados em reacções químicas, geralmente envolvendo a redução de um sal metálico. Estes métodos apresentam várias vantagens em relação aos restantes,[14] tais como:

- ✓ Simplicidade;
- ✓ Maior controlo do tamanho das nanopartículas;
- ✓ Facilidade no controlo da forma das nanopartículas;
- ✓ Versatilidade na estabilização das nanopartículas;
- ✓ Baixo nível de dispersão de tamanho.

As nanopartículas apresentam uma elevada área superficial, logo, possuem uma elevada energia livre superficial, o que as torna instáveis. De modo a diminuírem a energia total do sistema as nanopartículas tendem a agregarem-se. Para evitar o crescimento descontrolado das nanopartículas utilizam-se dois tipos de estabilização: repulsão por cargas eléctricas e adição de um material de estabilização (Figura 3).

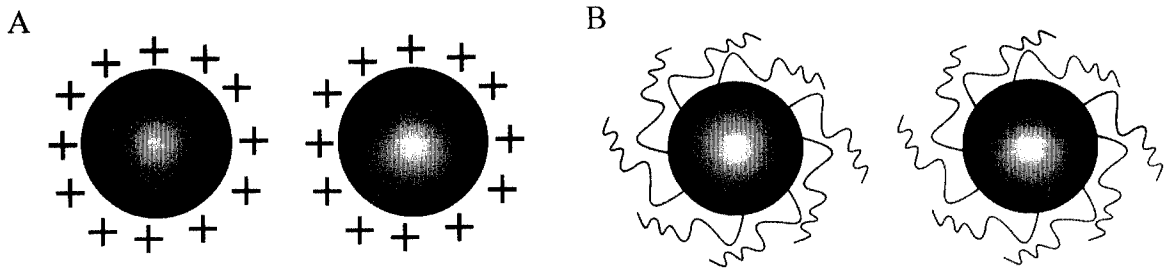


Figura 3 – Exemplos de mecanismos de estabilização de nanopartículas em soluções coloidais[15]

Na estabilização em que ocorre repulsão por cargas eléctricas, as nanopartículas repelem-se devido à sua superfície electricamente carregada (A). Quando é utilizado um material de estabilização, as nanopartículas apresentam uma cobertura protectora, prevenindo a aglomeração de nanopartículas (B).

Na maioria dos métodos de síntese de nanopartículas metálicas por redução de um catião metálico, a estabilização é promovida através dos mais variados agentes protectores (*capping agents*), sendo os mais importantes os alcanotióis[16], os derivados de tióis[17], as aminas,[6,18,19] os ácidos gordos,[20] os aminoácidos,[21,22] entre outros.

O método mais utilizado devido à sua simplicidade, foi relatado pela primeira vez em 1951 tendo sido desenvolvido por Turkevitch e colaboradores[23]. Este método baseava-se na redução do $[AuCl_4]^-$ com o ião citrato em meio aquoso. As AuNPs obtidas podem ter dimensões de 10 a 100 nm, dependo do rácio molar entre o sal de ouro e o citrato de sódio. O anião citrato actua inicialmente como agente redutor, e, posteriormente, como estabilizador do núcleo de ouro, atribuindo carga negativa às NPs.

Brust e colaboradores[16] utilizaram, em 1994, alcanotióis para sintetizar nanopartículas com um tamanho reduzido. Este método foi inspirado na síntese de Faraday, utilizando o $NaBH_4$ como agente redutor, e alcanotióis de cadeia longa como agentes protectores num sistema bifásico (tolueno e água).

Em 1996, Leff e colaboradores,[18] desenvolvem um novo método de síntese de nanopartículas de ouro hidrofóbicas, utilizando aminas primárias como estabilizantes.

Com o desenvolvimento constante de novos métodos de síntese, surge também a preocupação de obter nanopartículas dispersas em meio aquoso, de modo a facilitar a sua aplicação imediata na catálise, na administração de fármacos e em áreas como a biotecnologia.[19]

1.1.3. Métodos de Organização de Nanopartículas

Actualmente, as técnicas de formação de nanoestruturas baseiam-se principalmente em métodos químicos, uma vez que oferecem maior flexibilidade em termos de design dos nanomateriais, relegando os métodos físicos para uma posição secundária.

Os métodos físicos, também conhecidos por *top down*, são todos os métodos em que há manipulação física do material macroscópico até à obtenção da forma e da ordem desejadas. Dois exemplos deste tipo de método são a sonólise e a nanolitografia.[15]

Nos métodos químicos, também denominados por *bottom up*, as nanoestruturas são construídas a partir da organização das nanopartículas em arranjos.

O desafio actual nesta área é conseguir garantir um controlo preciso da geometria das nanoestruturas formadas e serão aqui abordados, de forma sintética, os procedimentos gerais utilizados na auto-organização de nanopartículas em filmes ultrafinos por *bottom up*.

● *Filmes Auto-montados*

A auto-montagem é o processo mais utilizado nos estudos envolvendo nanopartículas, visto tratar-se de um procedimento barato (não necessita de equipamentos especializados) e versátil (há uma grande variedade de moléculas que podem ser usadas nesta técnica). O termo *auto-montagem* implica a adsorção espontânea de moléculas ou nanopartículas num substrato, sem influência externa ou humana, isto é, o sistema toma a configuração mais adequada de acordo com factores termodinâmicos.

A formação de filmes auto-montados foi anunciada, pela primeira vez, por Sagiv e colaboradores[24], que imergiram um substrato de alumínio numa solução diluída de n-octadeciltriclorosilano (OST) num solvente orgânico. Entre o silano utilizado e o substrato forma-se uma ligação covalente, resultado da adsorção química. Pode dizer-se que é aqui que "nascem" as SAMs, isto é, as monocamadas auto-montadas (*Self-Assembled Monolayers*). Na década de noventa, Decher e colaboradores[25] propuseram uma técnica de auto-montagem baseada na interacção electrostática entre moléculas carregadas, tais como compostos anfifílicos ou polielectrólitos.[26]

Monocamadas auto-montadas (SAMs): As SAMs são formadas, naturalmente, por adsorção e auto-ordenação das nanopartículas na superfície de um substrato apropriado.[27]

Para isso, basta submergir, durante algum tempo, o substrato directamente numa solução contendo as moléculas que se pretende fixar.

A ligação das moléculas ao substrato é, geralmente, uma ligação covalente. Todavia, há outros tipos de interacção, tais como as forças de *Van der Waals*, as ligações de hidrogénio, as forças dispersivas ou de London, cujas intensidades tornam as monocamadas extremamente compactas.[26]

Para além dos silanos ou siloxanos é possível formar SAMs por adsorção química de compostos de enxofre (ex: tióis, dissulfetos, etc.) ou aminas no substrato.[28,29] Este é um método muito utilizado, principalmente quando se trata de substratos de ouro, uma vez que a interacção entre o ouro e os tióis ocorre com muita facilidade e é muito estável.

Na Figura 4 está representado o procedimento a efectuar na preparação de uma SAM.

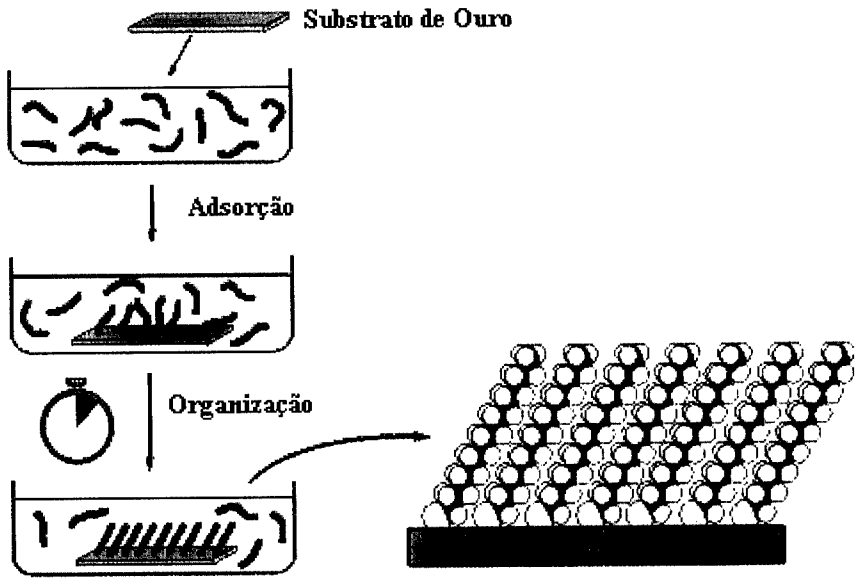


Figura 4 – Representação esquemática da preparação da SAM, por imersão do substrato de ouro numa solução de ácido mercapto-succínico[30]

Filmes auto-montados camada a camada (LbL): a formação de filmes multicamada baseia-se na atracção entre moléculas com carga opostas. Assim, cada camada é depositada alternando a sua carga.[26,28]

A Figura 5 esquematiza a formação sequencial de um filme multicamada por auto-organização. O primeiro passo é submergir o substrato, carregado negativamente, numa solução diluída de um policatião, tais como a poli(L-lisina) ou a poli(L-arginina). O objectivo deste passo é a adsorção de um monocamada de policatião. Os passos seguintes são lavar com água ultrapura e secar o substrato, de modo a garantir que apenas fique uma monocamada de

polielectrólito. Este processo de imersão, lavagem e secagem, pode ser repetido sempre que se quiser adicionar uma nova camada.

É um método muito simples e bastante versátil, que permite ter um controlo total na espessura do filme, podendo ser usado com uma grande variedade de moléculas carregadas, tais como polielectrólitos, biomoléculas, partículas coloidais, entre outras. Os filmes obtidos por LbL são muito estáveis, possuindo a particularidade de não apresentarem muitos defeitos, pois ainda que eles ocorram ao longo da montagem do filme, a camada superior tem tendência a cobri-los, não permitindo a sua propagação ao longo da estrutura. Contudo os filmes LbL não ostentam uma ordenação como a que é conseguida nos filmes LB. A espessura do filme pode ser controlada alterando-se alguns parâmetros experimentais, como o pH, a temperatura e a força iónica das soluções.[26,28]

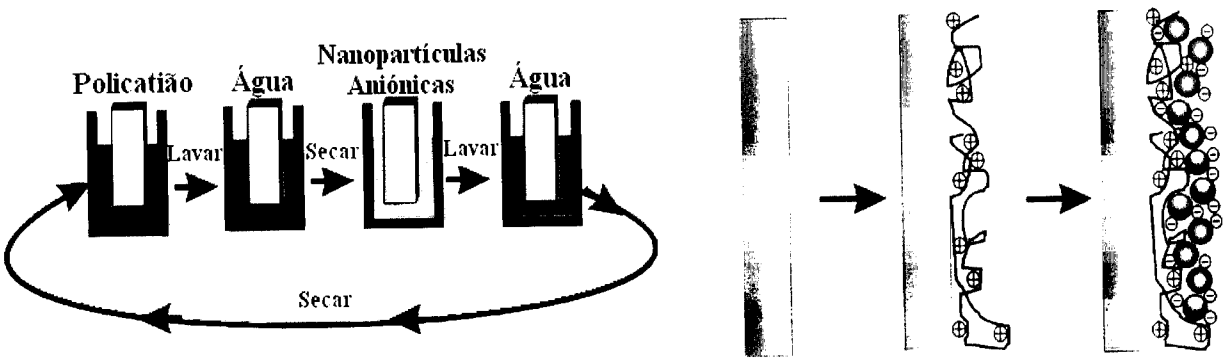


Figura 5 – Esquema da preparação sequencial de um filme LbL[29]

Os filmes ultrafinos preparados por auto-montagem podem ser obtidos por SAMs ou por LbL, contudo é necessário clarificar que estes dois métodos nem sempre podem ser dissociados um do outro, pois em muitos casos a formação de filmes auto-montados camada a camada (LbL) começa com uma SAM, um exemplo é o trabalho desenvolvido por Chirea e colaboradores[31].

A Figura 6 esquematiza a formação sequencial de um filme multicamada por auto-organização, levada a cabo por Chirea e colaboradores [31]. Inicialmente é utilizado, o ácido mercapto-succínico (MSA), que é adsorvido a um substrato de ouro, formando-se uma SAM.

As monocamadas seguintes formam-se por interacções electrostáticas do tiól com a poli($_L$-lisina) – pLys – um policatião que, posteriormente, interage com nanopartículas de ouro estabilizadas com o ácido mercapto-succínico, formando um filme multicamada.

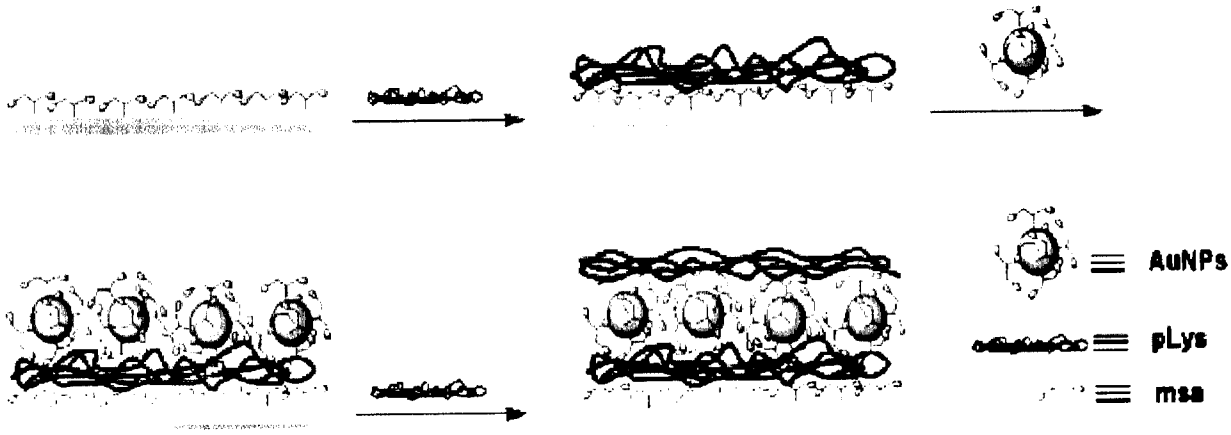


Figura 6 – Esquema da preparação sequencial de um filme auto-organizável[31]

● *Filmes Langmuir-Blodgett (LB)*

Este método permite organizar moléculas hidrofóbicas ou tensioactivas na interface ar/água e, posteriormente, transferir a monocamada de nanopartículas para um suporte sólido.

Algumas vantagens desta técnica incluem: a fácil manipulação filme, podendo estabelecer o numero de camadas a depositar; a possibilidade de controlar a distância entre as partículas e a homogeneidade das monocamadas; ou, por fim, os substratos não necessitarem de tratamento prévio. As principais desvantagens prendem-se com o facto de ser necessário instrumentação especial (balança de Langmuir), e os filmes produzidos não terem, devido às interacções fracas entre as partículas e o substrato, uma estabilidade a longo prazo.[32]

Fendler e colaboradores[33-35] demonstraram, pela primeira vez, que era possível organizar uma monocamada estável de nanopartículas hidrofóbicas na interface ar/água e, posteriormente, depositá-la num substrato utilizando a técnica LB (Figura 7).

Actualmente, a pesquisa feita na imobilização de nanopartículas em substratos pela técnica de LB tem seguido diferentes vias, consoante as características das nanopartículas e os objectivos a atingir. Em grande parte dos trabalhos desenvolvidos é espalhada uma pequena quantidade de NPs na superfície da água.[3,36-50] Contudo, surge o problema de que nem todas as nanopartículas possuem um revestimento que lhes permita formar monocamadas flutuantes estáveis ou monocamadas com isotérmicas π-A (isotérmica de pressão superficial por área por molécula) bem definidas. Isto sucede devido à hidrofobicidade das NPs. Quando esta é muito

baixa, as nanopartículas têm tendência a mergulhar na subfase, e, quando é muito elevada, as nanopartículas tendem a agregar-se.[51] Para conseguir obter filmes LB de nanopartículas que têm a capacidade de formar monocamadas, mas em que a pressão superficial máxima é baixa, opta-se por colocar na interface um surfactante que irá fazer com que se obtenha pressões de superfície bastante mais elevadas, melhorando as condições em que ocorre a deposição do filme de Langmuir num substrato.[32,40,42, 52]

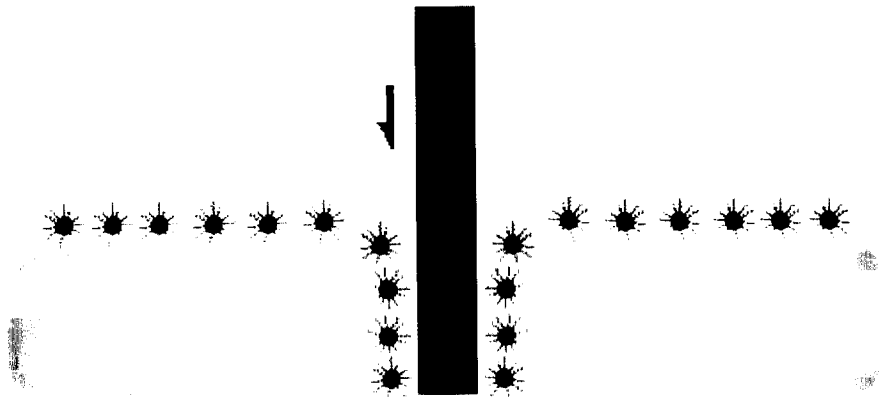


Figura 7 – Deposição de uma monocamada de nanopartículas hidrofóbicas pela técnica LB

Sastry e colaboradores[41,43] desenvolveram alguns trabalhos de pesquisa em que as nanopartículas sintetizadas não eram hidrofóbicas. Deste modo, para que fosse possível colocá-las na superfície da subfase, foi necessário funcionalizá-las com uma amina de cadeia longa, como a octadecilamina (ODA), tornando-as capazes de formar um filme de Langmuir estável.

Nalguns trabalhos desenvolvidos na área de filmes LB de nanopartículas, estas não conseguem manter-se à superfície da subfase. Nestes casos é utilizado um composto anfifílico para formar uma monocamada flutuante, sendo que a imobilização das nanopartículas baseia-se na atracção electrostática das NPs, que se encontram diluídas na subfase, com a monocamada.[53-56]

Menos frequente, mas ainda assim possível, é utilizar a interface ar/água não só como meio de imobilização das nanopartículas numa monocamada flutuante, mas também para sintetizá-las. Neste processo há uma monocamada flutuante de carga oposta aos iões metálicos que se encontram na subfase e que vão ser reduzidos por um agente redutor externo (ex. radiação U.V.). Fendler e colaboradores[57,58] foram os primeiros a utilizar a interface ar/água para este fim, abrindo uma nova via de síntese e imobilização de NPs (em apenas um passo), tendo surgido, na última década, alguns trabalhos de pesquisa nesta matéria.[59-61]

A deposição da monocamada de nanopartículas em suportes sólidos é um processo delicado, que sofre influência de vários parâmetros. Por vezes, obtêm-se filmes LB estruturalmente diferentes das respectivas monocamadas flutuantes. A razão para que tal ocorra está associada à rigidez do filme de Langmuir. As alterações estruturais dos filmes LB com nanopartículas verificam-se quando a compressão é relativamente baixa. Isto acontece porque as monocamadas com estruturas pouco rígidas estão mais susceptíveis às condições ambientais. Nas monocamadas mais compactas, essa susceptibilidade às condições ambientais não se verifica, diminuindo a probabilidade de ocorrer alterações estruturais do filme LB em relação à respectiva monocamada flutuante.[62]

1.2. Técnica Langmuir-Blodgett

O estudo de filmes orgânicos ultrafinos tem sido desenvolvido com grande expectativa, estando a comunidade científica convencida da sua utilidade em diversas aplicações práticas e comerciais, tais como sensores, detectores, monitores e componentes de circuitos electrónicos.[63]

1.2.1. História do Desenvolvimento de Filmes Ultra finos

A análise científica de filmes ultrafinos inicia-se com Benjamim Franklin (1706-1790), que observou a forma como uma gota de óleo se espalhava pela superfície da água. Em 1774, Franklin descreveu à *British Royal Society* uma das suas experiências no pequeno lago de Clapman (~2000 m^2), no qual havia colocado uma colher de sopa de óleo (~2 mL) que rapidamente se espalhou por toda a superfície da água, concluindo, através de cálculos quantitativos simples, que a espessura do filme de óleo formado teria menos de 2 nm.[64]

As experiências de Franklin estimularam a continuação do estudo de filmes de óleo na água, destacando-se Lord John Rayleigh[65] (1842-1919), que revelou as suas suspeitas quanto à espessura dos filmes, prevendo que este seria constituído apenas por uma única camada de moléculas. Rayleigh estimou que a espessura dum filme de azeite na superfície de água seria de 10 a 20 Å, espessura correspondente a apenas uma camada de moléculas de azeite.

Simultaneamente, na Alemanha, Agnes Pockles[66] (1862-1935) desenvolvia, na sua cozinha, uma rudimentar balança que lhe permitia determinar a contaminação superficial da água em função da área de superfície para diversos óleos. Em 1891 Pockles publicou na revista «Nature» a primeira isotérmica π-A, sendo a isotérmica do ácido esteárico obtida por Pockles ainda hoje reconhecida como essencialmente correcta.

Também Devaux se dedicou ao estudo de filmes formados na superfície da água, sendo o primeiro a utilizar polímeros na preparação de filmes, utilizando proteínas e celulose.[64]

O estudo sistemático de monocamadas flutuantes em água teve início em 1910 com Irving Langmuir[67] (1881-1957), tendo a sua teoria sido descrita, na íntegra, pela primeira vez, em 1915.[68]

Langmuir, com as suas medições, demonstrou que as monocamadas de ácidos gordos à superfície da água poderiam variar a forma em que estavam ordenados, podendo existir

diferentes fases, passando de um estado gasoso (em que não há interacção entre as moléculas), até um estado sólido (em que há uma organização máxima das moléculas que interagem permanentemente entre si).

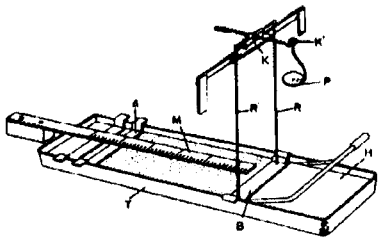


Figura 8 – Balança usada por Langmuir nos seus estudos de monocamadas flutuantes[64]

A teoria desenvolvida por Langmuir estimulou o desenvolvimento da pesquisa na área de filmes ultrafinos. Contudo, foi apenas em 1919, quando Katharine Blodgett[69] (1898-1979) se juntou a Langmuir no estudo de filmes ultrafinos, que foi possível transferir monocamadas de ácidos gordos da superfície da água para substratos sólidos. Esta associação de Blodgett a Langmuir deu origem a um novo tipo de filmes, que se distinguem dos filmes flutuantes de Langmuir, precisamente devido à deposição das monocamadas em substratos sólidos. Estes filmes passaram a ser designado filmes Langmuir-Blodgett.

Apesar das potencialidades da nova técnica desenvolvida por Langmuir e Blodgett, foram necessários quase 50 anos para que a comunidade científica delas tomasse consciência. A primeira conferência internacional de filmes LB ocorreu em 1979, momento decisivo para o impulso do uso da técnica.

1.2.2. Tensão Superficial

As moléculas de um líquido interagem entre si, sendo as interacções de uma molécula equilibradas por uma força igualmente atractiva em todas as direcções. A força total resultante é igual a zero, o que corresponde à situação energética mais favorável.[63,64,68,70] Por outro lado, as moléculas sofrem, na superfície, um desequilíbrio de forças, uma vez que não se encontram totalmente rodeadas por moléculas de líquido, estando também em contacto com o ar. Existe, assim, um excesso de energia livre na interface ar/água, que tende a minimizar a área da superfície e o contacto.[63,64] A tensão superficial é a medida que permite quantificar esse excesso de energia livre por comprimento de superfície.

Em traços gerais, a tensão superficial pode ser designada como uma medida da energia de coesão entre as moléculas numa interface, consequência das interacções moleculares (Figura 9). A tensão superficial é usualmente representada nas unidades $mN.m^{-1}$ ou *dynes/cm*.[63,64,68,70]

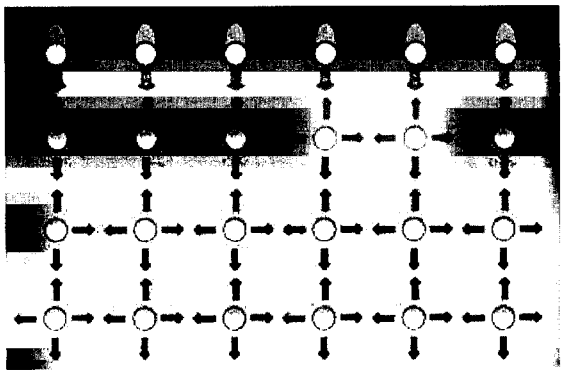


Figura 9 – Representação esquemática da interacção entre moléculas numa interface[71]

A tensão superficial (γ) de uma interface plana é dada pela derivada parcial:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,P,ni} \tag{1}$$

onde G é a energia livre de Gibbs do sistema e A é a área de superfície, para temperatura (T), pressão (P) e composição (n_i) constantes.[63,64,68]

Os líquidos polares, como têm fortes interacções intermoleculares, apresentam tensões superficiais elevadas. É o exemplo da água, que, excluindo o mercúrio, é o líquido que apresenta a maior tensão superficial, sendo, por esta razão, a subfase mais utilizada na técnica de Langmuir-Blodgett.[62]

A tensão superficial pode diminuir, quando as forças intermoleculares sofrem alterações, devido a factores como a temperatura ou possíveis contaminações.[63,70]

1.2.3. Filmes de Langmuir

- ***Balança de Langmuir***

A balança de Langmuir permite, simultaneamente, manipular a área molecular por compressão ou expansão da monocamada, e medir a pressão superficial do filme.

A Figura 10 representa uma balança de Langmuir-Blodgett. Esta é composta por uma tina de Teflon® termostatizada que contém a subfase; um conjunto de duas barreiras móveis

de Teflon® que permitem comprimir o filme; e um prato de Wilhelmy que possibilita medir a pressão superficial.

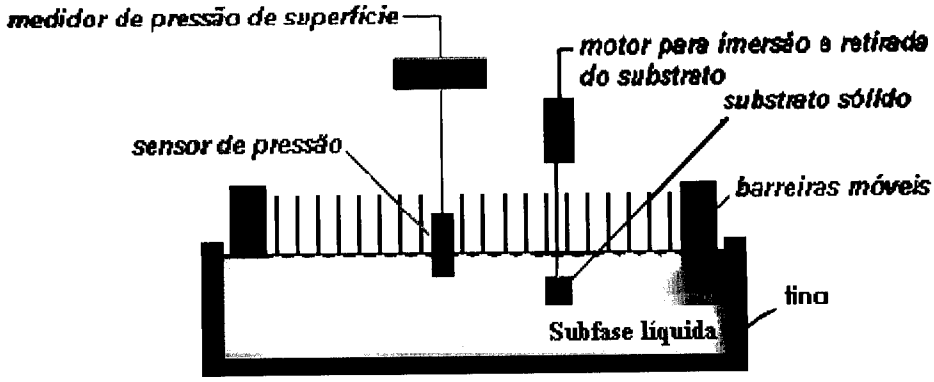


Figura 10 – Ilustração esquemática da Balança de Langmuir-Blodgett[72]

O método do prato de Wilhelmy baseia-se na medição da força exercida num prato suspenso que se encontra parcialmente imergido na subfase (Figura 11). Sabendo as dimensões do prato, a força exercida é convertida em tensão superficial. Geralmente, o prato é muito fino e feito de platina. Contudo, podem ser utilizados outros materiais, como mica, vidro ou quartzo.[6364,68,70,72]

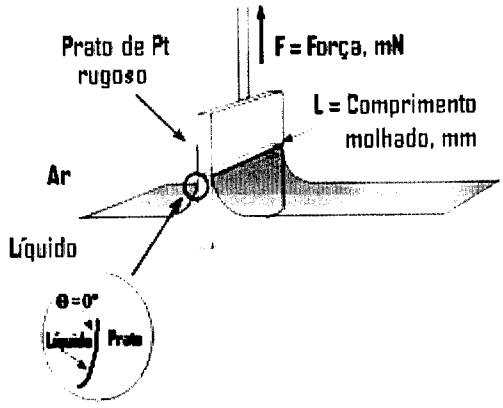


Figura 11 – Prato de Wilhelmy

A tensão superficial para um prato rectangular de dimensões l_p (comprimento), w_p (largura) e t_p (espessura); de densidade ρ_p, imerso a uma profundidade h num líquido de densidade ρ_L, é definida por:

$$\gamma_{prato} = \frac{F_R}{2(w_p + t_p)} \qquad (2)$$

sendo $2(w_p + t_p)$ igual ao perímetro do prato e F_R a resultante das forças do sistema (em mN). F_R pode ser determinada a partir da expressão:

$$F_R = \rho_p g l w_p t_p + 2\gamma(t_p + w_p)\cos\theta - \rho_L g h w_p t_p \quad (3)$$

A pressão superficial é determinada a partir da medição das alterações de F_R para uma superfície limpa e para a mesma superfície com o filme de Langmuir. Matematicamente, a pressão superficial é obtida através da seguinte equação (para $t_p \approx 0$ ou $w_p \gg t_p$):

$$\pi = -\Delta\gamma = -\left[\frac{\Delta F_R}{2(t_p + w_p)}\right] \cong -\frac{\Delta F_R}{2w_p} \quad (4)$$

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_m \quad (5)$$

onde, γ_0 corresponde à tensão superficial do solvente puro e γ_m à tensão superficial na presença do filme.

Verifica-se que, quanto menor for a espessura do prato, maior é a precisão do método do prato de Wilhelmy.

- ***Monocamadas de Langmuir***

As monocamadas de Langmuir possibilitam um estudo mais detalhado das moléculas que as constituem, visto que estas se apresentam, numa fase inicial, de forma quase isolada, não sofrendo grande interferência das restantes moléculas.[13] Além disso, como representam meias bicamadas, permitem o estudo de biomembranas, funcionando como sistema modelo para compreender a estrutura e funcionalidade dos lípidos nas membranas biológicas.[64,73]

As monocamadas de Langmuir são formadas por moléculas anfifílicas, que se orientam na interface gás/líquido, de forma a minimizar a sua energia livre.[64]

As moléculas anfifílicas são constituídas por uma parte hidrofóbica (cauda) e outra hidrofílica (cabeça). A parte hidrofóbica, frequentemente formada por cadeias alifáticas, diminui a solubilidade das moléculas na subfase aquosa, e a parte hidrofílica é preponderante na formação do filme por toda a superfície, uma vez que tem maior interacção com a subfase.[72]

Na preparação de filmes de Langmuir, a substância anfifílica tem que ser previamente dissolvida num solvente volátil, como é o exemplo do clorofórmio. Posteriormente, a solução

é aplicada na interface da água com uma seringa, de forma que as gotas permaneçam à superfície. Após a evaporação do solvente, forma-se a monocamada flutuante, que pode então ser comprimida com o auxílio das barras móveis da balança de Langmuir (Figura 12).

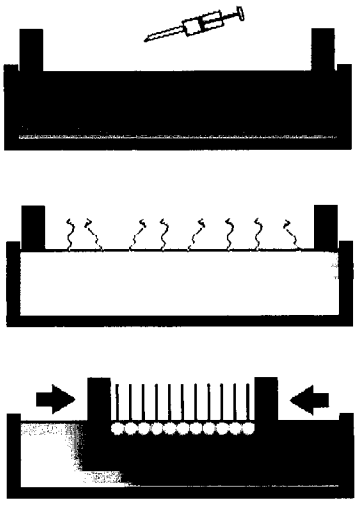


Figura 12 – Esquema do princípio da formação de filmes de Langmuir[74]

As características das monocamadas flutuantes dependem de vários factores que devem estar sempre presentes quando se faz um novo estudo. Os factores que mais influenciam as características de um filme são: [64,68]

- ✓ Propriedades físico-químicas da substância anfifílica;
- ✓ Temperatura;
- ✓ Composição e pH da subfase;
- ✓ Pureza da subfase;
- ✓ Adição de iões estabilizantes.

• *Técnicas de caracterização dos filmes de Langmuir*

Pressão superficial

Nos estudos de filmes de Langmuir, a variável medida é a pressão superficial, que é definida como sendo a diminuição da tensão superficial produzida pela compressão da monocamada (equação 5).[64]

O processamento dos dados obtidos nos ensaios na balança de Langmuir permite uma representação gráfica da pressão superficial em função da área de superfície da subfase disponível por molécula. Esta representação gráfica é designada por isotérmica pressão

superficial-área (π-A). A isotérmica permite-nos fazer uma caracterização qualitativa da monocamada flutuante, baseada na forma que a isotérmica adquire.[75] A análise quantitativa da isotérmica é algo mais complicado de se obter, sendo esta realizada tendo como base alguns modelos teóricos que descrevem as transições de fase dos compostos que formam a monocamada. Contudo, estes estudos são mais vulgares em compostos como fosfolípidos ou ácidos gordos, sendo que, quando se pretende fazer uma análise quantitativa de isotérmicas correspondentes a filmes de Langmuir formados com outros composto, esta análise encontra-se limitada.[75]

A isotérmica π-A é o análogo bidimensional de uma isotérmica pressão-volume.[64,72] Podem ser definidas várias fases para a monocamada. A Figura 13 ilustra a isotérmica π-A de um fosfolípido em que diferencia as fases da monocamada.

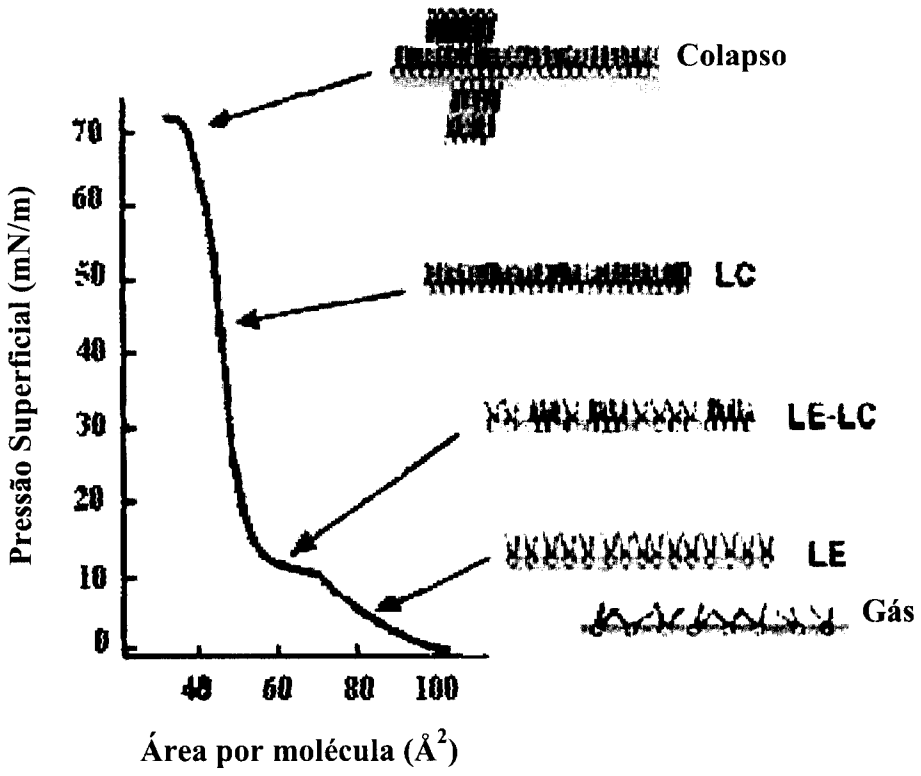


Figura 13 – Isotérmica π-A de um fosfolípido

Num estado inicial, as moléculas encontram-se muito afastadas, sendo mínimas as interacções intermoleculares. Como a área por molécula disponível é muito superior à que esta ocupa, a pressão superficial é praticamente nula. Esta fase é designada por *fase gasosa*, pois as moléculas comportam-se como um gás bidimensional, podendo por analogia com a equação dos gases perfeitos, estabelecer-se a seguinte relação:

$$\pi A = kT \qquad (6)$$

onde π é a pressão superficial, A é a área por molécula, k é a constante de Boltzmann ($1{,}381 \times 10^{-23}$ JK^{-1}) e T a temperatura absoluta.

Com a compressão mecânica do filme, a área de superfície disponível vai diminuindo progressivamente. Com aproximação das moléculas, atinge-se um ponto em que ocorre um aumento da pressão superficial mais acentuado, o que sugere uma alteração para a fase *líquido expandido (LE)*. Nesta fase, as moléculas adquirem uma conformação em que as cadeias carbonadas estão mais organizadas, devido às interacções intermoleculares.

Ao continuar a compressão do filme, a pressão superficial tende a aumentar mais rapidamente, estando as moléculas muito próximas, com as cadeias muito orientadas, sendo a presença de água entre as moléculas mínima. O filme torna-se mais rígido. Esta fase é designada de *líquido condensado (LC)*.

Por vezes, surge um patamar na isotérmica que corresponde a uma zona em que há coexistência das fases líquido expandido e líquido condensado (LE-LC) e que indica uma transição de fase de primeira ordem.[76]

O ponto máximo de compressibilidade que um filme pode atingir, é o ponto imediatamente antes ao momento do colapso. O *colapso* ocorre quando o ordenamento do filme é destruído, formando estruturas não monomoleculares desordenadas.[72] O filme perde irremediavelmente a forma de monocamada.

Pode-se, assim, definir a pressão de colapso como o valor máximo de pressão superficial atingida antes do colapso. Este valor varia de substância para substância, e depende de factores como a temperatura e a velocidade de compressão. Para velocidades mais baixas, as moléculas têm mais tempo para se reorganizarem. Assim se obtêm filmes com uma pressão de colapso mais elevada, o que corresponde a uma área por molécula mais reduzida.[64,68,73]

A descrição da isotérmica do fosfolípido baseia-se na classificação proposta por Harkins[64] em 1952, para a isotérmica de um ácido gordo. Contudo, trata-se de uma classificação simplista, que não tem em linha de conta as alterações que a isotérmica pode apresentar com a variação de determinados factores, como é o exemplo da temperatura.

Assim, poderemos ter duas isotérmicas da mesma substância anfifílica com comportamentos díspares, consoante a temperatura a que a substância foi sujeita na altura da medição. A pressão superficial aumenta, tendencialmente, com o aumento da temperatura, o que pode provocar o deslocamento, aparecimento ou desaparecimento de determinadas transições, como exemplificado na Figura 14.

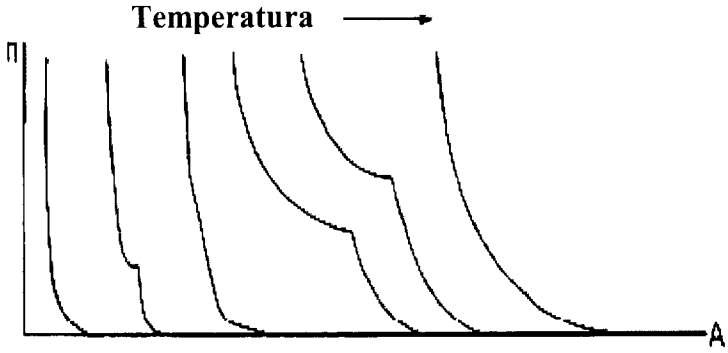


Figura 14 – Representação esquemática das alterações na isotérmica π-A com o aumento da temperatura[64]

Potencial de Superfície

O potencial de superfície de uma monocamada flutuante é definido como a diferença de potencial (ΔV) entre o filme presente na superfície da subfase aquosa e a subfase limpa. A interface ar/água é naturalmente polarizada devido à orientação espontânea das moléculas de água na zona da interface, em que os átomos de oxigénio se direccionam para o ar, originando uma diferença de potencial através da interface.[77] Com a presença de uma monocamada na interface, essa diferença de potencial é alterada devido à presença de dipolos eléctricos permanentes do material que compõem o filme.

O potencial é medido com uma sonda de Kelvin (Figura 15) ou um condensador vibrante, onde uma corrente é gerada por uma vibração de pequena amplitude de uma placa colocada a milímetros da interface. A superfície da água serve como referência, cujo potencial é determinado por uma placa metálica imersa na subfase. A diferença de potencial do sistema é ajustada a zero antes de formar o filme de Langmuir, sendo que a diferença de potencial obtida é referente apenas ao filme espalhado na interface.

A isotérmica ΔV-A é uma representação gráfica do potencial de superfície em função da área de superfície disponível por molécula. Ao interpretar o seu comportamento pode-se associar possíveis mudanças na orientação das moléculas que se encontram na interface de uma forma mais sensível do que através da isotérmica π-A. Contudo, na interpretação dos valores de ΔV de um composto, deve ter se em consideração que este parâmetro tem significados distintos quando as moléculas se encontram neutras ou carregadas. Uma vez que, quando a monocamada se encontra total ou parcialmente ionizada, o potencial tem uma nova

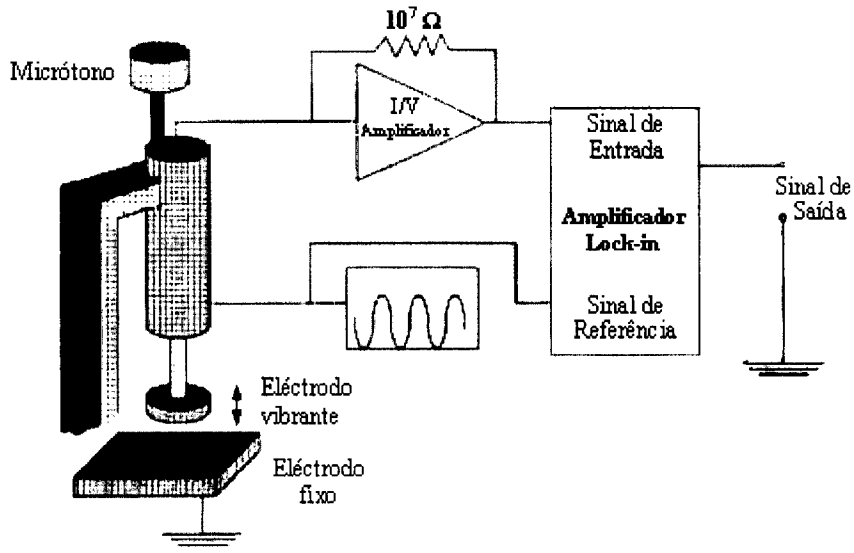


Figura 15 – Representação esquemática de uma sonda de Kelvin[78]

contribuição referente à dupla camada eléctrica de Gouy-Chapman (Ψ_0). O potencial de superfície de uma monocamada pode ser expresso da seguinte forma:

$$\Delta V = \frac{\mu_{\perp}}{A\varepsilon_0\varepsilon} + \psi_0 \qquad (7)$$

onde, $\mu_{\perp}$ é o componente vertical do momento de dipolo, A a área ocupada por uma molécula (nm^2), ε a permitividade da monocamada (assume-se ser 1) e ε_0 a constante dieléctrica do vazio ($8{,}854 \times 10^{-12}\ Fm^{-1}$).

O valor de Ψ_0 varia consoante o grau de ionização da monocamada, aumentando ou diminuindo os valores de potencial, dependendo da carga das moléculas ser positiva ou negativa. O grau de ionização da monocamada pode ser determinado a partir da equação de Gouy-Chapman:[79]

$$\psi_0 = \frac{2kT}{e}\sinh^{-1}\left(\frac{1.38\alpha}{A\sqrt{c}}\right) \qquad (8)$$

Sendo, k é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, e a carga do protão, α o grau de ionização da monocamada, A a área ocupada por uma molécula (nm^2) e c a concentração iónica ($mol.dm^{-3}$).

O potencial de superfície de monocamadas flutuantes tem sido analisado a partir do modelo de três camadas de Demchak e Fort (DF)[80]. Este modelo postula que o ΔV é composto por três contribuições independentes, da subfase, do grupo polar e da cadeia hidrofóbica, cada qual com um momento de dipolo efectivo e uma constante dieléctrica local (Figura 16).

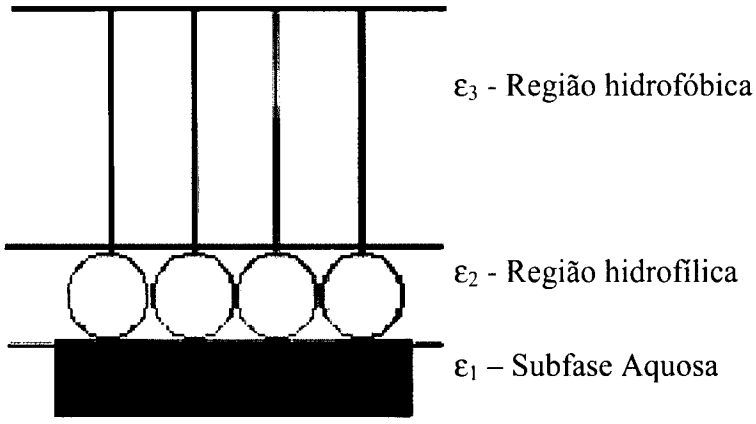


Figura 16 – Representação de um condensador de três camadas para uma monocamada condensada na interface ar/água[72]

O potencial de superfície é assim descrito como a soma das contribuições dos dipolos da água reorientada (μ_1; ε_1), dos dipolos da cabeça polar (μ_2; ε_2) e das cadeias hidrofóbicas que se posicionam na interface com o ar (μ_3; ε_3). É de ressalvar que μ_1, μ_2 e μ_3 referem-se à componente vertical do momento de dipolo ($\mu_\perp$). O potencial de superfície pode ser descrito por:

$$\Delta V = \frac{1}{A\varepsilon_0}\left(\frac{\mu_1}{\varepsilon_1} + \frac{\mu_2}{\varepsilon_2} + \frac{\mu_3}{\varepsilon_3}\right) + \psi_0 \qquad (9)$$

Para além do modelo teórico DF, outros modelos, tais como o de Helmholtz e o de Vogel-Möbius[81], estão disponíveis. Contudo, após serem revistos por Taylor[82], este autor concluiu que o modelo DF proporcionava uma boa estimativa da componente vertical do momento de dipolo ($\mu_\perp$), sendo os valores determinados por este modelo bastante próximos dos valores experimentais.[83]

O valor de $\mu_\perp$ experimental pode ser determinado através do potencial de superfície medido, utilizado a equação de Helmholtz:

$$\mu_\perp = (\Delta V - \Psi_0) \times \varepsilon_0 \varepsilon A \qquad (10)$$

Este tipo de tratamento quantitativo do potencial de superfície é possível para moléculas anfifílicas tais como fosfolípidos, ácidos gordos, entre outros. Contudo, este tratamento quantitativo não é possível de realizar, quando os filmes de Langmuir são formados por moléculas maiores ou polímeros, pois não se conhece a orientação correcta dos grupos que contribuem para a componente vertical do momento dipolar.[72]

Factor de compressibilidade

A compressibilidade é um parâmetro experimental importante que descreve o estado da monocamada, sendo uma característica importante nos filmes de Langmuir.[64,72] Esta pode ser calculada através da seguinte expressão:

$$k = -\frac{1}{A}\left(\frac{\partial A}{\partial \pi}\right)_{T,P,n} \tag{11}$$

Esta relação é proporcional à inclinação da isotérmica π-A, ou seja, quanto maior o aumento de pressão de superfície devido à compressão, menor será a compressibilidade do filme. Desta forma é possível determinar o quanto uma monocamada é susceptível à compressão. Analisando a forma da isotérmica pode-se identificar diferentes regiões de compressibilidade.

1.2.4. Propriedade Termodinâmicas dos Filmes de Langmuir

As propriedades termodinâmicas, como a entalpia e entropia de compressão dos filmes, podem ser determinadas a partir da isotérmica pressão superficial-área. Para esse efeito surgiram dois modelos distintos.[68, 84]

- ***Modelo de cálculo da Energia de Gibbs de compressão ΔG_c (∏)***

Este modelo proposto por Goodrich em 1957, permite determinar ΔG_c (∏) através do cálculo do integral:

$$\Delta G_c(\pi) = \int_{\pi_i}^{\pi} A(\pi)\, d\pi \tag{12}$$

Este integral tem como variável independente a pressão superficial (∏) e variável dependente a área de superfície por molécula (A). Uma forma prática para calcular a energia de Gibbs de compressão, a partir deste integral, é utilizar a regra do trapézio.

Ao calcular ΔG_c para várias temperaturas (T) é possível determinar dois parâmetros termodinâmicos da compressão: a entalpia (ΔH_c) e a entropia (ΔS_c), aplicando a seguinte expressão:

$$\Delta G_c(\pi) = \Delta H_c(\pi) - T\Delta S_c(\pi) \tag{13}$$

Por ajuste linear, ao representar graficamente ΔG_c em função da temperatura (expressa em Kelvin), obtêm-se os valores de ΔH_c e ΔS_c que correspondem, respectivamente, à ordenada na origem e ao declive.[68,84]

- ***Modelo de cálculo da Energia de Helmholtz de compressão ΔF_c (A)***

Em 1970, Gershfeld propôs, como modelo alternativo, o cálculo da energia de Helmholtz de compressão, partindo do seguinte integral:

$$\Delta F_c(\mathrm{A}) = \int_{\mathrm{A}_l}^{\mathrm{A}} \pi(\mathrm{A}) d\mathrm{A} \tag{14}$$

Neste integral, a variável independente é a área por molécula, e a variável dependente é a pressão superficial. O modo de cálculo do integral é igual ao utilizado no modelo anterior.

Através do cálculo de ΔF_c para diferentes temperaturas, é possível determinar ΔH_c e ΔS_c, utilizando a expressão:

$$\Delta F_c(\mathrm{A}) = \Delta \mathrm{H}_c(\mathrm{A}) - T\Delta S_c(\mathrm{A}) \tag{15}$$

A entalpia e a entropia de compressão são determinadas por ajuste linear da representação gráfica de ΔF_c em função da temperatura (expressa em Kelvin).[68,84]

1.2.5. Miscibilidade das monocamadas flutuantes

A miscibilidade indica a capacidade de dois ou mais componentes de uma monocamada se misturarem.

O estudo da miscibilidade das monocamadas flutuantes baseia-se na isotérmica π-A e nas propriedades termodinâmicas dos seus componentes.

Quando os componentes de uma monocamada são miscíveis, o valor máximo de compressão do filme depende da sua composição. Ao analisar a isotérmica de uma monocamada, verifica-se que, quando os seus componentes são miscíveis, as pressões superficiais na transição de fases variam consoante a concentração dos constituintes. Se as pressões superficiais de transição forem independentes da composição da monocamada, é porque os seus componentes são imiscíveis.[51] A Figura 17 exemplifica as alterações que uma isotérmica π-A pode sofrer para misturas miscíveis (c) e para misturas imiscíveis (d).

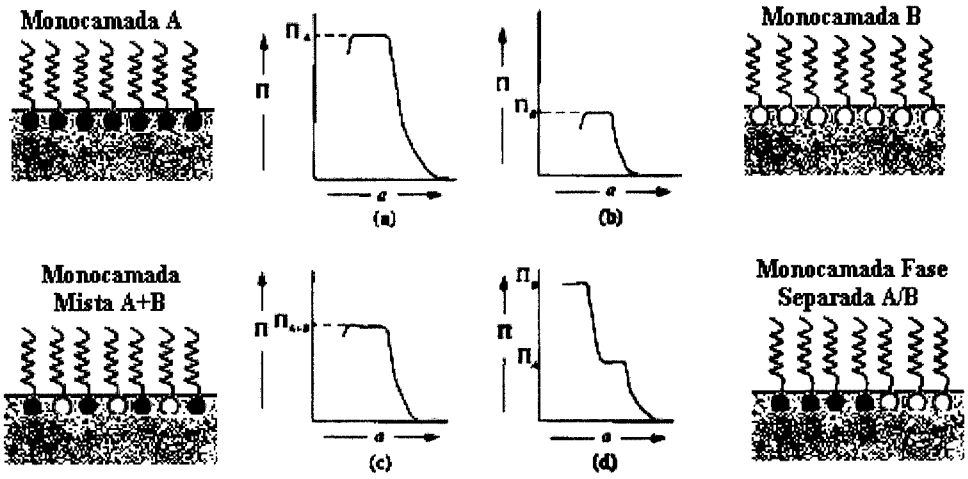


Figura 17 – Isotérmicas π-A para um componente puro (a e b) e para a mistura de dois componentes quando miscíveis (c) ou imiscíveis (d) [85]

A miscibilidade numa monocamada pode ser avaliada por via matemática. Numa mistura ideal (ou imiscibilidade total), a área média por molécula vai corresponder à soma da contribuição de cada um dos componentes, o que se reflecte na seguinte expressão[62]:

$$A_{12} = A_1\chi_1 + A_2\chi_2 \qquad (16)$$

onde A_{12} é a área média por molécula da mistura, A_1 e A_2 são as áreas por molécula de cada um dos componentes, e χ_1 e χ_2 são as fracções molares dos componentes.

Quando a mistura não tem um comportamento ideal, a área média por molécula não obedece à regra da aditividade representada na expressão 17, sendo necessário determinar a área em excesso, A_{ex}:

$$A_{ex} = A_{12} - (A_1\chi_1 + A_2\chi_2) \qquad (17)$$

No gráfico da fracção molar em função da área por molécula, o comportamento ideal da mistura ou a imiscibilidade total dos componentes é representado por uma linha recta. Quando os componentes são miscíveis ou o comportamento da mistura é não-ideal, verifica-se um desvio em relação a essa recta.

Os desvios à linearidade podem ser positivos, ou seja, A_{ex} é maior que zero. Neste caso, as interacções entre os dois componentes são mais fracas do que as interacções entre moléculas iguais, ocorrendo repulsão entre as moléculas dos dois componentes; os constituintes da mistura são considerados imiscíveis.

Quando os desvios à linearidade são negativos, A_{ex} são negativos, e as interacções entre os dois componentes são atractivas, logo são considerados miscíveis. Assim, as

monocamadas que resultam da mistura dos dois componentes são mais compactas do que as monocamadas dos componentes puros (Figura 18).[62, 68, 86]

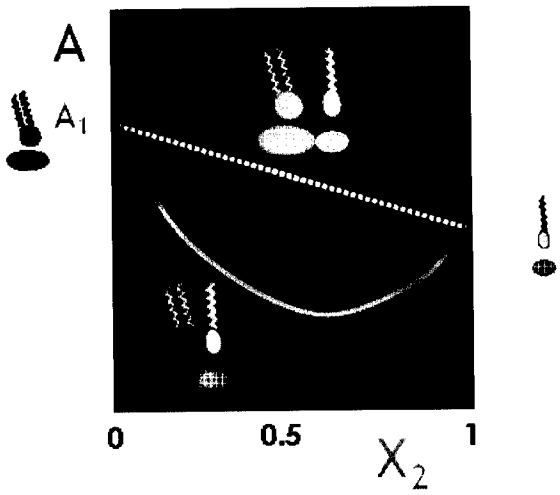


Figura 18 – Efeito da miscibilidade entre dois componentes na área por molécula, em função da fracção molar (mistura ideal; — interacção atractiva entre dois componentes)[71]

Do ponto de vista termodinâmico, a interacção entre dois componentes é analisada em termos do excesso da energia de Gibbs, ΔG_{ex}.[84] O excesso de energia pode ser avaliado directamente a partir da isotérmica π-A, pela expressão:

$$\Delta G_{ex} = \int_0^{\pi} [A_{12} - (\chi_1 A_1 + \chi_2 A_2)] d\pi \qquad (18)$$

A representação gráfica de ΔG_{ex} em função da composição da mistura, fornece informação acerca das proporções dos componentes mais estáveis[68]. Para essas proporções, ΔG_{ex} apresenta valores negativos, sugerindo forças de atracção fortes entre os componentes da mistura. O valor mínimo de ΔG_{ex} corresponde à proporção mais estável.[84] Quando ΔG_{ex} é zero, não há interacções entre os componentes.

1.2.6. Filmes de Langmuir-Blodgett

Os filmes de Langmuir-Blodgett pressupõem a transferência das monocamadas flutuantes para um suporte sólido. O processo de transferência é designado por deposição.

Para garantir a qualidade do filme, a deposição é realizada mantendo a pressão superficial constante, previamente determinada. Assim, à medida que a deposição decorre as

barreiras vão comprimindo a monocamada, desta forma as variações da área superficial disponível são compensadas (Figura 19).

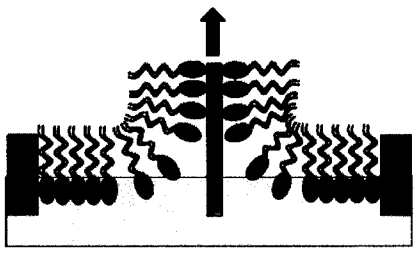


Figura 19 – Ilustração da deposição de uma monocamada flutuante num substrato sólido

A deposição pode ser efectuada em dois tipos de substratos distintos: substratos hidrofóbicos, como o ouro; e substratos hidrofílicos, como o vidro, o quartzo e a sílica.[64,68]

Geralmente, a deposição é feita na fase condensada, na qual temos as moléculas da monocamada muito próximas, assegurando, deste modo, coesão suficiente para uma transferência eficiente do filme. A pressão superficial ideal é definida de forma empírica, dependendo da natureza da monocamada. Contudo, o sucesso da deposição da monocamada dificilmente será assegurado para valores de pressão superficial inferiores a 10 $mN.m^{-1}$ ou superiores a 40 $mN.m^{-1}$.

Como há uma monitorização constante da pressão superficial da monocamada e da redução de área disponível, é possível determinar a razão de transferência de um filme, podendo, assim, conjectura-se acerca da qualidade da transferência.

$$R = \frac{\text{área coberta do slide}}{\text{área de filme perdida na tina}} \qquad (19)$$

Se todo o filme que se perdeu na tina foi transferido para o slide, então o valor da razão de transferência é 1, ou seja, representa 100%. Na prática, este valor pode apresentar-se ligeiramente mais baixo, pois é difícil ter uma transferência total (100%) da monocamada.

A qualidade dos filmes de Langmuir-Blodgett pode ser afectada por diversos factores, sendo os mais importantes: [64,73]

- ✓ Natureza da dispersão do filme sobre a subfase;
- ✓ Composição e temperatura da subfase;
- ✓ Pressão superficial na deposição;
- ✓ Velocidade de deposição;
- ✓ Natureza do suporte sólido;
- ✓ Tempo que o suporte permanece ao ar ou na subfase entre ciclos de deposição.

• *Tipos de Deposição*

A deposição pode ser realizada de diferentes formas, dependendo do substrato e do modo como o substrato passa pela interface. O processo de deposição e os principais tipos de filmes de Langmuir-Blodgett encontra-se esquematizado na Figura 20.

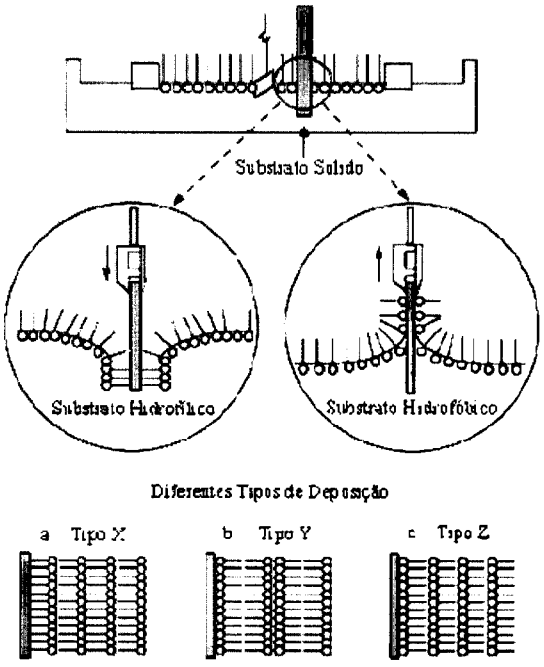


Figura 20 – Esquema da deposição de uma monocamada em um substrato sólido. Principais tipos de Filmes de Langmuir-Blodgett[87]

Deposição tipo X – esta estrutura é obtida ao utilizar-se um substrato hidrofílico, fazendo o slide mergulhar na subfase e, posteriormente, fazendo-o submergir. No filme de tipo X, a monocamada é depositada apenas na descida do substrato.[64,68,87]

Deposição tipo Y – os filmes do tipo Y são depositados em substratos hidrofóbicos. A primeira camada é depositada ao elevar-se o slide, por isso é necessário submergir o substrato na subfase antes de formar a monocamada flutuante. Este tipo de estrutura é o mais comum e representativo das membranas biológicas naturais.[64,68,87]

Deposição tipo Z – as estruturas do tipo Z ocorrem quando se utilizam suportes hidrofóbicos e a deposição é efectuada apenas na subida do substrato.[64,68,87]

1.2.7. Componentes dos Filmes

Os filmes em estudo são compostos por tipos de componentes bastante distintos: fosfolípidos (DPPC) e nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina.

- ***DPPC***

O DPPC ou dipalmitoil-fosfatidilcolina é um fosfolípido. Os fosfolípidos são moléculas anfifílicas constituídas por um grupo polar ligado a duas cadeias carbonadas de ácido gordo (Figura 21).

No caso do DPPC, a "cabeça" polar é constituída por uma molécula de glicerol e um álcool fosforilado – a colina – pertencendo ao grupo das fosfatidilcolinas ou lecitinas (PC). A primeira parte do nome do DPPC – dipalmitoil – advém do tamanho da cadeia carbonada, por analogia ao ácido gordo com o mesmo número de átomos de carbono. Como as cadeias carbonadas do DPPC têm 16 átomos de carbono, o nome dipalmitoil é derivado do ácido palmítico.

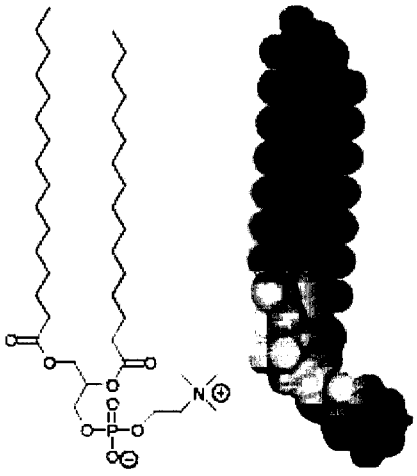


Figura 21 – Estrutura do DPPC[88]

Os fosfolípidos, ao serem constituídos por um grupo hidrofílico (cabeça), ligado a duas cadeias apolares com características hidrofóbicas, podem apresentar várias conformações quando na presença de soluções polares, como é o exemplo da água. As conformações que podem apresentar favorecem o isolamento das cadeias carbonadas, estando assim protegidas da solução. Neste trabalho pretende-se estudar a monocamada formada na superfície da água, em que a cabeça polar se encontra na solução aquosa e as cadeias carbonadas estão no ar. Os fosfolípidos podem ordenar-se noutras formas, dependendo da

orientação centrípeta das cadeias carbonadas, tal como bicamadas em folha, micelas ou lipossomas (Figura 22).

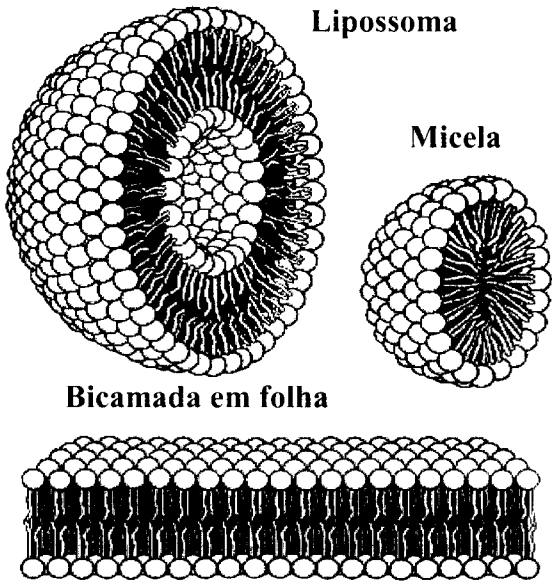


Figura 22 – Possíveis auto-organizações dos fosfolípidos[89]

Os fosfolípidos apresentam características estruturais que os tornam alvo dos mais diversos estudos. É de realçar os estudos de mono e bicamadas de fosfolípidos, que representam modelos simplificados das membranas biológicas.[68, 86]

- ***Nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina***

As nanopartículas de ouro utilizadas na formação da monocamada flutuante, estão estabilizadas por moléculas de oleamina. A síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina em meio aquoso foi desenvolvida por Aslam e colaboradores.[19]

Na síntese das nanopartículas de ouro, a oleamina desempenha um duplo papel, actuando como agente redutor e, simultaneamente, como agente estabilizante das nanopartículas.

Como já fora referido no subcapítulo 1.1, as nanopartículas adquirem diferentes propriedades consoante o seu revestimento. Assim, torna-se imperativo a referência à oleamina.

A oleamina é uma amina de cadeia longa (Figura 23), que pode apresentar um comportamento anfifílico.

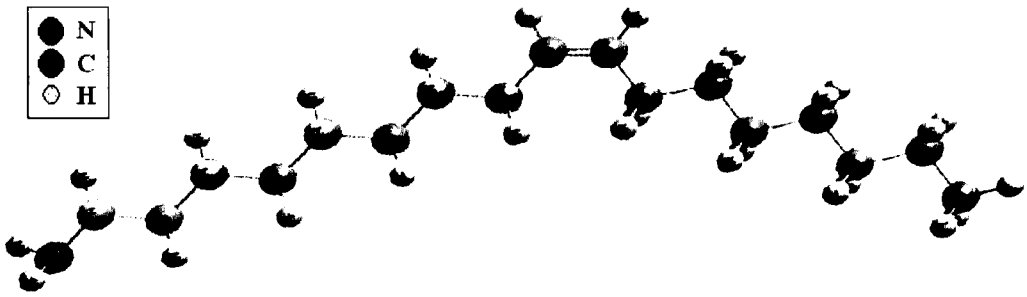


Figura 23 – Estrutura da oleamina (OLA)

A oleamina é uma das aminas de cadeia longa usada em surfactantes para produção de fungicidas, desinfectantes, conservantes de madeira, amaciadores de roupa, detergentes, lubrificantes, agentes dispersivos, inibidores de corrosão, agentes de tratamentos de água e ainda como emulsionantes do asfalto.[90] Na Tabela 1 estão apresentadas algumas das propriedades físico-químicas da oleamina.

Tabela 1 – Algumas Propriedades Químicas e Físicas da Oleamina[90]

Propriedade Físico-químicas	
Massa Molecular	267,50 $g.mol^{-1}$
Ponto de Fusão	17-27 °C
Ponto de Ebulição	348-350 °C
Densidade	0,813
Ponto de Combustão	170 °C
pKa Aparente	9

CAPÍTULO II

Execução Experimental

Neste capítulo é descrito o método de síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina e as técnicas experimentais utilizadas para a caracterização destas nanopartículas. Na segunda parte deste capítulo é descrito o procedimento utilizado no estudo de filmes de Langmuir e LB.

2.1. Instrumentação e Reagentes

A Tabela 2 sintetiza o material e instrumentação, tal como suas principais especificações, utilizada ao longo do estudo das nanopartículas de ouro, desde a sua síntese à sua imobilização em substratos de mica.

Tabela 2 – Lista de material e instrumentação utilizados no estudo das AuNPs

Material / Instrumentação	*Especificações / Marcas*
Balança analítica	Mettler AE 100
Centrifugadora	VWR – Galaxy 16DH
Espectrómetro UV-VIS	Hitachi U-3000
Placa de Aquecimento com agitação	Heidolph Me 3001
TEM	Jeol 2200 FS
Termómetro	250,0 ± 0,5°C
AFM	Molecular Imaging PicoLE
Balança de Langmuir (Figura 24)	KSV Minitrough
Banho termostático	Jubalo Labortechanik Gmh F12
Barreiras	Teflon®
Bomba de Aspiração	Mini Laboratory Pumps – LABOPORT®
Câmara de Fluxo Laminar	Bio Air Instruments, Aura VF48
Slides de Mica	SPI Supplies (75x25x0,26 mm)
Microseringas	SGE (25, 50 μL)
Papel de Filtro	Perímetro = 20,00 mm
Pincel de silicone	———
Tina	Mini: 365x75x5 mm; Teflon®
Micropipetas	Eppendorf (50,100, 1000 μL)
Luvas de nitrilo sem pó	SAFE SKIN®

Na Figura 24 pode-se visualizar a balança de Langmuir, instrumento base para a formação de monocamadas flutuantes e de filmes LB.

Figura 24 – Fotografia da Balança de Langmuir Minitrought utilizada.

A Tabela 3 lista os reagentes que foram utilizados ao longo do estudo desenvolvido. A tabela encontra-se subdividida, na primeira parte estão referenciados os reagentes utilizados na síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina, e na segunda são apresentados os reagentes usados no estudo de filmes de Langmuir.

Tabela 3 – Lista de reagentes utilizados no estudo das AuNPs

Reagentes	*Marca*	*Pureza*
Acetona	Pronalab	—
Água ultrapura	Millipore	18 MΩ.cm
$HAuCl_4$	Sigma – Aldrich	99,90%
Oleamina	Aldrich	70%
Ácido acético glacial	Pronalab	p.a.
Ácido cítrico	Merck	p.a.
Ácido fosfórico	Aldrich	85%
$C_2H_3NaO_2$	Riedel-de-Haën	p.a.
$C_2H_5Na_3O_7.2H_2O$	Fluka	99%
Clorofórmio	Riedel-de-Haën	p.a.
DPPC	Sigma	99%
Etanol	Aga	96%
KH_2PO_4	Merck	99,50%
$Na_2HPO_4.2H_2O$	Merck	p.a.
$Na_3PO_4.12H_2O$	Merck	p.a.

2.2. Síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina

Preparou-se 90 mL de uma solução de $HAuCl_4$ 10^{-3} M, que se aqueceu até atingir os 80 °C. Adicionou-se 10 mL de uma solução de oleamina (OLA) 10^{-3} M, à solução de $HAuCl_4$, com agitação constante. Ao efectuar-se a mistura, ocorreu uma mudança subtil de coloração, passando de um amarelo brilhante (característico de uma solução aquosa de sal de ouro) para um amarelo opaco, que ao longo do tempo e com a agitação vigorosa, começou a escurecer, até obter uma solução coloidal vermelho rubi.

A solução coloidal foi centrifugada a uma velocidade de 40.000 rpm, por largos períodos de tempo. Todavia, o processo de separação de um precipitado da solução sobrenadante era muito moroso e pouco efectivo. Deste modo, para obter um produto final sólido, recorreu-se à centrifugação das partículas maiores e quando a centrifugação deixou de ser eficaz, procedeu-se à evaporação do solvente da solução sobrenadante que apresentava uma coloração levemente rosada.

2.3. Estudo de Filmes de Langmuir e LB

2.3.1. Preparação de Soluções Tampão

Todas as soluções tampão foram preparadas tendo como base as expressões para cálculo de pH das soluções tampão referenciadas na sebenta *"Tabelas e Formulários de Química"* do Prof. Doutor João Cabral.[91]

Para calcular o volume de ácido fosfórico concentrado a usar na preparação dos tampões de pH 1 e 2 utilizou-se a expressão específica para os ácidos não muito forte:

$$pH = \frac{1}{2} pKa - \frac{1}{2} \log a \qquad (20)$$

sendo *pKa* referente à primeira constante de dissociação do ácido fosfórico (pKa_1 = 2); e *a* à concentração da solução tampão.

Na preparação dos restantes tampões (4 ≤ pH ≤ 12), os cálculos das massas de reagentes foram efectuados através da expressão relativa à mistura de ácidos e bases conjugados:

$$pH = pKa + \log\left(\frac{b}{a}\right) \tag{21}$$

Onde o valor *pKa* pode ser relativo à segunda ou terceira constante de dissociação do ácido fosfórico (pKa_2 = 6,72 e pKa_3 = 11,74) dependendo do pH pretendido; *a* corresponde à espécie ácida e *b* à espécie básica.

Na Tabela 4 estão representados os dados referentes à preparação das soluções tampão.

Tabela 4 – Lista das soluções tampão usadas como subfase no estudo de filmes de Langmuir

pH	*pKa*	*Reagentes*		$V_{balão}$ *(mL)*
		A	*B*	
2	2	H_3PO_4	—	250,0
4,5	6,72	KH_2PO_4	$Na_2HPO_4.2H_2O$	
7				
8				
9	11,74	$Na_2HPO_4.2H_2O$	$Na_3PO_4.12H_2O$	
10				
12				

Após determinar a massa de reagente necessária para cada tampão, procedeu-se à sua preparação, dissolvendo a quantidade necessária dos reagentes em água e perfazendo o volume de 250 mL. A medição do pH das soluções foi realizada imediatamente antes de estas serem utilizadas como subfase no estudo dos filmes de Langmuir.

O sensor de pH utilizado na medição vem incorporado na balança de Langmuir. A calibração do sensor de pH foi realizada com duas soluções tampão Fixanal® da Riedel-de-Haën de pH 4 e 10.

2.3.2. Estudo de Filmes de Langmuir

A técnica de Langmuir é uma técnica muito sensível a qualquer indício de contaminação, logo a limpeza do material é um procedimento a ter em conta, sendo uma operação da maior importância. Por esta razão, todo o manuseamento de material é feito usando luvas de nitrilo sem pó.

Antes de qualquer experiência, a tina, as barreiras de compressão e o sensor de temperatura são lavados, abundantemente, com etanol e posteriormente com água *Millipore*, utilizando-se um pincel de silicone para auxiliar o processo de limpeza.

Todos compostos utilizados para formar a monocamada são dissolvidos em clorofórmio com uma concentração de 1,3 mg/mL, e guardados no frigorífico a 4 °C.

- ***Compressão da Monocamada***

Após a limpeza do material, este é colocado nas devidas posições da balança de Langmuir.

Coloca-se na tina, 250 mL da solução tampão pretendida para subfase e procede-se ao isolamento da área experimental, fechando a câmara de fluxo laminar.

Os estudos foram realizados ajustando a temperatura do banho termostático acerca de 20 °C. Quando a temperatura estabiliza, verifica-se se a tina está completamente isenta de contaminantes, efectuando a compressão das barreiras. Se o valor da pressão superficial for inferior a 0,10 $mN.m^{-1}$, a experiência é realizada, caso a pressão superficial exceda esse valor, a balança apresenta sinais de impurezas, sendo necessário proceder a uma nova limpeza. O teste à limpeza da balança é impreterivelmente realizado antes de colocar qualquer tipo de substância, tanto na subfase como à sua superfície. Após verificar que o sistema está totalmente limpo é estabelecido um novo "zero" para o potencial de superfície, de modo a anular a contribuição da subfase.

Posteriormente, espalha-se na superfície da subfase, com uma micro-seringa, um determinado volume da solução pretendida, este processo deve ser efectuado com bastante cuidado, para que as moléculas se mantenha à superfície e evitando espalhar perto do papel de filtro e das extremidades da tina. De referir que a solução a colocar na superfície da subfase deve-se encontrar à temperatura ambiente, na altura de ser colocada na superfície da subfase, por esta razão deve ser, previamente, retirada do frigorífico. A micro-seringa é lavada repetidas vezes, usando dois frascos contendo clorofórmio, antes e depois, de ser utilizada.

O sistema fica em repouso durante 30 minutos, para que ocorra a evaporação do solvente, permitindo que o composto se espalhe por toda a superfície, formando uma monocamada flutuante.

Dava-se início à compressão das barreiras, a uma velocidade constante de 10 mm/min. As condições experimentais são definidas no software da *KSV Instruments Ltd*, que ao longo da experiência, vai delineando a isotérmica de compressão característica da monocamada formada. Do mesmo modo, o potencial de superfície do filme de Langmuir é medido, utilizando para tal o medidor de potencial SPOT-1 (*KSV Instruments Ltd*).

No final da experiência, procede-se à aspiração da monocamada que se encontra entre as barreiras utilizando a bomba de vácuo. A restante solução da subfase é aspirada após a abertura das barreiras. Todo o material é lavado com água *Millipore* e etanol, como na fase inicial do trabalho.

Na Tabela 5 estão representados alguns parâmetros que se mantém constantes ao longo do estudo de filmes de Langmuir.

Tabela 5 – Dados comuns a todas experiências de Langmuir

Vel_{comp} (mm/min)	$V_{subfase}$ (mL)	Temperatura (°C)
10,0	250,0	20,0 ± 0,4

- ***Estudos realizados na interface ar/água***

✓ *Estudo de Monocamadas de Nanopartículas de Ouro estabilizadas com oleamina (OLA-AuNPs)*

Neste estudo foi colocado um determinado volume de nanopartículas de ouro diluídas em clorofórmio com concentração 1,3 mg/mL na superfície da subfase. Os volumes de nanopartículas utilizados nos diversos ensaios variavam de 10 a 20 μL.

✓ *Estudo de Monocamadas de OLA*

O procedimento levado a cabo neste estudo foi similar ao estudo de monocamadas de nanopartículas de ouro. A solução de oleamina utilizada foi diluída em clorofórmio, sendo a sua concentração 1,3 mg/mL. Os volumes de OLA utilizados nos diferentes ensaios variavam de 5 a 20 μL.

✓ *Estudo da Interacção de Filmes de DPPC com Np Au-OLA*

Este estudo pode ser dividido em duas partes. Inicialmente, estudou-se o comportamento de monocamadas constituídas apenas com DPPC, sendo que na subfase (tampão fosfato) se encontrava diluído um volume de 60 μL de OLA-AuNPs.

Numa segunda fase estudou-se o comportamento de monocamadas mistas, compostas por DPPC e nanopartículas de ouro. Neste estudo, foi adicionado um volume de 15 μL de cada um dos componentes, sendo a concentração de ambos 1,3mg/mL e o solvente utilizado o clorofórmio.

2.3.3. Estudo de Filmes Langmuir-Blodgett

Os filmes LB de OLA-AuNPs foram preparados por deposição da monocamada flutuante num substrato de mica, após a sua compressão até determinada pressão superficial.

A mica é composta por várias camadas que possuem cargas negativas à sua superfície. Antes de depositar um filme na mica, a camada exterior era retirada com fita-cola, de modo a garantir a tua limpeza do substrato.

A deposição foi realizada a diferentes pressões de superfície de modo a obter filmes com diferentes níveis de organização e em que a subfase teria diferentes valores de pH. Como a deposição de filmes de nanopartículas é um processo delicado, a velocidade a que o substrato foi mergulhado teve que ser baixa de modo a não ocorrer a destabilização da monocamada, assim escolheu-se uma velocidade constante de 5 mm/minuto.

2.4. Técnicas de Caracterização Complementares

2.4.1. Técnicas de caracterização das AuNPs sintetizadas

- ***Espectroscopia de UV-VIS***

Esta é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de nanopartículas, pois permite determinar a sua banda de absorção UV-Vis. A posição do máximo e a intensidade da banda fornecem informação qualitativa sobre a dimensão e forma das nanopartículas.

A técnica de espectroscopia UV-Vis é crucial para detectar, de forma rápida, se as soluções contendo nanopartículas de ouro se mantém estável com o tempo. Detectando pequenas alterações de cor, que são praticamente imperceptíveis apenas por análise visual, e que são sintomas de que a solução coloidal começa a sofrer processos de agregação, que podem influenciar alguns estudos em que são utilizadas as nanopartículas.

Procedimento experimental: diluiu-se 100 vezes a solução coloidal de nanopartículas de ouro, de modo a garantir uma banda espectral bem definida e sem sinais de saturação. Na análise foram utilizadas células de quartzo com 1cm de largura. A medição foi realizada numa janela varrimento de comprimentos de onda de 300 a 800 nm. Na Figura 25 pode-se visualizar o espectrofotómetro utilizado para traçar o espectro electrónico das AuNPs.

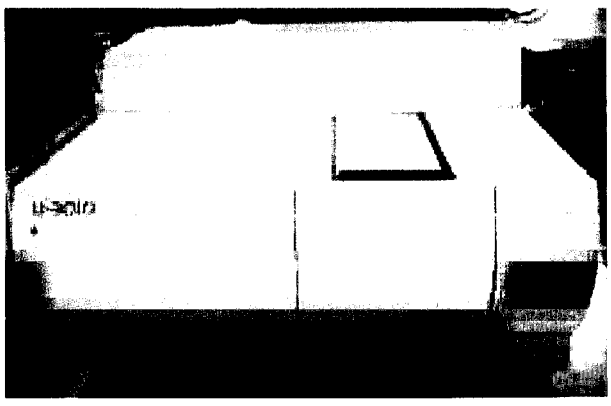


Figura 25 – Aspecto do Espectrofotómetro UV-Vis Hitachi U-3010

• *Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM)*

A microscopia de transmissão electrónica é uma técnica de caracterização que permite obter informações acerca da microestrutura, morfologia e distribuição de tamanhos das partículas.

O microscópio electrónico de transmissão é constituído por uma coluna vertical, em vácuo (Figura 26), que é percorrida por um feixe de electrões e que possui um conjunto de lentes electromagnéticas que controlam o feixe. Os electrões saem da amostra com uma distribuição de intensidade e direcção características da difracção sentida. A dispersão dos electrões ocorre em função da espessura e da densidade molecular do objecto e depende, em particular, do número atómico dos átomos que entram na composição da amostra.

Em seguida, a objectiva produz a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes electrónicos difractados. A imagem é aumentada por acção das outras lentes e projectada em película fotográfica ou captada num CCD.

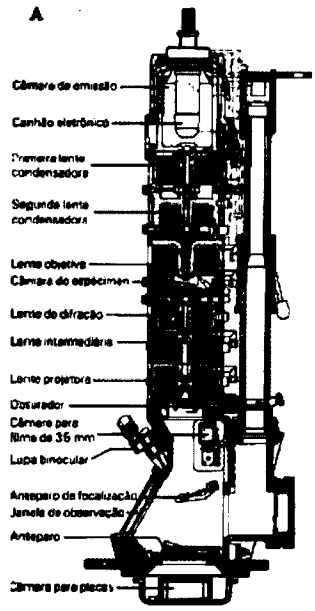


Figura 26 – Representação esquemática do aspecto da coluna do TEM

Em TEM, a imagem observada é a projecção da espessura de um determinado material, que não é coincidente com o observado à superfície do respectivo material. A amostra deve ser electronicamente transparente, de modo a transmitir um número suficiente de electrões de modo que a intensidade com que atinge o ecrã seja suficiente para fornecer uma imagem interpretável.

Na Figura 27, verifica-se que ocorre a projecção de linhas, áreas e volumes, podendo ocorrer sobreposições.

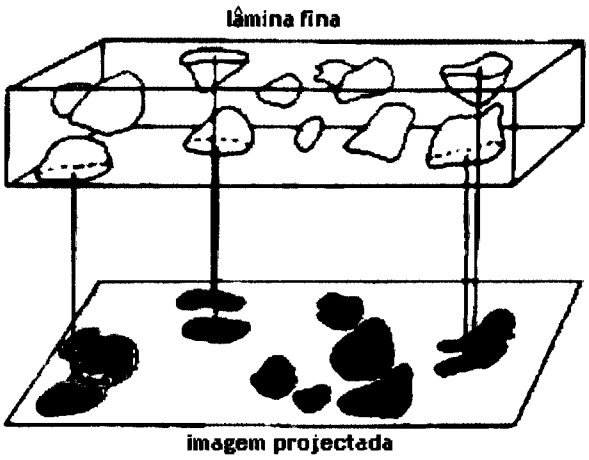


Figura 27 – Projecção de várias microestruturas presentes na lâmina fina de material analisado[18]

Procedimento experimental: uma amostra da solução coloidal foi analisada num microscópio electrónico de transmissão com potencial de aceleração de 200 keV (Figura 28).

Para isso foi colocada uma pequena porção de solução diluída de nanopartículas de ouro numa grelha Formvar de cobre recoberta por um filme de carbono. Depois de evaporar a amostra, esta é visualizada no TEM e projectada em película fotográfica.

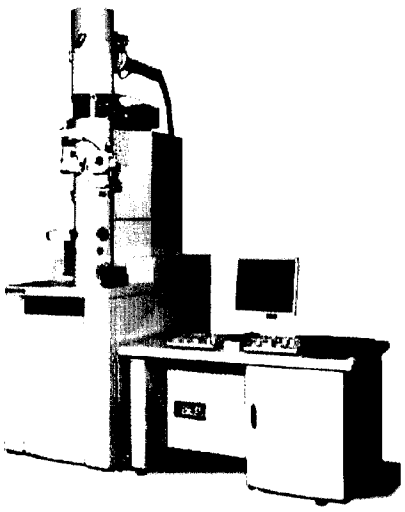


Figura 28 – Aspecto exterior do microscópio electrónico de transmissão (JEOL, modelo JEM 2200 FS)[17]

- ***Potencial Zeta***

O potencial zeta é uma propriedade física exibida por qualquer partícula numa suspensão, que é o caso das nanopartículas de ouro em meio aquoso.

Para definir o potencial zeta é necessário compreender como é que uma partícula carregada se comporta em meio aquoso. O modelo da dupla camada eléctrica postula que quando uma partícula tem uma superfície electricamente carregada há uma interacção entre a superfície e a fase aquosa, fazendo com que a superfície atraia uma quantidade de iões de carga oposta (contra-iões), surgindo assim uma dupla camada eléctrica a rodear a partícula.[92]

A dupla camada eléctrica (Figura 29) é constituída por uma primeira camada (Camada de Stern) onde os contra-iões estão fortemente ligados à superfície da partícula. A segunda camada, designada por camada difusa, é formada, igualmente, por contra-iões que são atraídos pela partícula mas que, devido à repulsão dos contra-iões que se encontram na camada de Stern, não estão firmemente ligados ao colóide. Nesta camada difusa há uma diminuição gradual da atracção à partícula, com a distância dos contra-iões, podendo surgir alguns co-iões (iões com a mesma carga da partícula) com o afastamento ao colóide.[92]

Na camada difusa surge uma notória fronteira em que os iões que estão na parte interior formam uma entidade estável com a partícula (isto é quando esta se move os iões movem-se com ela) e os iões que estão para além dessa fronteira têm um comportamento independente da partícula. O potencial dessa fronteira é designado de *potencial zeta* (Figura 29) e mede o potencial de uma partícula em movimento livre num líquido.[92]

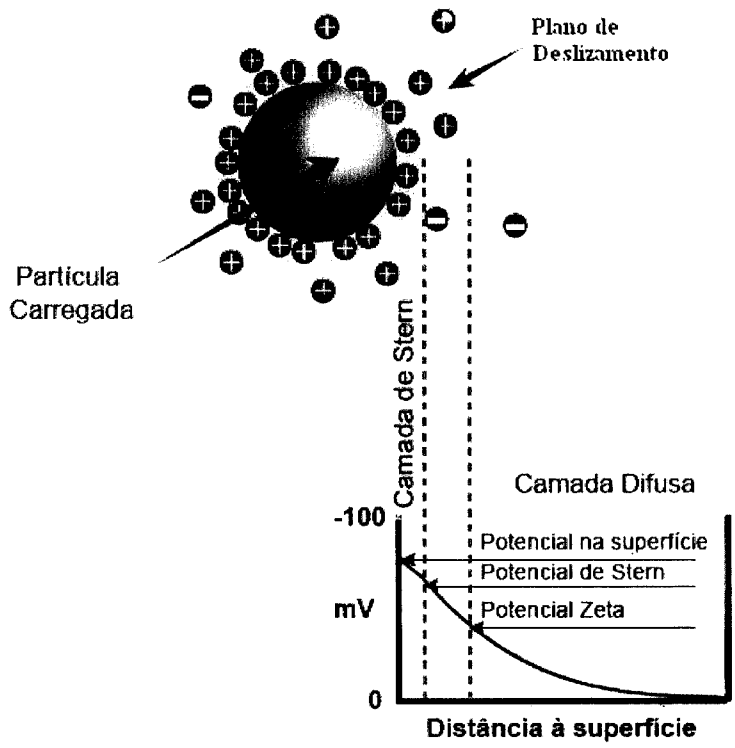


Figura 29 – Representação da dupla camada eléctrica e da variação do potencial zeta com a distância de uma partícula carregada negativamente[92]

O potencial zeta é um bom índice da estabilidade de sistemas coloidais, sendo, normalmente, considerado um sistema estável quando as medidas de potencial são superiores a ± 30 mV. É de referir que um valor de potencial zeta só terá sentido, quando é associado a um determinado pH e à descrição do ambiente. Isto porque se trata de uma medida que é fortemente afectado pelo pH, força iónica e da natureza do dispersante.

A electroforese é uma das técnicas frequentemente utilizadas na medição do potencial zeta (ζ). Através desta técnica mede-se a mobilidade electroforética das partículas quando estas são sujeitas a um campo eléctrico, isto é mede-se a velocidade a que as partículas com superfície carregada se movem para um eléctrodo de carga oposta.

A mobilidade electroforética (ν) pode ser convertida em potencial zeta a partir da relação Helmholtz-Smoluchowski. [92]

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\nu}{\varepsilon_r\varepsilon_0} \tag{22}$$

onde η é a viscosidade do meio dispersante, ε_r é a constante dieléctrica e ε_0 é a permissividade do ar ($8{,}854 \times 10^{-12}$ C^2 J^{-1} m^{-1}). A mobilidade electroforética é expressa em $\mu ms^{-1}/v.cm^{-1}$, logo as unidades do potencial zeta são mV.

Procedimento experimental: As medidas dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas em suspensão foram obtidas por medidas de espalhamento da luz (DLS), e os valores de potencial zeta foram calculados usando medidas de mobilidade electroforética realizadas num equipamento Zetasizer Nano ZS, da Malvern Instuments. Este equipamento é bastante sensível e versátil permitindo a medição combinada de três parâmetros bastante importantes no estudo de colóides: o tamanho das partículas, o potencial Zeta e a massa molecular.[93]

Para a realização das medições foram utilizados células capilares com eléctrodos descartáveis para garantir que não ocorre contaminação das amostras.

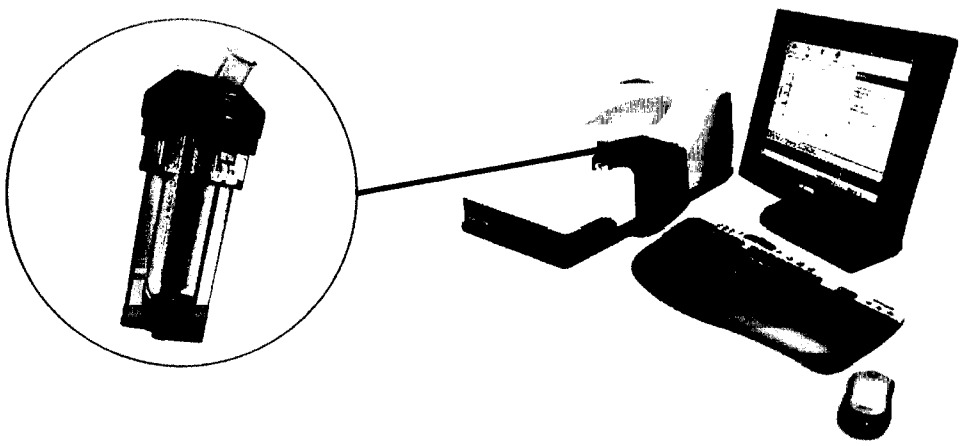


Figura 30 – Fotografia do Zetasizer Nano ZS e representação de uma célula utilizada na medição[94]

2.4.2. Caracterização dos Filmes LB por Microscopia de Força Atómica

A microscopia de força atómica (AFM) é uma técnica de caracterização que permite obter informações acerca da topografia de uma amostra; medir a fricção entre a ponta e a amostra, a elasticidade ou a rugosidade da amostra.[95]

A microscopia de força atómica baseia-se na interacção da superfície com uma ponta (sonda) aguçada montada num *cantilever*, que funciona como mola, e que é sensível a pequenas variações de forças.[96] A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o *cantilever* se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interacção ponta-amostra. A parte superior da haste reflecte a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe de laser incide sobre um fotodetector de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do *cantilever* (Figura 31-A).[95, 97]

Os deslocamentos verticais da ponta à medida que esta varre a amostra provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície da amostra.

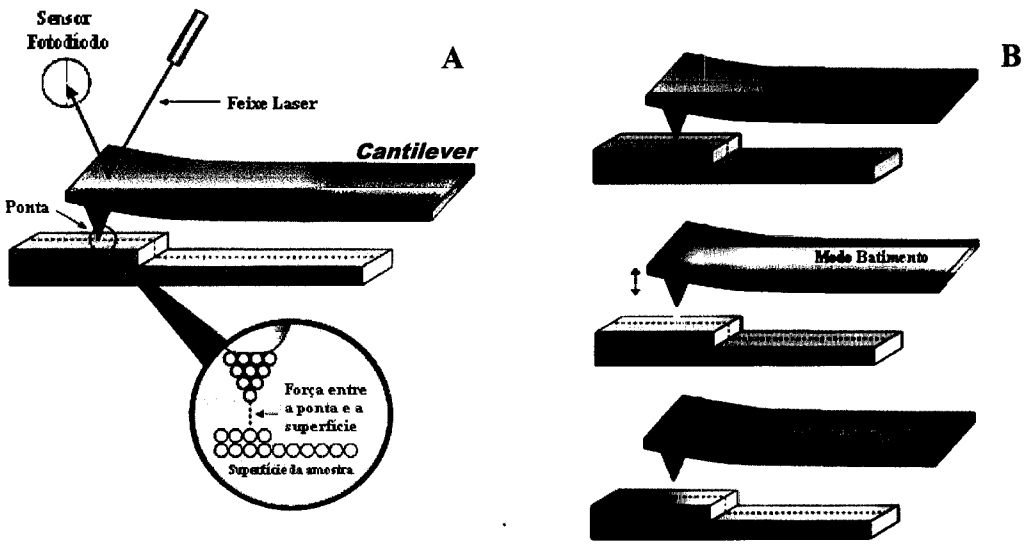


Figura 31 – Representação esquemática: do funcionamento do AFM (A) [95]; dos diferentes modos de varrimento (B)

Existem três modos básicos de funcionamento do AFM: o modo contacto, o modo batimento (*tapping*) e o modo não contacto (Figura 31-B).

No modo contacto, a ponta faz um leve "contacto físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra.

No modo de não-contacto, a ponta oscila a alta-frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanometros acima da superfície (não há contacto físico). Este modo não é muito aplicado, devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície, e à resolução reduzida dada a distância ponta-amostra.

No modo batimento ou intermitente, a ponta oscila a uma dada frequência com uma grande amplitude e contacta a superfície da amostra ao fim de um ciclo de oscilação. Este tipo de varrimento surge para contornar as limitações do modo contacto, uma vez que não é tão fácil provocar danos na superfície da amostra com a passagem da ponta.

Procedimento experimental: as imagens topográficas dos filmes LB foram obtidas recorrendo ao sistema PicoLe SPM, PicoScan 2100 (Figura 32), por varrimento usando o modo de batimento (*tapping*), a uma velocidade média de 0,812 linhas/s. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e a optimização das imagens foi executada em modo *flattening*, com o intuito de remover o ruído de fundo. O tratamento das imagens obtidas foi realizado com o programa *Gwyddion 2.10*.

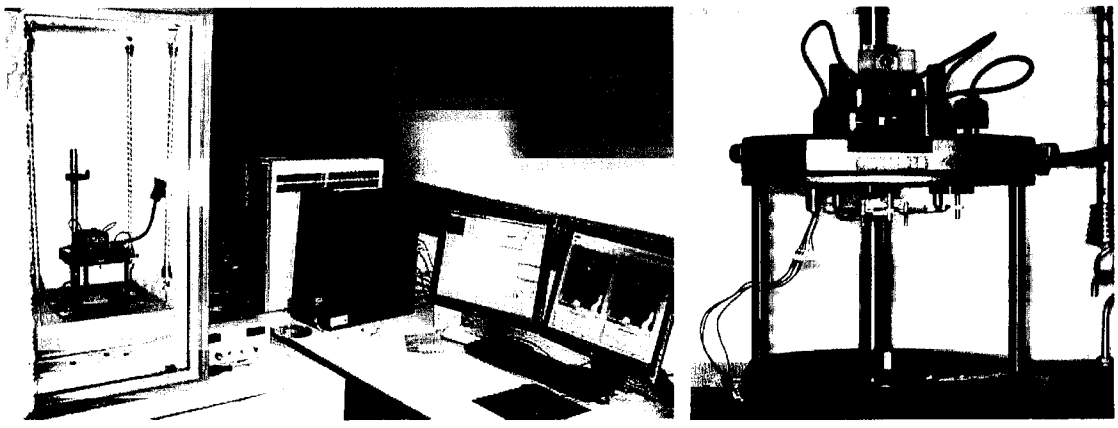


Figura 32 – Fotografias do Microscópio de força atómica existente no laboratório

CAPÍTULO III

Apresentação de Resultados e Discussão

Na primeira parte deste capítulo são apresentados os resultados da caracterização das nanopartículas de ouro sintetizadas.

Numa segunda parte, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para o estudo de filmes de Langmuir.

Relatam-se ainda os resultados obtidos através da técnica de Langmuir-Blodgett, bem como a sua caracterização por AFM.

3.1. Caracterização das Nanopartículas de Ouro

O espectro da absorção UV-Vis das nanopartículas de ouro revestidas com oleamina (Figura 33) apresenta um pico de absorção máxima, característico da banda de plasmões, perto dos 527 nm. Ao comparar o pico de absorção máxima do espectro a azul, com o artigo de Aslam[19], verifica-se a coerência no resultado obtido com o apresentando por Aslam para o mesmo rácio molar Au:OLA (pico de absorção máxima é próxima de 529 nm). Esta aproximação de resultados, permite estimar o tamanho médio das partículas, prevendo assim que este seja entre 10-20 nm.

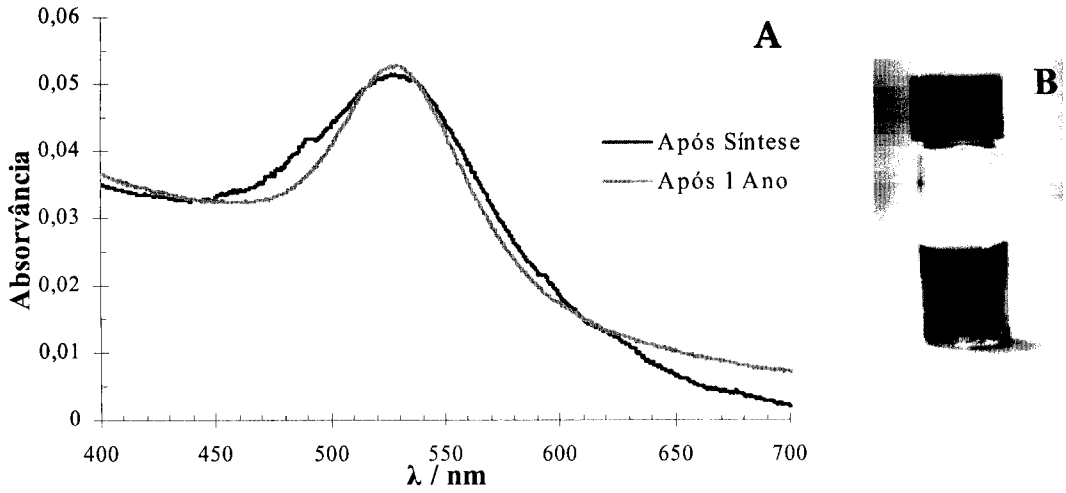


Figura 33 – (A) Espectro de Absorção UV-Vis das OLA-AuNPs; (B) Cor da solução coloidal de AuNPs

Verifica-se que as nanopartículas, quando preparadas apresentam um pH neutro (≈7), porém com o tempo a solução de nanopartículas torna-se ácida. Apesar da mudança do pH, as nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina apresentam-se muito estáveis, não havendo sinais de agregação após mais de um ano, o que pode verificar-se por análise do espectro UV-Vis na Figura 33, em que o pico de absorção não sofre qualquer deslocamento.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos para o potencial zeta e para o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de ouro sintetizadas em suspensão coloidal.

Tabela 6 – Resultados obtidos para o potencial zeta e para o diâmetro hidrodinâmico das OLA-AuNPs em suspensão coloidal aquosa

Potencial Zeta (mV)	*Diâmetro Hidrodinâmico (nm)*	*Índice de Polidispersão*
80,9 ± 10,6	34,5 ± 14,7	0,179

O valor de potencial zeta obtido fornece duas informações distintas: como potencial tem um valor positivo pode-se afirmar que as nanopartículas de ouro sintetizadas, quando em solução aquosa, têm carga positiva; para além disso como o valor apresentado é superior a 30 mV pode-se afirmar que a solução coloidal é bastante estável, não ocorrendo facilmente a agregação das partículas.[92]

A técnica permite determinar o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas; este valor é de 34,5 nm e tem uma dispersão associada de 14,7 nm (42,6%), o que revela uma elevada dispersão no tamanho das nanopartículas.

O índice de polidispersão é um valor importante tendo em conta que é indicativo do estado de agregação das partículas[94], e, dado que o valor experimental é muito abaixo de 1, pode-se afirmar que as partículas não se encontram agregadas, o que está de acordo com a literatura[94]. Este valor é igualmente um indicador da qualidade da amostra para ser utilizada na determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas, sendo que o critério de aceitação é cumprido se o um índice de polidispersão estiver no intervalo de 0 a 1.

Nas imagens das nanopartículas de ouro com revestimento de oleamina, obtidas a partir do microscópio electrónico de transmissão (Figura 34) pode se verificar que as partículas têm uma forma quase esférica, sendo que as partículas de maiores dimensões podem apresentar uma forma mais irregular.

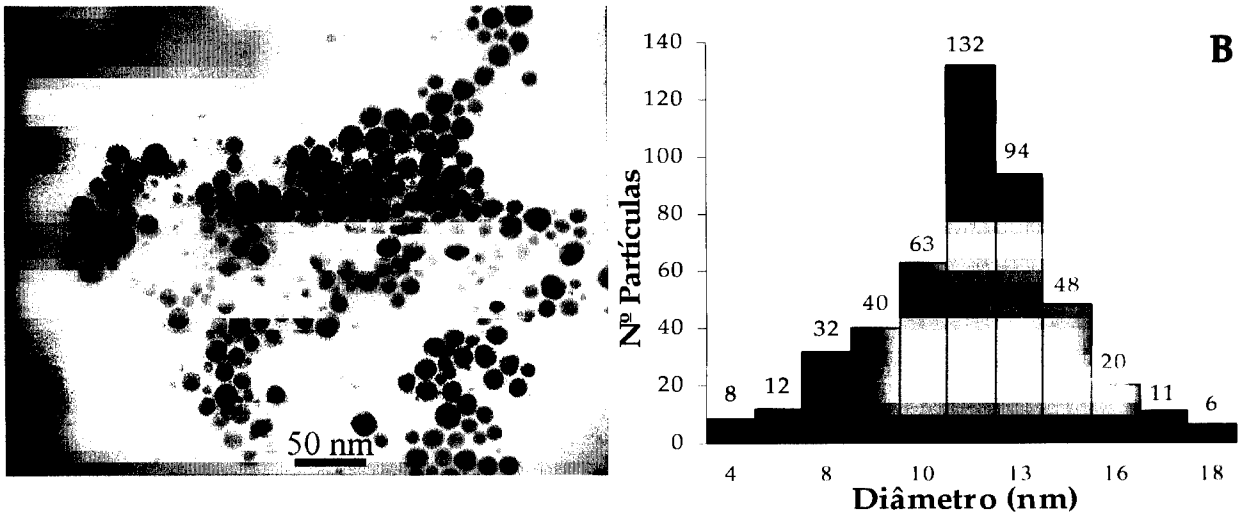


Figura 34 – (A) Imagens obtido por TEM; (B) Histograma da distribuição do tamanho das OLA-AuNPs

Para adquirir uma boa estatística em relação ao valor médio do diâmetro das partículas, foram contadas e medidas 466 partículas, utilizando o software *Image J.* O valor médio do diâmetro das partículas foi estimado em 12,1 nm, sendo a dispersão associada 5,2 nm (43,3%). A elevada dispersão do tamanho das nanopartículas e as formas irregulares que

por vezes adquiriram está relacionada com o rácio molar do Au:OLA. A dispersão de tamanhos das nanopartículas é visível nas duas técnicas: potencial zeta e TEM. É de frisar que a diferença para os diâmetros determinados está relacionada com a natureza de cada técnica, assim através da microscopia de transmissão electrónica obtém-se o diâmetro do núcleo metálico, visto que o ligante que estabiliza a nanopartículas não ter a capacidade fazer reflectir os electrões, logo a imagem obtida por TEM não identifica estes ligandos; no caso da determinação do diâmetro hidrodinâmico este contabiliza o espaço ocupado pela camada estabilizante da nanopartícula, o que justifica este valor ser bastante superior ao diâmetro determinado a partir do TEM.

A causa provável para a polidispersão de tamanhos das AuNPs poderá estar relacionada com o facto da quantidade de oleamina não ser suficiente para revestir as partículas de ouro na totalidade, o que poderá ter provocada o crescimento e/ou agregação de nanopartículas de ouro, surgindo algumas partículas com formas mais irregulares. Na bibliografia é referida a existência de uma relação entre o tamanho das partículas e a concentração de oleamina utilizada, sendo que quanto maior for a quantidade de amina utilizada, menor será o tamanho das partículas.[19]

A oleamina desempenha um papel fundamental na preparação e estabilização das nanopartículas de ouro. Verifica-se que a síntese das nanopartículas só ocorre quando a temperatura é de 80 °C, isto porque a oleamina não é solúvel em água à temperatura ambiente.

A bibliografia[19] sugere que a síntese das nanopartículas com oleamina pode ser dividida em dois passos distintos. No primeiro passo dá-se a formação de um complexo ouro-amina intermediário; e no segundo passo ocorre a decomposição térmica desse complexo. O facto da decomposição do complexo Au-OLA ser um processo muito rápido, permite que as nanopartículas de ouro sejam protegidas por um revestimentos de moléculas de oleamina, evitando a agregação das nanopartículas.

Conclui-se, assim, que quanto menor for o tempo da reacção menor será a dimensão das nanopartículas, sendo a decomposição térmica do complexo Au-OLA determinante para o tamanho das partículas. Desta forma, a oleamina só deverá ser adicionada à solução aquosa de $[HAuCl_4]^-$, quando esta estiver a 80 °C, minimizando, assim, o tempo de reacção.

3.2. Estudo de Monocamadas de Langmuir

3.2.1. Estudo de Filmes de Oleamina (OLA)

O estudo de filmes de oleamina foi desenvolvido com o intuito de compreender em que medida é que o estabilizante das nanopartículas sintetizadas é responsável pelo comportamento das AuNPs enquanto monocamada flutuante. O estudo foi realizado em subfases com diferentes valores de pH, de modo a verificar a sua influência no processo de compressão do filme de Langmuir.

Inicialmente realizaram-se três ensaios ao mesmo pH (Figura 35), utilizando três soluções tampão distintas como subfase: tampão fosfato (PBS), tampão ácido cítrico e citrato de sódio (Citrato), e tampão ácido acético e acetato de sódio (Acetato). Pretendia-se estudar a influência dos sais que se encontravam na subfase, no processo de compressão da monocamada. Ao verificar que a forma da isotérmica de π-A sofre grandes alterações com o tampão utilizado para o mesmo valor de pH, decidiu-se utilizar em todos os ensaios, soluções tampão PBS, de modo a uniformizar o efeito do sal presente na subfase para todos os ensaios realizados.

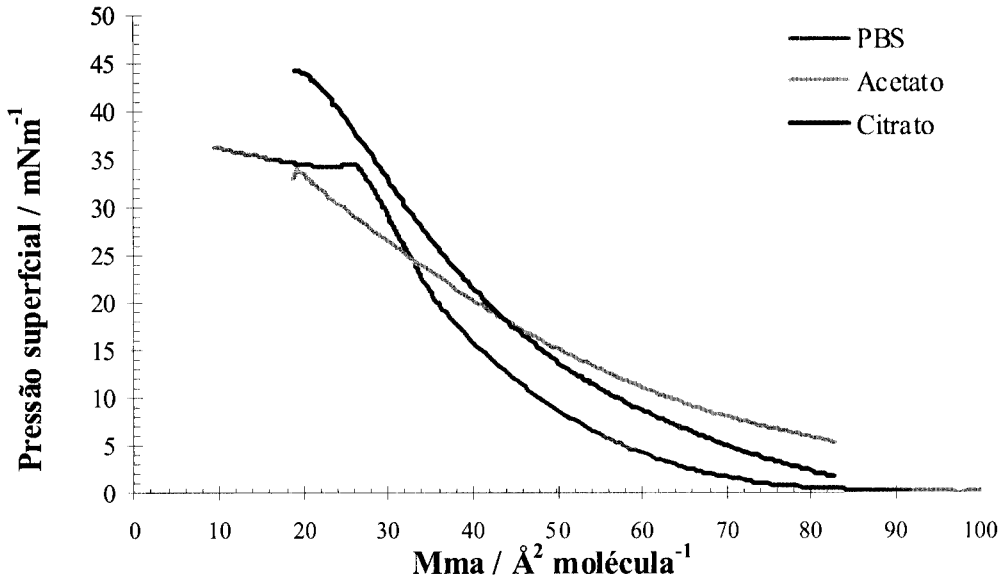


Figura 35 – Isotérmicas π-A de compressão da Oleamina a pH 4.8 utilizando diferentes soluções tampão com subfase

Na Figura 36 estão representadas as isotérmicas π-A de filmes de OLA a diferentes valores de pH. É de referir que a maioria das isotérmicas resultam da junção de dois ensaios

em que foram utilizados quantidades distintas de oleamina. Esta foi a resolução escolhida para ultrapassar a limitação física das dimensões da balança, que não permitia realizar um só ensaio em que fosse possível visualizar todo o processo de compressão, desde a fase gasosa até ao colapso do filme.

Ao analisar as isotérmicas π-A verifica-se que a isotérmica da oleamina apresenta três regiões distintas, isto é o estado gasoso, o estado líquido e a região do colapso.

Ao observar o comportamento global das isotérmicas é notório a ocorrência do deslocamento da isotérmica π-A da OLA com o aumento do pH da subfase. Assim, quando a subfase é constituída por uma solução tampão a pH alcalino é necessário apenas uma pequena quantidade de amina para que seja visível a interacção entre as moléculas, isto é para que o valor de pressão superficial comece a tomar expressão. No ensaio a pH 12.0 a transição gás-líquido (G-L) ocorre para uma área de ≈ 87 $Å^2$ por molécula. Com a diminuição do pH da subfase, a transição de fase ocorre para áreas por molécula cada vez mais pequenas, sendo que nos filmes a pH 10,4 e 9,1 a transição ocorre a 74 e 61 $Å^2$ por molécula, e à medida que a acidez aumenta, é necessário comprimir cada vez mais o filme até valores de área por molécula mais pequenas para que as interacções intermoleculares tomem expressão na pressão superficial, sendo bastante evidente essa redução no ensaio a pH 2,2 em que a transição ocorre a aproximadamente 20 $Å^2$. Todavia, no caso do ensaio a pH 2,2 o facto da isotérmica π-A estar deslocada para valores de área por molécula tão diminutos pode, estar associado a um aumento da solubilidade da oleamina para meios muito ácidos e consequentemente devido à perda de material que se encontra na interface, por dissolução na subfase.

Ainda na Figura 36.A, verifica-se que o colapso do filme é afectado pelo pH da subfase, uma vez que, com o aumento do pH, o colapso do monocamada tende a ocorrer para pressões superficiais mais elevadas, sendo que, nos filmes obtidos a pH 4,8 e 7,0, o colapso ocorre a ≈35 $mN.m^{-1}$ enquanto que nos filmes a pH alcalino o colapso surge a pressões superficiais próximas de 45 $mN.m^{-1}$. Ainda acerca do colapso dos filmes de oleamina, verifica-se que este ocorre para uma área por molécula tanto mais elevada quanto maior é o pH, atingindo-se o colapso a ≈ 50 $Å^2$ para um pH = 12,0, enquanto que para um pH = 4,8 o colapso surge a ≈ 35 $Å^2$. Como se pode observar na compressão do filme de OLA a pH 2,2 não se atingiu o colapso, isto mesmo quando a área por molécula disponível atingia valores bastante baixos (≈ 10 $Å^2$).

Em forma de resumo, podem identificar-se dois fenómenos que justificam o comportamento da monocamada de OLA com o pH. Com o aumento do pH a monocamada

torna-se cada vez menos ionizada e como tal as interacções electrostáticas repulsivas entre as moléculas de oleamina tendem a diminuir, permitindo comprimir a monocamada até pressões mais elevadas, culminando assim numa pressão de colapso tanto mais elevada, quanto mais alcalina for a subfase. Seria de esperar que, com o aumento do pH e consequentemente a diminuição das forças repulsivas, a transição de fase gás-líquido ocorresse para áreas por moléculas mais pequenas em meio alcalino e não em meio ácido, como acontece.

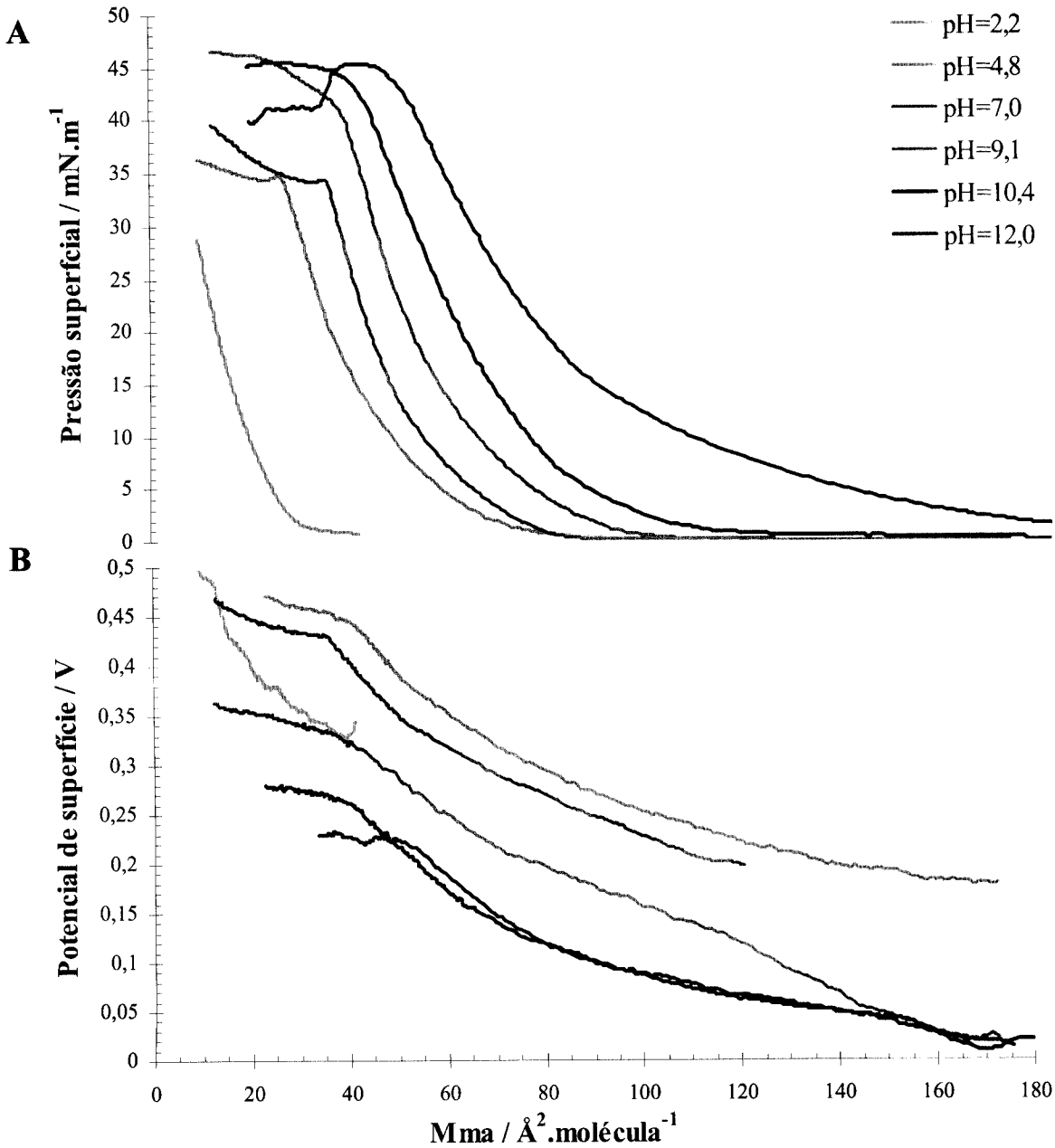


Figura 36 – Isotérmicas π-A e ΔV-A de compressão da Oleamina a diferentes valores de pH

Para compreender este comportamento é necessário ter em conta a presença, na subfase, de aniões fosfato que facilmente interagem com a oleamina quando esta se encontra ionizada. Deste modo, com a diminuição do pH, aumenta a fracção de moléculas de OLA

carregadas positivamente, que poderá interagir com os aniões fosfato, que desempenham uma função de blindagem das moléculas presentes na monocamada. O efeito de blindagem é de tal forma efectivo que as interacções entre as moléculas de oleamina só se verificam para áreas por molécula cada vez mais pequenas. Com o efeito de blindagem as interacções entre as moléculas de OLA ocorrem quando estas estão tão próximas que, mal estas se fazem sentir dá-se a transição gás-líquido, o que facilmente se confirma ao visualizar a diminuição da pressão de transição G-L, com a passagem de meios alcalinos para meios ácidos.

A Figura 36.B corresponde ao efeito do pH sobre a isotérmica de potencial de superfície em função da área disponível por molécula. A curva do potencial de superfície vai-se desenhando ao longo da compressão, tal como no caso da isotérmica de pressão superficial, fornecendo informação acerca da orientação da monocamada. A variação de potencial é mais sensível do que a variação da pressão, permitindo visualizar transições de fase da monocamada antes de estas serem visíveis na isotérmica π-A.

A análise das isotérmicas ΔV-A permite confirmar que a transição de fase gás-líquido e o colapso ocorrem para áreas por moléculas tanto mais elevadas quanto mais elevado é o pH da subfase. A isotérmica de potencial ao contrário da isotérmica de pressão permitiu identificar o colapso do filme de oleamina a pH 2,2, comprovando assim que o potencial é mais sensível a alterações de estados do que a pressão superficial. O deslocamento horizontal das isotérmicas ΔV-A não é provocada por qualquer tipo de alteração na orientação das moléculas, devendo-se apenas a diferentes contribuições da dupla camada eléctrica, mais precisamente, devido ao grau de ionização da monocamada, o que será abordado e explorado com a análise do gráfico do potencial de superfície máximo versus pH.

Na Figura 37 estão representados os valores de potencial máximo obtidos para diferentes valores de pH e a curva α da fracção protonada de oleamina calculada considerando o pKa da oleamina igual a 9. O potencial de superfície, como referido, sofre grande influência do pH da subfase, desta forma se justifica o intervalo de valores de $\Delta V_{máx}$ obtidos, que variam entre 237mV a pH 12,0, e 496 mV a pH 2,2.

Este aumento do potencial máximo com a diminuição do pH é devido à ionização da monocamada de oleamina na interface ar/água.

Não se conhece o valor exacto do pKa da oleamina pois esta não é solúvel em água, contudo prevê-se que este seja superior 9, como é característico das aminas de cadeia longa. Logo, em meios muito alcalinos, a monocamada de oleamina está na sua forma neutra, nestes casos o potencial de superfície deve-se apenas à componente vertical do momento dipolar,

muito provavelmente é o que acontece no ensaio a pH 12,0 o que justifica um valor de potencial de superfície reduzido. Com a diminuição do pH a monocamada de oleamina torna-se parcialmente ionizada, o que se traduz num aumento do potencial, uma vez que surge uma nova contribuição a juntar a $\mu_{\perp}$ e que corresponde à dupla camada eléctrica. Essa contribuição é positiva e é tanto maior quanto mais elevado for o grau de ionização da monocamada. Assim, quanto mais ácida for a subfase, mais ionizada se encontra a monocamada, e consequentemente mais elevado é o valor de potencial de superfície. Quando o filme de oleamina se encontra totalmente ionizado atinge-se o valor máximo de potencial de superfície, o que deve ocorrer para valores de pH muito ácidos, é de referir que ao visualizar a Figura 37 não é possível identificar a que pH é que ocorre a ionização total da monocamada, pois não se obteve nenhum intervalo de pH em que o potencial fosse constante[98,99], podendo o valor do potencial de superfície ser influenciado pelo aumento da solubilidade da oleamina na fase aquosa.

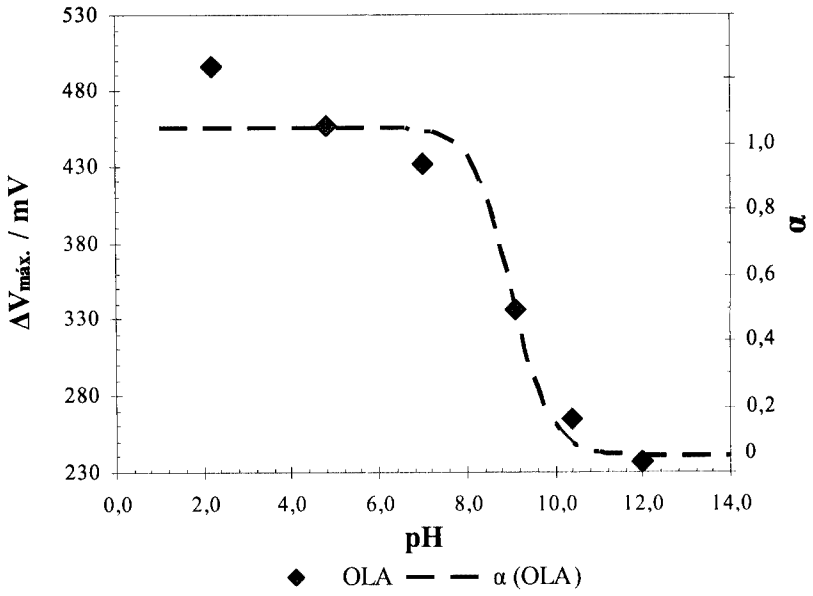


Figura 37 – Representação gráfica do potencial de superfície máximo de filmes de Oleamina em função do pH

O gráfico de $\Delta V_{máx}$ em função do pH assemelha-se a uma curva de titulação,[99] e tal com numa titulação pode-se retirar alguma informação extra, neste caso pode-se especular acerca do pKa aparente da oleamina. Como há um decréscimo mais acentuado do potencial entre o pH 8 e 10, provavelmente o pKa da OLA encontra-se neste intervalo. Na curva α correspondente à neutralização da monocamada estimou-se que o valor de pKa de 9. Contudo esta aproximação tem que ser tida com bastante reservas pois tal como é referido por alguns investigadores na literatura[100-102], o pH na interface não é igual ao pH da subfase, visto que

depende da temperatura e da dupla camada eléctrica, para além do grau de ionização da monocamada. Por isso o valor de pKa da oleamina determinado por este método só deve ser visto como um valor aparente.

Na Figura 38 estão apresentados os valores de compressibilidade máxima para os filmes de oleamina a diferentes valores de pH.

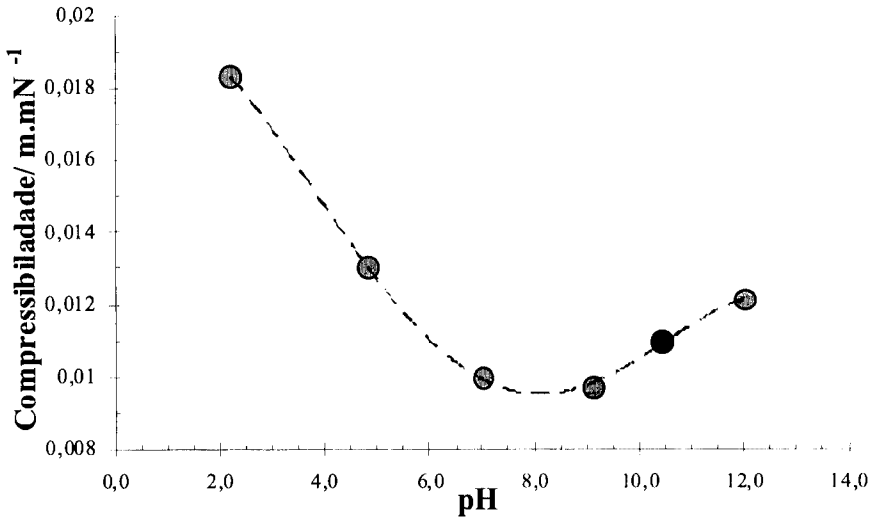


Figura 38 – Variação da compressibilidade k_c dos filmes de oleamina em função do pH da subfase

Os valores da compressibilidade variam fortemente com o pH da subfase, sendo visíveis duas tendências contrárias que convergem para um valor mínimo de compressibilidade (≈ 0.01 m.mN^{-1}), próximo de pH 8. Com o aumento do pH de 2,2 para 7,0 os filmes tornam mais rígidos, dado a diminuição acentuada da compressibilidade. Quando o pH é superior a 8, a compressibilidade torna a aumentar. Este comportamento provavelmente está associado aos efeitos de carga e de blindagem, que foram mencionados anteriormente.

Com o intuito de esclarecer as variações visualizadas nas isotérmicas de compressão, quanto à sua natureza termodinâmica, calculou-se a energia de Gibbs de compressão (ΔG_c). Não foi possível calcular a energia de Helmholtz de compressão (ΔF_c) devido à impossibilidade de escolher um intervalo de áreas por molécula que permitisse a integração de todas as isotérmicas. Figura 39 está representada a variação de ΔG_c em função do pH da subfase. Utilizaram-se cinco intervalos de integração distintos, para facilitar a detecção de possíveis alterações que se verifiquem para determinadas pressões superficiais.

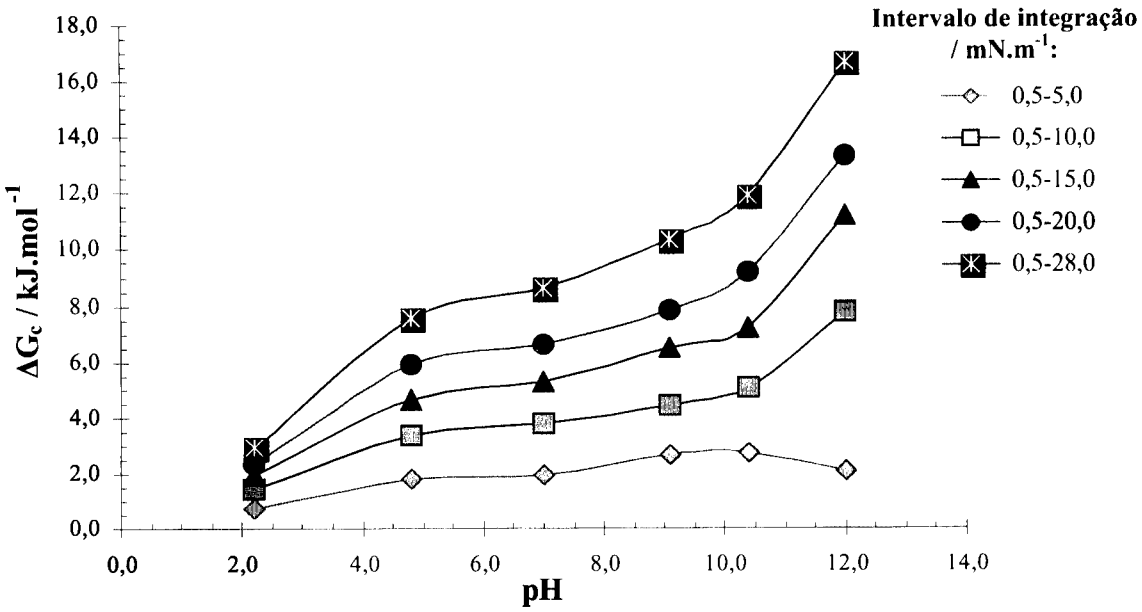


Figura 39 – Efeito do pH na energia de Gibbs de compressão do filme de Oleamina

Os resultados apresentados apontam para um aumento da energia de Gibbs de compressão com o aumento do pH da subfase. Este comportamento é semelhante em todos os intervalos de integração, excepto no intervalo de pressões superficiais de 0,5 a 5,0 $mN.m^{-1}$, no qual há uma ligeira diminuição de ΔG_c para o pH 12, neste primeiro intervalo de integração a energia necessária à compressão é mínima e varia muito pouco com o pH da subfase sendo a diferença entre os valores mínimo e máximo inferior a 2 $kJ.mol^{-1}$.

Esta pequena diferença para o intervalo de integração mais reduzido já era esperado ao visualizar a isotérmica π-A que está representada na Figura 36 em que se verifica que, para na compressão do filme a pH 12,0, a pressão superficial aumenta com bastante facilidade até atingir os 5,0 mN^{-1} comparativamente aos restantes filmes, em que a fase inicial da compressão é característica de um estado gasoso, em que as interacção intermoleculares são praticamente inexistentes, de modo que para a pressão superficial atinja os 5,0 mN^{-1} é necessário uma maior energia de compressão.

Para pressões superficiais maiores que 5,0 mN^{-1}, a dificuldade de compressão da monocamada aumenta de forma contínua com o pH da subfase, sendo que o ΔG_c atinge um valor máximo, de 2,93 $kJ.mol^{-1}$ para pH 2,2, e de 16,65 $kJ.mol^{-1}$ para pH 12,0. A partir do pH 9,1 verifica-se um aumento mais acentuado de ΔG_c, o que permite afirmar que o processo de compressão é mais difícil quando a monocamada de se encontra neutralizada. Ao comparar a energia necessária para comprimir uma monocamada de oleamina a pH 2,2 e para os restantes valores de pH verifica-se que o processo é mais fácil em meio muito ácido.

3.2.2. Estudo de Filmes de Nanopartículas de ouro estabilizadas com oleamina (OLA-AuNPs)

Foram realizados vários ensaios com OLA-AuNPs, formando-se monocamadas flutuantes em que a subfase é constituída por tampões PBS com pH variável. Este estudo teve vários objectivos, pretendendo-se conhecer o comportamento do filme ao longo da sua compressão e a influência exercida pelo pH neste processo e, posteriormente, na deposição da monocamada em mica. O estudo de filmes de nanopartículas é, também, importante para a avaliação das propriedades de filmes mistos, em que as AuNPs são um dos componentes.

Na Figura 40 estão representadas as isotérmicas π-A e ΔV-A das nanopartículas de ouro sintetizadas e redissolvidas em clorofórmio, a escala de área por molécula foi estabelecida a partir do diâmetro hidrodinâmico determinado por potencial zeta, e como tal trata-se apenas de uma escala estimada.

Ao analisar globalmente as isotérmicas π-A das nanopartículas verifica-se que têm um comportamento algo semelhante ao apresentado pela oleamina, podendo-se afirmar que o composto utilizado para estabilizar as nanopartículas de ouro exerce uma função importante no comportamento que estas apresentam enquanto monocamada flutuante, contudo é necessário fazer uma análise mais pormenorizada às isotérmicas. Tal como fora possível identificar nas isotérmicas π-A da OLA, as isotérmicas das nanopartículas apresentam três regiões distintas, uma inicial em que as interacções intermoleculares são mínimas e que se traduz num valor praticamente nulo da pressão superficial (estado gasoso), e numa segunda fase em que há um aumento acentuado da pressão, que corresponde ao estado líquido, e que se prolonga até à última região – o colapso do filme. É de referir que, em relação às isotérmicas apresentadas na Figura 40.A, a primeira fase, que corresponde ao estado gasoso, só é visível no caso da isotérmica registada a pH 2,2, não estando representado nas restantes isotérmicas simplesmente porque os volumes de nanopartículas utilizados não eram suficiente baixos (seria necessário um volume bastante inferior a 5 μL).

Ao observar as isotérmicas π-A das nanopartículas de ouro, verifica-se que tal como acontecera no estudo dos filmes de oleamina há uma tendência para que, com o aumento do pH, as isotérmicas se desloquem para valores de área por molécula mais elevados e simultaneamente, o colapso do filme ocorra a pressões superficiais mais elevadas, tendo uma

$\pi_{colapso} \approx 47$ mN.m^{-1} para pH 12,0, enquanto que para pH 2,2 a $\pi_{colapso}$ deve ser próxima de 40 mN.m^{-1}.

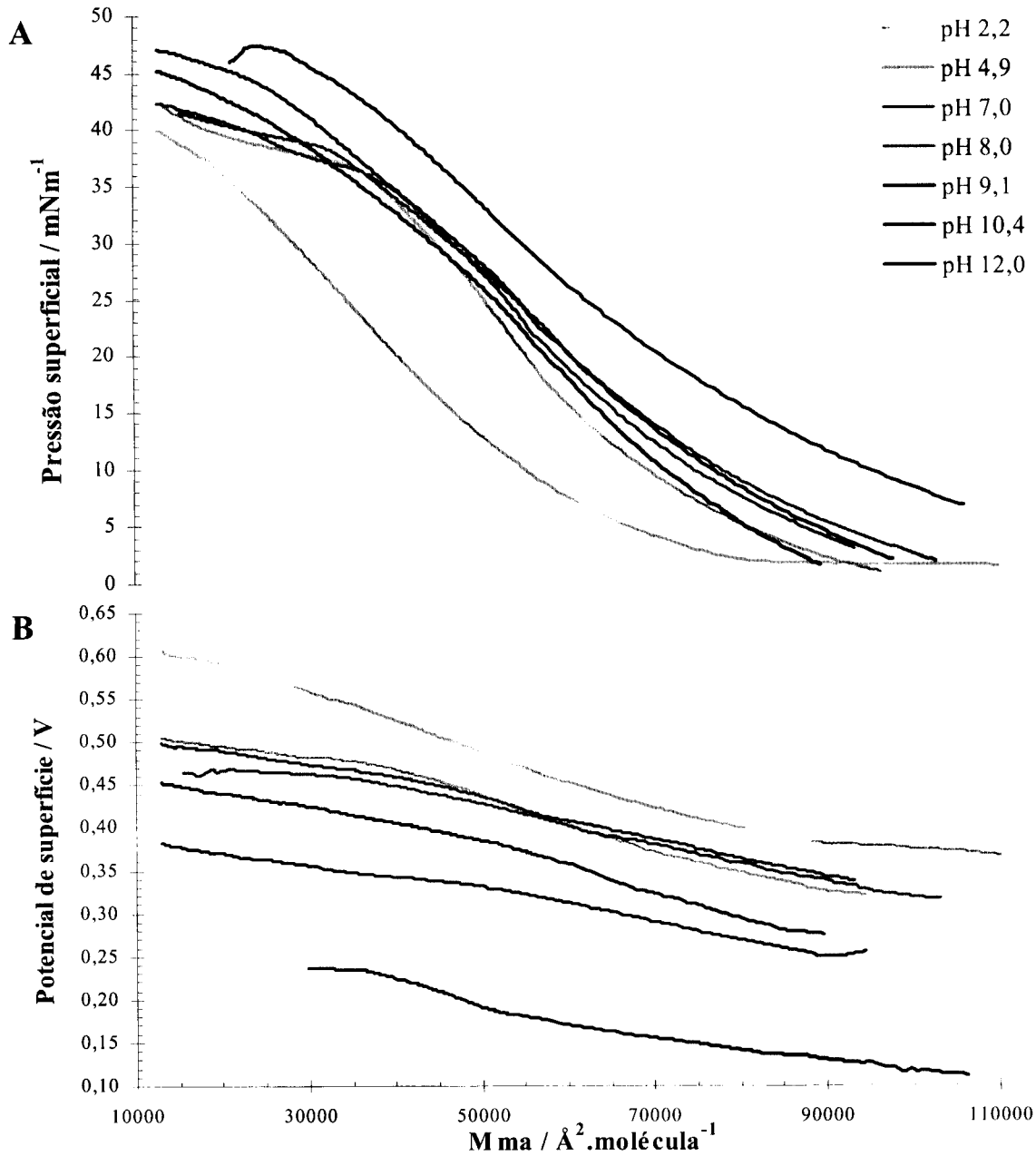


Figura 40 – Isotérmicas de compressão π-A e ΔV-A de filmes de OLA-AuNPs a diferentes valores de pH

Em relação ao efeito blindagem por parte dos iões fosfato, ao comparar a isotérmica a pH 2 da oleamina com a isotérmica de nanopartículas de ouro ao mesmo pH, verifica-se que, na monocamada de AuNPs, o efeito de blindagem por parte dos iões fosfato não é tão efectiva como na monocamada de OLA, visto que a transição gás-líquido ocorre de forma muita menos acentuada no caso das nanopartículas.

O deslocamento da isotérmica π-A para áreas por molécula mais elevadas com o aumento do pH é visível ao comparar os resultados para valores de pH muito ácido (2,2) e para valores de pH mais alcalinos (> 9,0). Para os restantes valores de pH (4,9; 7,0 e 8,0) as isotérmicas encontram-se muito próximas e apresentam um comportamento que não se enquadra na descrição feita anteriormente, uma vez que o colapso não é atingido e verifica-se uma variação do declive da curva, tornando-se menos acentuado para valores de pressão superficial próximos de 37 – 39 $mN.m^{-1}$ e para uma área por molécula entre 35000 e 32500 $Å^2$. Este comportamento indicia uma alteração das interacções entre as nanopartículas de ouro e consequentemente uma alteração na estrutura da monocamada, para valores de pH entre 5 e 8, comparativamente com as subfases mais ácidas ou mais alcalinas.

Na Figura 40.B estão representadas as isotérmicas ΔV-A de compressão das nanopartículas de ouro para diferentes valores de pH.

As isotérmicas mostram que o potencial de superfície é fortemente afectado com o pH da subfase, isto porque a carga das nanopartículas sofre alterações com pH. Assim quando estas se apresentam num estado fortemente ionizado, teremos mais cargas à superfície o que se reflecte no potencial superficial. Com a aproximação do pH ao valor do pKa do estabilizante das nanopartículas, ou seja da amina, ocorre uma diminuição das cargas superficiais, o que provoca uma diminuição brusca do potencial de superfície.

Na análise das curvas de potencial de superfície é evidente uma alteração do declive de algumas curvas, o que indicia uma alteração da conformação das nanopartículas dentro do estado líquido, o invulgar neste comportamento é o facto de que o declive se tornar menos pronunciado com a diminuição da área disponível, o que sugere uma menor interacção das AuNPs com o aumento da compressão da monocamada. Este comportamento não é usual e as suas causas são desconhecidas, sendo necessário mais ensaios para tentar compreender a razão desta diminuição das interacções. As isotérmicas em que é mais evidente este comportamento são registadas a pH 7,0 e 8,0, em que a mudança de declive ocorre para uma área por molécula aproximadamente 55000 $Å^2$; a pH 9,1 para uma área de ≈ 62000 $Å^2$; e a pH 12,0 para uma área de ≈ 50000 $Å^2$; ou seja ocorre tendencialmente para valores de pH mais elevados.

A Figura 41 representa o valor máximo do potencial de superfície obtido para cada pH, nos estudos das monocamadas de nanopartículas e de oleamina. As curvas projectadas por cada conjunto de pontos deveriam ter um aspecto semelhante, uma vez que se considerou que o ligante das nanopartículas, a oleamina, tinha um papel primordial no potencial de

superfície da monocamada. Sendo que para valores de pH acima do pKa da oleamina este valor seria muito inferior ao apresentado a pHs mais ácidos devido à ionização da monocamada. Analisando a curva referente à fracção de OLA-AuNPs protonadas em solução (α) verifica-se que, a neutralização da monocamada da nanopartículas de ouro ocorre a um pH próximo de 10,5 dando-se um deslocamento do pKa aparente da monocamada para valores de pH mais alcalinos, quando comparando com o valor do pKa aparente da monocamada de oleamina (pKa aparente ≈ 9).

No ensaio a pH 2,2 obteve-se um potencial máximo muito superior ao obtido para pH 4,9, sofrendo um aumento superior a 100 mV. Este aumento brusco sugere que há uma grande diferença no grau de ionização da monocamada, quando esta se encontra num meio mais ácido (pH 2,2) e noutro em que a acidez é mais reduzida (pH 4,9).

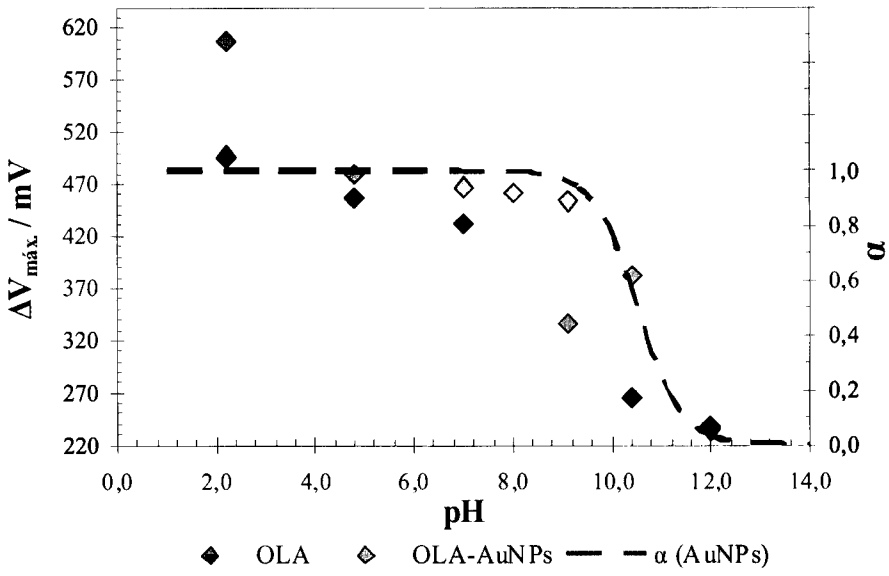


Figura 41 – Representação gráfica do potencial de superfície máximo de filmes de OLA-AuNPs e de OLA em função do pH

Na Figura 42 estão representados valores de compressibilidade máxima, determinados para o ponto máximo de compressão antes do colapso dos filmes de nanopartículas de ouro e de oleamina. Ao analisar os valores de κ_c das OLA-AuNPs, para os diferentes valores de pH verifica-se que não há nenhuma relação da compressibilidade com o pH. Comparando os resultados obtidos para os filmes de nanopartículas de ouro com as compressibilidades obtidas nos filmes de oleamina, em que são visíveis duas tendências distintas, verifica-se que os valores de compressibilidade apenas são semelhantes nos ensaios a pH 2,2 e 4,8/4,9, em que κ_c para a oleamina é de 0,0183 e 0,0130 $m.mN^{-1}$, respectivamente, e para as OLA-AuNPs é de

0,0193 e 0,0140 $m.mN^{-1}$. Para valores de pH mais elevados verifica-se que, no caso da monocamada de nanopartículas, a compressibilidade aumenta até atingir um máximo a pH 9,1, voltando depois a diminuir para meios mais alcalinos. É de referir que os valores de κ_c obtidos para estes pHs foram muito superiores aos determinados para os filmes de oleamina nas mesmas condições, verificando-se uma inflexão dos valores de compressibilidade acima de pH 4,9, comparativamente aos valores obtidos para os filmes de oleamina nas mesma condições de pH. Os filmes de nanopartículas mais rígidos foram obtidos a pH 4,9 e 12,0, enquanto que no estudo da oleamina o filme em que se obteve uma compressibilidade menor fora a pH 9,1; em relação ao filme menos rígido os resultados foram consonantes tendo sido obtido a pH 2,2, devendo-se salientar que a este pH a compressibilidade do filme de OLA e OLA-AuNPs é muito idêntica.

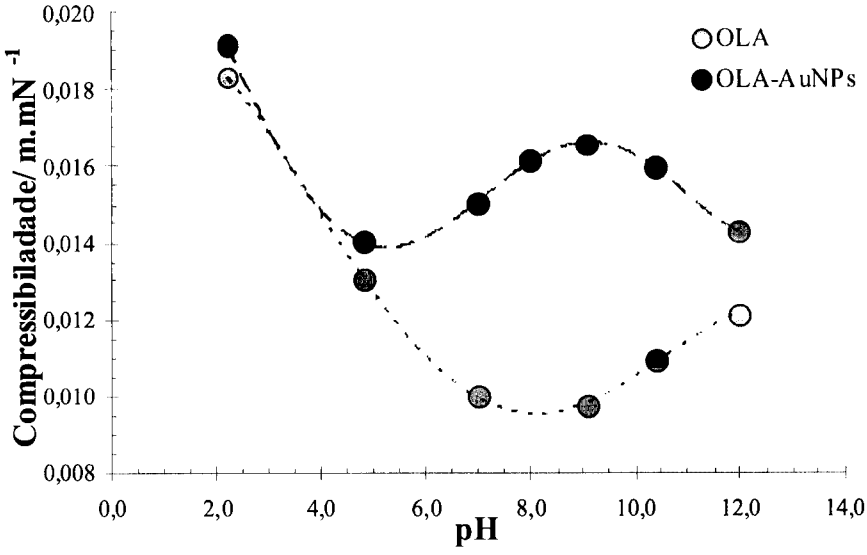


Figura 42 – Variação da compressibilidade k_c dos filmes de OLA-AuNPs e Oleamina em função do pH da subfase

Foram determinadas a energia de Gibbs e de Helmholtz, para uma melhor análise do efeito do pH nas características termodinâmicas no processo de compressão das monocamadas de nanopartículas de ouro. Todavia os valores de ΔG_c e ΔF_c apenas serão discutidos a nível da tendência que apresentam e não será feita uma análise quantitativa, visto que apresentam valores muito elevados devido à área ocupada pelas nanopartículas ser muito maior do que a área da oleamina e o DPPC.

Na Figura 43 estão apresentados os valores de ΔG_c. Em todos os intervalos de integração de pressão superficial, a energia de Gibbs tem a mesma tendência, havendo um aumento da energia necessária à compressão com aumento do pH até aproximadamente 8,0,

de seguida surge um ligeiro decréscimo do valor de ΔG_c para pH 9,1, que volta a subir no ensaios a pH 10,4 e 12,0.

Comparando os resultados obtidos para energia de Gibbs de compressão da monocamada de OLA-AuNPs com a monocamada de oleamina, verifica-se que há uma tendência semelhante para os dois casos, visto que a energia necessária à compressão é tanto maior quanto mais elevado o pH da subfase. Com a excepção do filme de AuNPs a pH 9,1 que, como já fora referido, sofre um ligeiro decréscimo, uma razão plausível para esse decréscimo na energia de compressão pode estar associada ao facto de que a amina que estabiliza as nanopartículas apresentar um valor de pKa próximo de pH 9 e possivelmente a este pH a monocamada não se encontra protonada, neste caso, devido à diminuição das interacções repulsivas entre as nanopartículas, é necessária uma menor energia para comprimir o filme.

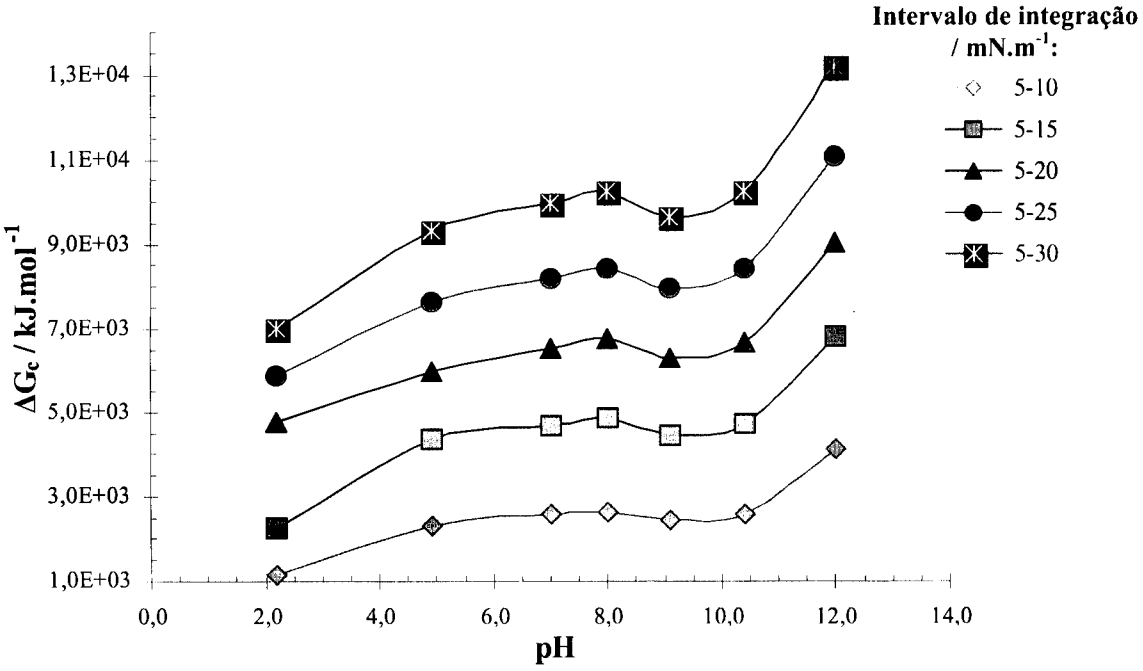


Figura 43 – Efeito do pH na energia de Gibbs de compressão de filmes de OLA-AuNPs

Os valores de ΔF_c, apresentados na Figura 44, surgem a partir de um modelo alternativo ao modelo proposto por Goodrich e Gaines. Neste modelo, proposto por Gershefeld, a variável independente é a área por molécula e como tal foram determinados valores de ΔF_c para três intervalos de integração distintos, sendo o mais pequeno de 100 a 60 $Å^2$ por molécula e o mais alargado de 100 a 40 $Å^2$ por molécula.

Comparando os valores de ΔF_c com os valores de ΔG_c, verifica-se que a influência do pH da subfase na energia necessária à compressão é semelhante para ambos os valores, isto é a energia de compressão é tanto maior quanto mais elevado for o pH.

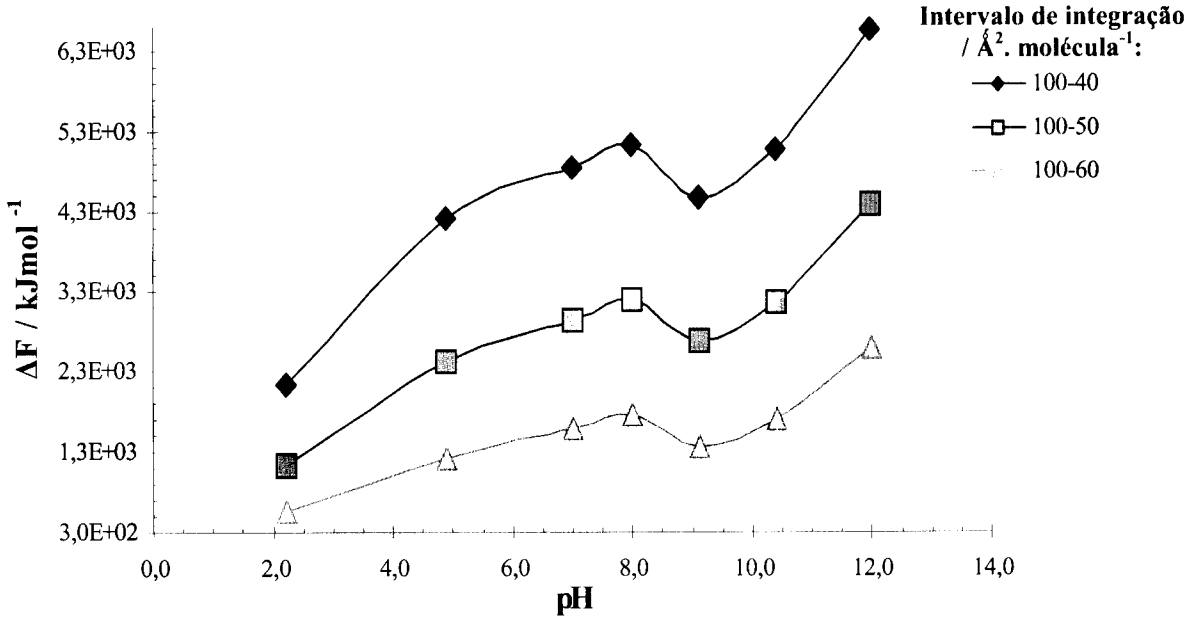


Figura 44 – Efeito do pH na energia de Helmholtz de compressão de filmes de OLA-AuNPs

As diferenças que surgem quando utilizados os dois modelos leva a uma questão: qual deste modelos se aproxima mais do valor real da energia que é necessária no processo de compressão de uma monocamada?

Pois apesar de obter a mesma tendência para os dois modelos, apenas é possível retirar dessa análise que, em filmes de nanopartículas a valores de pH mais alcalinos há a necessidade de uma maior energia para conseguir comprimir o filme, contudo esta energia não é contabilizada da mesma forma. Na literatura,[84] o modelo proposto por Goodrich e Gaines é comummente preterido ao modelo avançado por Gershefeld, visto que parte de hipóteses que são fisicamente insustentáveis para a técnica de Langmuir, pois sugere que a variável independente é a pressão superficial e a variável dependente é a área por molécula. Logo, ao ter que optar por um valores calculados é preferível seleccionar o ΔF_c em detrimento do ΔG_c.

3.2.3. Monocamada de DPPC

Para uma melhor análise do estudo da interacção do DPPC com as nanopartículas é importante fazer uma caracterização das isotérmicas obtidas para a monocamada formada por este fosfolípido.

Na Figura 45 estão representadas as isotérmicas π-A e ΔV-A do DPPC, a uma temperatura de 20 °C, em subfase de água ultrapura, e a uma velocidade de compressão de 10 mm/min.

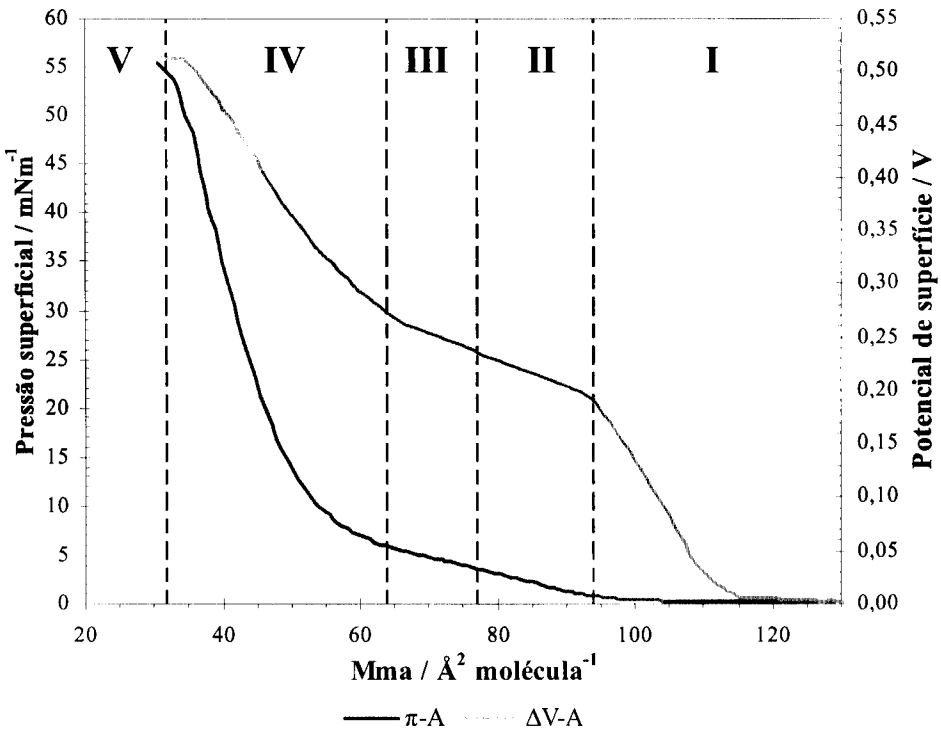


Figura 45 – Isotérmicas de compressão da monocamada de DPPC em água e temperatura de 20°C

A isotérmica de compressão π-A do DPPC pode ser dividida em 5 regiões distintas.[103]

Na região **I**, corresponde a uma fase inicial da compressão, em que a área por molécula é muito elevada, consequentemente as interacções intermoleculares praticamente não se verificam, sendo a pressão superficial muito baixa (≈ 0 mNm^{-1}). Esta região corresponde ao que é normalmente designado como estado gasoso. Esta região estende-se até uma área por molécula de ≈94 $Å^2$, estando de encontro com os valores relatados na bibliografia.[68,73,76,102]

A região **II** é caracterizada por um aumento acentuado da pressão superficial, atingindo um valor próximo de 4 mNm^{-1}. Esta região, corresponde ao estado líquido

expandido, em que começa ocorrer um maior número de interacções intermoleculares, contudo as moléculas de DPPC ainda se encontram desordenadas.

Na fase seguinte, o aumento da compressão, não surte grande efeito a nível da pressão superficial. A região **III**, corresponde, caracteristicamente, a um patamar, que representa a coexistência das fases de líquido expandido (LE) e líquido condensado (LC). Contudo ao observar a isotérmica obtida verifica-se que o patamar obtido não é muito nítido, uma vez que, apesar do aumento da pressão superficial ser menos acentuado, o intervalo de pressões nesta região – 4,3 a 6,8 mNm^{-1} – é ligeiramente diferente ao referido na bibliografia[76], que apresenta um intervalo de pressões para a transição de fase de 3,5 a 5,6 mNm^{-1}.

A região **IV**, corresponde ao estado líquido condensado, em que se verifica um aumento mais acentuado da pressão superficial, com a diminuição de área por molécula. Nesta fase, as moléculas de fosfolípidos encontram-se num estado mais organizado, estando as moléculas alinhadas paralelamente umas às outras. O declive da isotérmica obtida encontra-se concordante com os resultados descritos na bibliografia[68,73,76,102], sendo observado o início desta região para uma área por molécula próxima de 64 $Å^2$ e que se estende até 35 $Å^2$.

O colapso do filme de DPPC representa a região **V**, ocorrendo para pressões superiores a 55 mNm^{-1} e para uma área por molécula inferior a 35 $Å^2$. Esta região não é visível na isotérmica π-A da Figura 45.

Após a análise da isotérmica π-A de compressão de DPPC obtida experimentalmente, verificaram-se algumas diferenças no patamar característico dos fosfolípidos de cadeias alifáticas saturadas em relação ao descrito em diversos artigos[68,73,76,84,102]. As diferenças detectadas, sugerem algum tipo de contaminação da monocamada. Porém, após repetição da experiência, verificou-se que a isotérmica de compressão obtida era reprodutível. Apesar de não haver nenhuma justificação concreta para não obter um patamar mais nítido, a razão pode estar no facto do DPPC utilizado se encontrar na forma hidratada, podendo formar-se pequenos agregados de fosfolípido ou micelas, que influenciam a forma da isotérmica, nomeadamente o patamar LE-LC.[73]

A isotérmica ΔV-A do DPPC apresenta um comportamento que permite estabelecer um paralelismo com a isotérmica π-A. Assim, identifica-se uma primeira região em que o potencial é praticamente nulo e que corresponde ao estado gasoso, no qual as interacções intermoleculares são mínimas ou mesmo inexistentes. A partir de uma área por molécula próxima de 110 $Å^2$, o potencial começa a aumentar até atingir $\approx$ 200 mV, formando-se depois um patamar que se prolonga até 65 $Å^2$, no qual a variação de potencial é de aproximadamente

50 mV, tal como se verificou na isotérmica π-A, o patamar não é muito óbvio, identificando-se antes um declive menos acentuado. Para áreas por molécula inferiores a 65 $Å^2$ o declive da isotérmica torna-se mais acentuado, atingindo-se um potencial de superfície máximo de 512 mV.

Em relação à isotérmica ΔV-A do DPPC identificaram-se algumas discrepâncias, tanto a nível dos valores de potencial atingidos, como nos intervalos de áreas por molécula que ocorre as transições de estado da monocamada. Essas divergências surgem não só em relação aos resultados obtidos neste trabalho, mas também entre a literatura consultada [102,104-108], sendo a transição do estado gasoso para o estado líquido expandido, um dos exemplos em que área por molécula referenciada varia entre 110 e 90 $Å^2$. Estas variações são fruto da extrema sensibilidade do potencial de superfície, que dificulta a reprodutibilidade da isotérmicas.[109]

Como os ensaios com DPPC foram realizados utilizando água ultrapura como subfase, foi necessário recorrer à literatura para descrever o efeito do pH na monocamada deste fosfolípido. Na Figura 46 encontram-se as isotérmicas π-A da monocamada de DPPC, em diferentes subfases, que foram determinadas por Eeman e colaboradores[110].

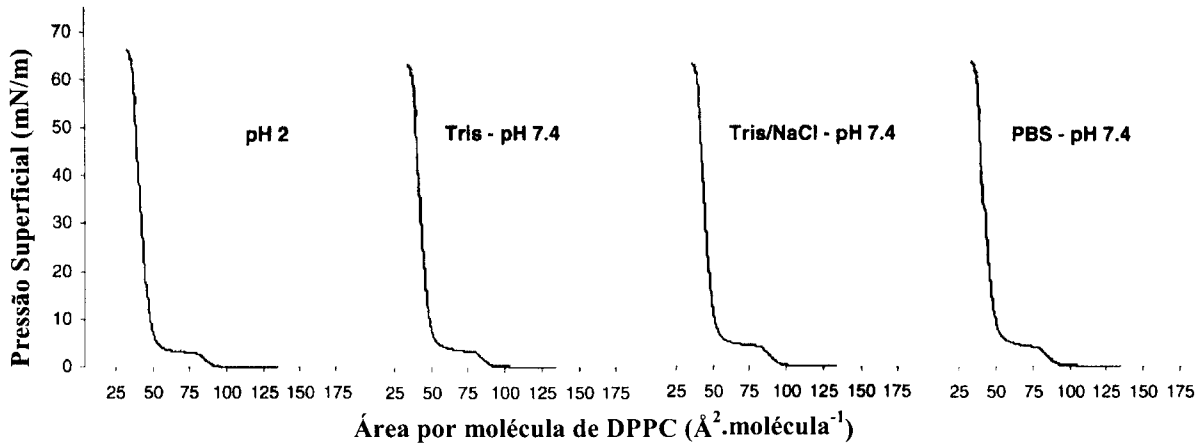


Figura 46 – Efeito do pH e do sal da subfase na isotérmica π-A da monocamada de DPPC[110]

Ao comparar as isotérmicas obtidas por Eeman[110] não se identificam diferenças na forma e características da isotérmica π-A do DPPC, o que sugere que a monocamada não sobre influência da natureza da subfase, seja do pH ou dos diferentes sais utilizados com tampão. Estes resultados são concordantes com alguns trabalhos desenvolvidos por Shibata e o seu grupo de investigação[83,104-108], em que a forma das isotérmicas π-A e ΔV-A do DPPC não sofrem alterações para um intervalo de pH de 2 a 7,4, independentemente do sal utilizado.

A independência da monocamada de DPPC quanto à natureza da subfase também foi estudada e referenciada por Shapovalov, que descreve a afinidade de alguns aniões e catiões com a monocamada deste fosfolípido, sendo esta praticamente nula devido às fortes interacções dipolo-dipolo entre os grupos fosfato e colina do DPPC. Shapovalov defende que os iões com carácter hidrofóbico interagem fortemente com parte polar do fosfolípido, sendo que por vezes, para além das interacções electrostáticas podem também ocorrer interacções hidrofóbicas que viabilizam a incorporação dos iões na monocamada. Shapovalov refere ainda, que apesar das interacções da monocamada de DPPC ocorrerem tanto com aniões como catiões hidrofóbicos, há uma maior tendência para estas ocorram entre aniões hidrofóbicos e o grupo colina do DPPC, uma vez que este está mais acessível do que o grupo fosfato que se encontra rodeado com água devido às ligações por ponte de hidrogénio.[111]

3.2.3. Estudo de Filmes de DPPC com OLA-AuNPs na subfase

Os ensaios realizados com filmes de DPPC na presença de nanopartículas de ouro na subfase tiveram o objectivo de estudar o efeito do pH na incorporação de OLA-AuNPs na monocamada de DPPC, e surge na sequência do estudo anteriormente elaborado, no qual são analisadas as alterações da isotérmica de compressão π-A de filmes de DPPC na presença de determinados volumes de nanopartículas diluídos na subfase. No estudo anteriormente realizado verificou-se que ocorre uma expansão do filme de DPPC, indiciando a incorporação de nanopartículas na interface, sendo a expansão tanto maior quanto maior o volume de nanopartículas de ouro introduzido na subfase. Verificou-se, também, o deslocamento do patamar característico do DPPC, para valores de pressão superficial e de área por molécula mais elevados, ocorrendo uma diminuição progressiva da largura do patamar.[112]

Na Figura 47 estão representadas as isotérmicas do DPPC em diferentes soluções tampão nas quais foram diluídos 60μL de OLA-AuNPs.

Ao observar as isotérmicas π-A obtidas (Figura 47.B) e comparando-as com a isotérmica característica da monocamada de DPPC (Figura 45) verifica-se que ocorre um aumento da pressão superficial, o que é bastante perceptível na região do patamar LE-LC. A expansão do filme de DPPC na presença de AuNPs na subfase provoca um deslocamento da isotérmica de pressão para valores de área por molécula mais elevados, não sendo possível identificar a região correspondente ao estado gasoso, o que sugere que as interacções entre o fosfolípido e as nanopartículas não foram apenas electrostáticas, sendo possível que tenham ocorrido algumas interacções hidrofóbicas que viabilizaram a incorporação de nanopartículas de ouro na interface.

A influência do pH da subfase na forma da isotérmica π-A do DPPC é evidente, contudo o seu efeito não sugere nenhuma tendência específica, sendo perceptíveis três tipos de comportamento distintos: para valores de pH muito ácido (pH 2,3), para valores de pH intermédios (entre 4,8 e 8,5) e para valores de pH mais alcalinos; e reflectem-se tanto a nível da expansão do filme, como no intervalo de áreas e pressão superficial a que ocorre o patamar LE-LC.

Em relação à expansão do filme, esta é mais pronunciada para valores de pH intermédios, do que para os ensaios a valores de pH muito ácidos ou mais alcalinos. Tendo em conta que a monocamada de DPPC não é influenciada pelo pH, as alterações que se verificam nas isotérmicas π-A devem-se fundamentalmente às nanopartículas que se encontram diluídas na subfase. Como as AuNPs têm carga positiva em meios ácido ou pouco

alcalino, as interacções entre estas e o fosfolípido são favorecidas para valores de pH intermédios (pH de 4,8 a 8,5), fomentando uma maior expansão do filme para estes valores de pH. Quando o meio é mais alcalino, as nanopartículas tornam-se neutras, logo as interacções electrostáticas com o grupo fosfato do DPPC são mínimas, fazendo com que haja uma menor expansão do filme.

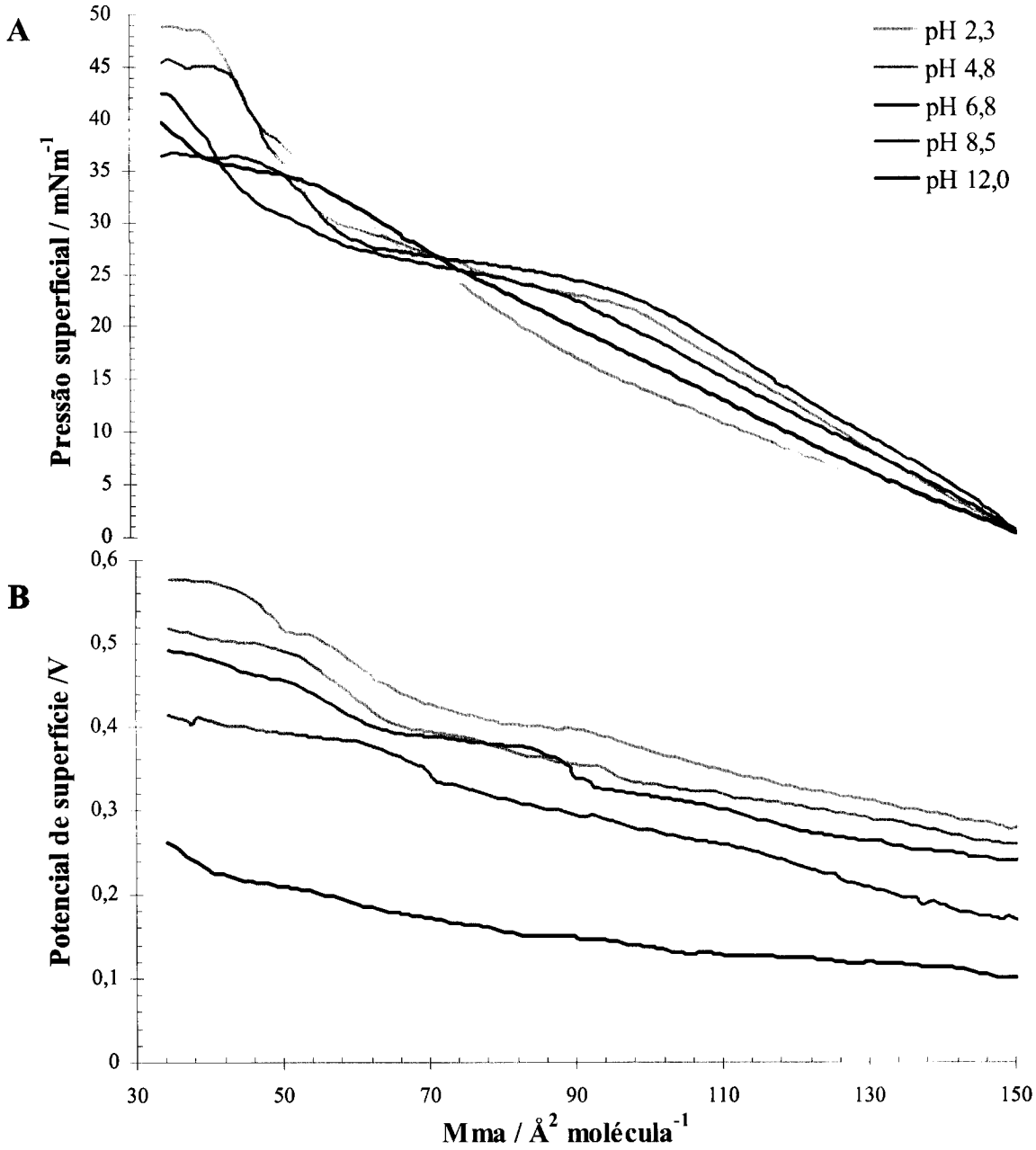


Figura 47 – Isotérmicas de compressão π-A e ΔV-A de DPPC na presença de 60μL de OLA-AuNPs na subfase a diferentes valores de pH

O patamar LE-LC, para valores de pH intermédios, surge para pressões superficiais próximas de 25-28 $mN.m^{-1}$, e tem início para uma área disponível por molécula elevada (90 -

100 Å^2), prolongando-se até aproximadamente 60 Å^2. A pH 2,3, o patamar é praticamente imperceptível, visualizando-se apenas uma pequena zona entre 55-50 Å^2, em que o declive é menos acentuado. A pH 12,0, o patamar ocorre a uma pressão superficial bastante elevada (≈ 35 mN.m^{-1}) e para uma área disponível de 60 a 40 Å^2.

O colapso do filme é observado em para todos os ensaios à excepção do ensaio a pH 12,0. Em relação aos filmes onde é possível observar o colapso, este é obtido a pressões superficiais tanto mais elevadas quanto mais ácida é a subfase.

A Figura 47.B ilustra as isotérmicas ΔV-A de compressão de filmes de DPPC na presença de nanopartículas de ouro na subfase, para diferentes valores de pH.

A isotérmica do potencial de superfície da monocamada de DPPC sofre alterações profundas quando se encontra um volume de nanopartículas diluídas na subfase, indiciando a efectiva incorporação destas na monocamada, assim estas alterações surgem devido à reorientação das moléculas que se encontram na interface ar/água.

Ao visualizar a isotérmica de potencial para pH 2,3 é possível identificar a zona característica da transição de fase líquido expandido – líquido condensado (patamar) que não foi possível identificar na isotérmica π-A. O patamar característico do DPPC é claramente visível para as curvas de potencial obtidas a pH 2,3, 4,8 e 6,7, sendo quase imperceptível a valores de pH 8,5 e 12,0. Os resultados obtidos não permitem explicar este efeitos, principalmente porque, nas isotérmicas π-A correspondentes, a transição de fase é facilmente detectada.

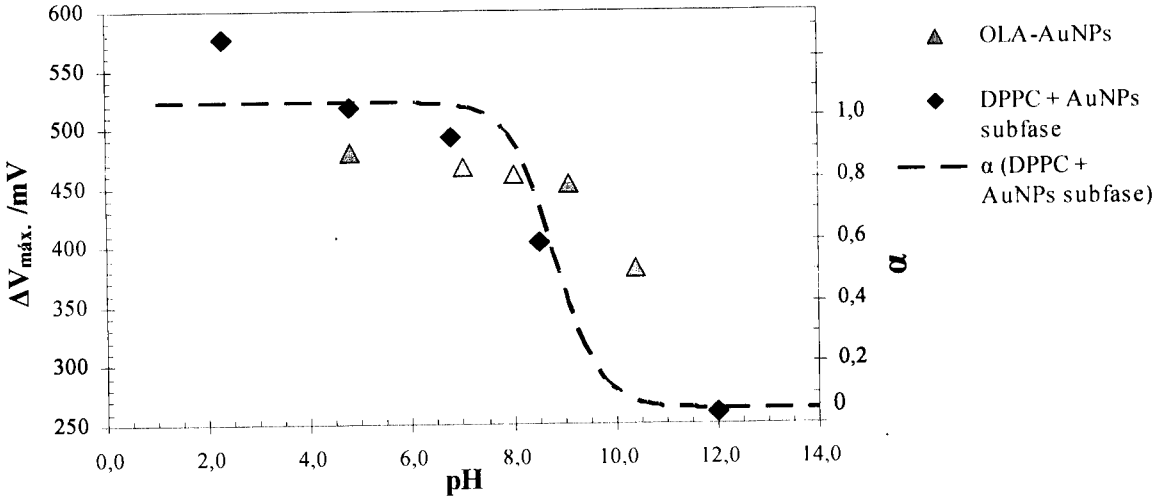


Figura 48 – Representação gráfica do potencial de superfície máximo de filmes de DPPC em função do pH da subfase, na presença de 60μL de OLA-AuNPs

Na Figura 48 são apresentados os valores do máximo de potencial de superfície para a monocamada de DPPC na presença de 60 μL de nanopartículas, para cada pH estudado. A

curva projectada por estes pontos assemelha-se à curva correspondente à monocamada de AuNPs, mas com um deslocamento da curva α referente à neutralização da monocamada para valores de pH mais baixos, assim no caso da monocamada de DPPC na presença de AuNPs na subfase, o pKa aparente é aproximadamente de 9, enquanto que na monocamada de nanopartículas o pKa aparente é 10.5. Como o potencial da monocamada de DPPC não é afectado pelo pH, as alterações que ocorrem devem-se, provavelmente, às nanopartículas, o que justifica o facto das duas curvas apresentarem o mesmo comportamento.

Os valores de compressibilidade máxima para os filmes de DPPC na presença de 60 μL de nanopartículas de ouro na subfase figuram na Figura 49, sendo notória a influência do pH do meio na rigidez dos filmes. A compressibilidade atinge valores mínimos, próximos de 0.017 $m.mN^{-1}$, para valores de pH ácidos (2.3 e 4.8), à medida que a acidez da subfase diminui a compressibilidade tende a aumentar, sendo esse aumento muito acentuado para meios mais alcalinos. A maior diferença de compressibilidade ocorre entre os ensaios a pH 8.5 e 12.0, em que se observa um aumento de 0.021 para 0.044 $m.mN^{-1}$, verificando-se uma grande diminuição da rigidez dos filmes quando o pH é muito elevado. A causa desta diminuição estará muito provavelmente associada ao facto das nanopartículas tornarem-se neutras para valores de pH mais alcalinos, o que influencia as interacções com a monocamada de DPPC, condicionando dessa forma a organização do filme. Ao comparar os valores de compressibilidade obtidos.

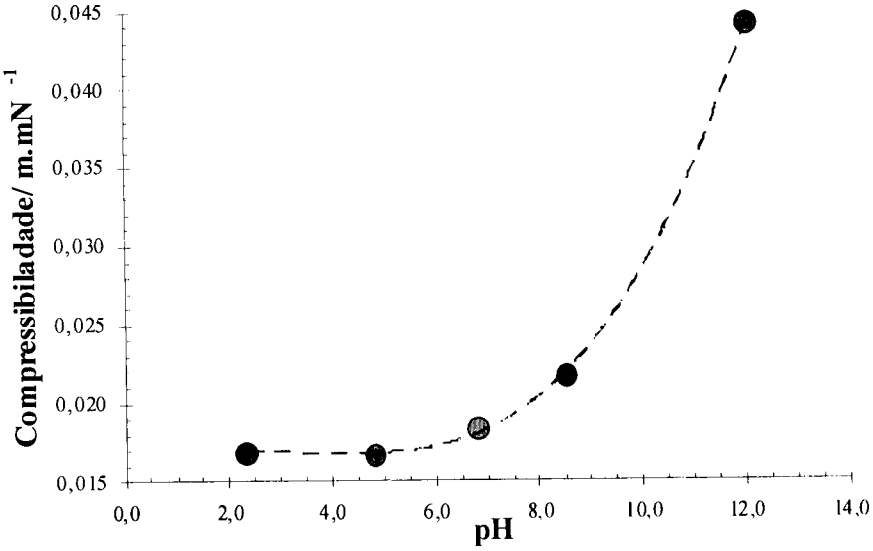


Figura 49 – Variação da compressibilidade k_C dos filmes de DPPC em função do pH da subfase, na presença de 60μL de OLA-AuNPs

Na Figura 50 são apresentados os valores de energia de Gibbs calculados para o processo de compressão da monocamada de DPPC em que foram utilizadas subfases com diferentes pHs e na qual se encontravam nanopartículas de ouro. Tal como se procedeu para os dois estudos anteriores, foram determinados os valores de ΔG_c utilizando seis intervalos de pressão superficial, de modo a avaliar possíveis alterações nas características termodinâmicas dos filmes ao longo da compressão.

Globalmente, os valores de ΔG_c para cada série não variam muito entre si, sendo o valor mais baixo obtido para o pH 2,3 (19,45 $kJ.mol^{-1}$) e o valor mais elevado obtido para o ensaio realizado a pH 8,5 (21,8 $kJ.mol^{-1}$), o que aponta para uma fraca influência do pH nas características termodinâmicas dos filmes. Verifica-se que há um aumento um pouco mais acentuado de ΔG_c na passagem do intervalo de integração de 0,5-10 para 0,5-15, e que o intervalo estudado entre 0,5-15 apresenta a série de ΔG_c que mais se afasta do comportamento global, uma vez que apresenta uma diminuição da energia de Gibbs para o pH 6,8 que não se verifica nas restantes séries.

Pode-se assim afirmar, tendo como base o modelo proposto por Goodrich e Gaines, que o ensaio onde se observaram maiores alterações termodinâmicas ao longo do processo de compressão foi referente à monocamada estudada a pH 6,8.

O valor de ΔG_c da monocamada de DPPC sem AuNPs na subfase e a pH $\approx$ 7, para o intervalo de integração maior, é de 15,2 $kJ.mol^{-1}$, o que revela um aumento da energia de compressão na presença de nanopartículas de ouro na subfase (ΔG_c = 20,8 $kJ.mol^{-1}$), devido à incorporação de AuNPs na monocamada.

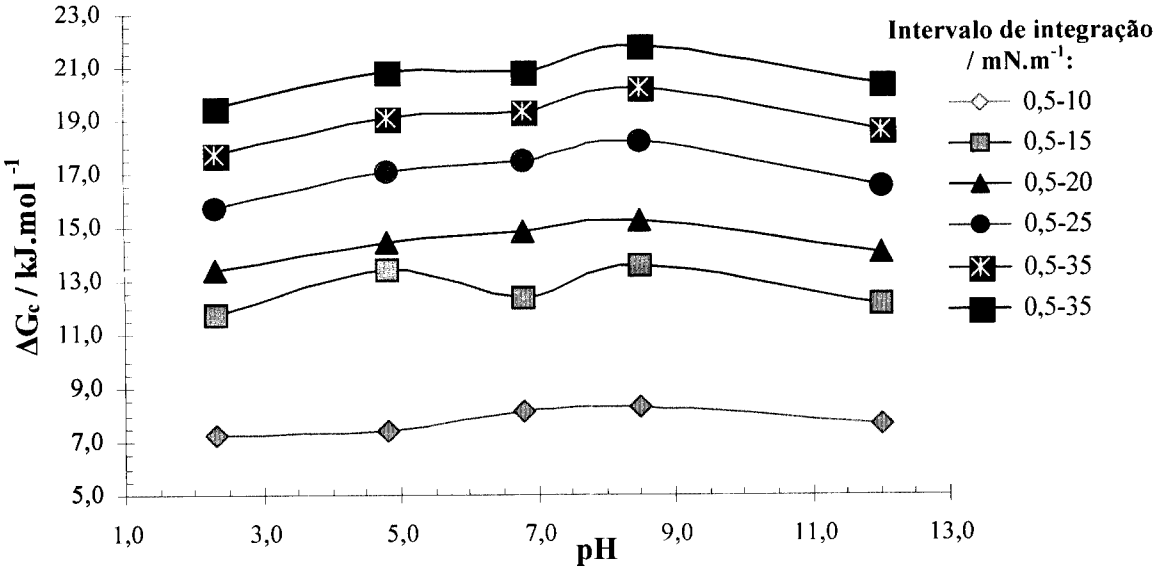


Figura 50 – Efeito do pH na energia de Gibbs de compressão de filmes de DPPC na presença de 60 µL de OLA-AuNPs na subfase

Os valores determinados para energia de Helmholtz também não sofrem grandes oscilações com o pH da subfase. Foram utilizados quatro intervalos de área no cálculo de ΔF_c, os resultados obtidos estão representados na Figura 51.

A variação de energia de compressão de Helmholtz é, menor do que ΔG_c, uma vez que a variação de ΔF_c é de apenas 0,63 $kJ.mol^{-1}$ para o intervalo de integração maior (100-40 $Å^2$.molécula^{-1}).

O aumento de ΔF_c é uniforme ao longo do processo de compressão, verificando-se um aumento, praticamente constante, à medida que se alarga o intervalo de compressão, ocorrendo apenas pequenos desvios nas séries estudadas. O exemplo mais óbvio surge para o pH 6,8, em que o desvio, já observado nos valores de ΔG_c, se torna mais evidente, denotando uma alteração do comportamento do filme nestas condições do meio.

O ΔF_c da monocamada de DPPC, a pH $\approx$ 7, na ausência de nanopartículas na subfase (3,4 $kJ.mol^{-1}$) é bastante inferior ao valor de ΔF_c quando na presença de AuNPs na subfase (9,6 $kJ.mol^{-1}$), comportamento este já observado nos valores da energia de Gibbs.

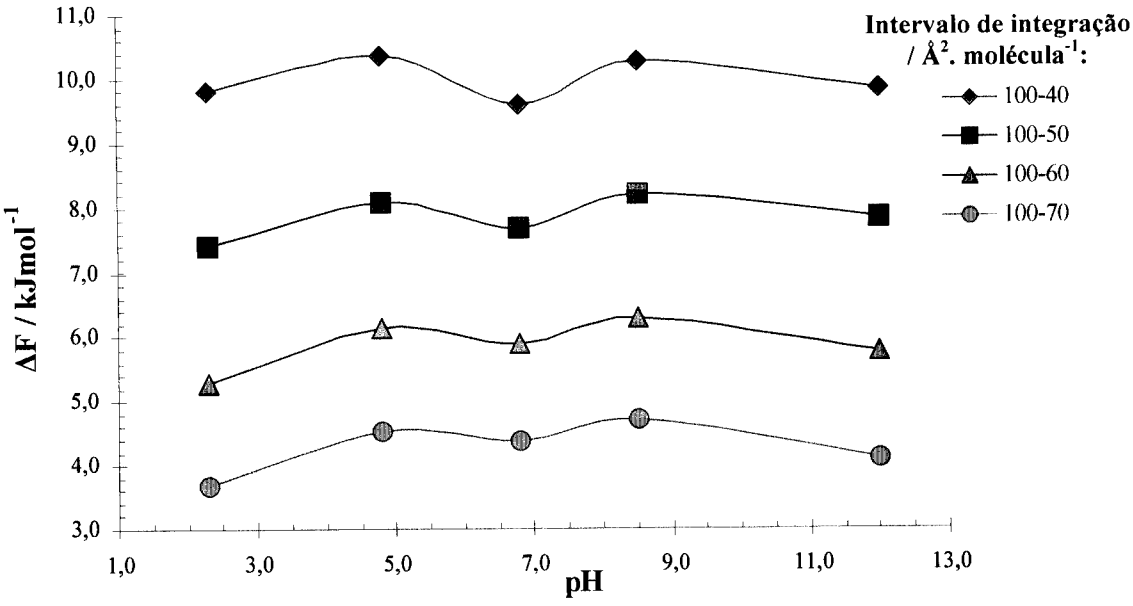


Figura 51 – Efeito do pH na energia de Helmhotz de compressão de filmes de DPPC na presença de 60 µL de OLA-AuNPs na subfase

É de salientar que ao partir do cálculo de ΔG_c e ΔF_c, chegou-se à mesma conclusão, isto é que o pH não exerce um efeito determinante nas características termodinâmicas ao longo do processo de compressão da monocamada.

3.2.4. Estudo de Filmes de DPPC e OLA-AuNPs

Na Figura 52 são apresentadas as isotérmicas de compressão obtidas para filmes compostos por dois componentes: DPPC e nanopartículas de ouro.

Ao analisar as isotérmicas de compressão π-A (Figura 52.A) verifica-se que, independentemente do pH, ocorre uma alteração do patamar LE-LC característico do DPPC. Este resultado sugere que os dois constituintes da monocamada, o fosfolípido e as AuNPs, são miscíveis, uma vez que quando os componentes são imiscíveis, a monocamada é constituída por duas fases separadas, obtendo-se uma isotérmica π-A em que as principais características de cada componente se mantêm inalteráveis, logo no caso do DPPC, o patamar LE-LC apareceria sempre à mesma pressão superficial, entre 3,5 e 5,6 mNm^{-1}.

As alterações que o patamar LE-LC do DPPC sofre, não são comuns a todas as isotérmicas π-A obtidas, provavelmente porque o pH da subfase interfere nas interacções entre o DPPC e as nanopartículas e na orientação que as moléculas adquirem ao longo do processo de compressão. Na isotérmica π-A a pH 2,2, o patamar LE-LC não é identificado, tal como sucedeu no estudo anterior em que se diluiu um volume de nanopartículas na subfase. Tendo em conta que as quantidades dos dois componentes se mantiveram constantes para todos os valores de pH, o facto de não ser visível a região de coexistência do estado de líquido expandido e líquido condensado, apenas para o pH 2,2 sugere a existência de algum efeito/fenómeno que não é visível para os restantes valores de pH, sendo o que suscita maior curiosidade é facto deste comportamento não se estender a outros ensaios, nomeadamente a pH 1,1, pois se assim fosse poderia indiciar algum fenómeno típico para meios em que acidez fosse mais severa. Apenas com o estudo realizado não é possível avaliar as interacções entre os componentes que poderiam justificar este comportamento atípico para o ensaio a pH 2,2. Para os restantes valores de pH, o patamar LE-LC do DPPC é facilmente identificável, tendo este sido deslocado para valores de pressão superficial muito superiores à pressão a que ocorre quando a monocamada é constituída apenas por este fosfolípido. Não é possível estabelecer uma ordem nos ensaios quanto ao efeito do pH na interacção, uma vez que este é um pouco aleatório assim, os patamares mais nítidos e que se estabelecem por um intervalo de área maior são a pH 1,1 ($\pi \approx 33$ $mN.m^{-1}$), 11,3 ($\pi \approx 29$ $mN.m^{-1}$) e 12,0 ($\pi \approx 26$ $mN.m^{-1}$). O patamar da isotérmica a pH 4,7 tem uma variação de pressão superior aos ensaios referidos anteriormente ($\pi \approx 28$-32 $mN.m^{-1}$), contudo é bastante mais nítido do que o patamar a pH 7,0 e pH 10,3.

O colapso da monocamada mista ocorre a uma pressão superficial tanto mais elevada quando mais ácida é a subfase, há excepção do pH 4,7, no qual o filme atinge o colapso a uma pressão superficial muito elevada (≈ 49 $mN.m^{-1}$), o que indicia que a este pH a interacção entre os dois componentes é favorecida, obtendo-se um filme mais estável com um arranjo das moléculas mais organizado.

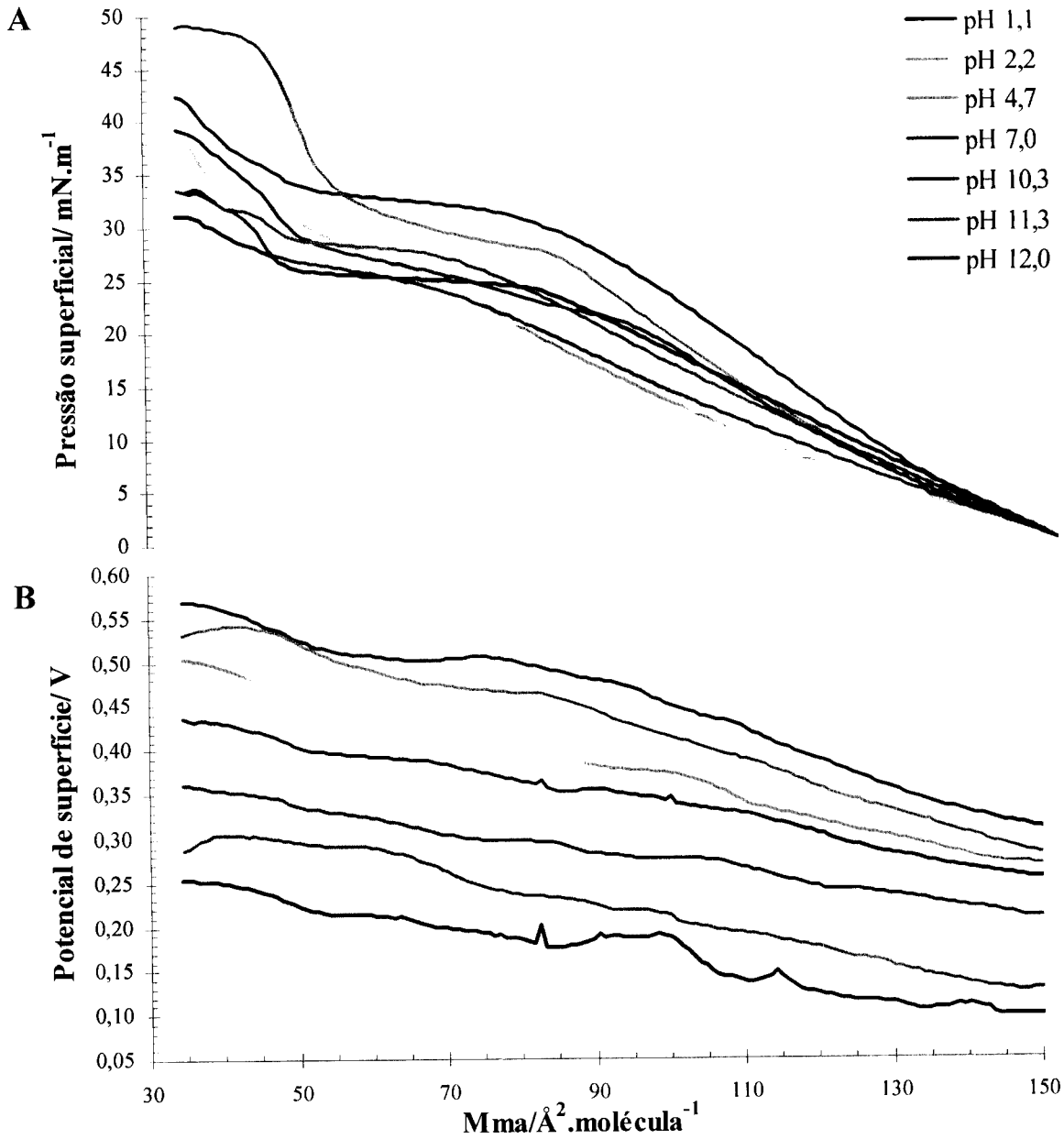


Figura 52 – Isotérmicas π-A e ΔV-A de compressão de filmes de dois componentes: DPPC e OLA-AuNPs, a diferentes valores de pH

Na Figura 52.B estão representadas as isotérmicas correspondentes ao potencial de superfície, sendo notório que estas apresentam algumas diferenças comparativamente à isotérmica ΔV-A da monocamada do DPPC puro.

Nas isotérmicas de potencial de superfície é possível identificar pequenas alterações no declive da curva que não são visíveis nas isotérmicas π-A. Tendo em conta que o potencial é bastante mais sensível do que a pressão superficial, estas pequenas mudanças de declive provavelmente são indício de pequenos ajustes na orientação das moléculas na interface ar/água. Também o patamar característico da coexistência das fases LE-LC do DPPC é facilmente detectado nas isotérmicas ΔV-A. A isotérmica de potencial a pH 2,2 apresenta um patamar entre os 105 e 90 $Å^2$, que sugere uma região de coexistência de fases que não é identificado na isotérmica π-A.

Os resultados obtidos pelas isotérmicas de potencial revelam informações acerca da estrutura da monocamada que não são partilhadas pelas isotérmicas π-A Todavia para conseguir fazer uma avaliação das interacções e do modo com o pH influencia essas interacções seria necessário recorrer a outras técnicas que permitissem o estudo da monocamada, tal como a microscopia de ângulo de Brewster.

A Figura 53 apresenta os valores máximos de potencial de superfície obtidos para cada ensaio, verificando-se um decréscimo do potencial com o aumento do pH.

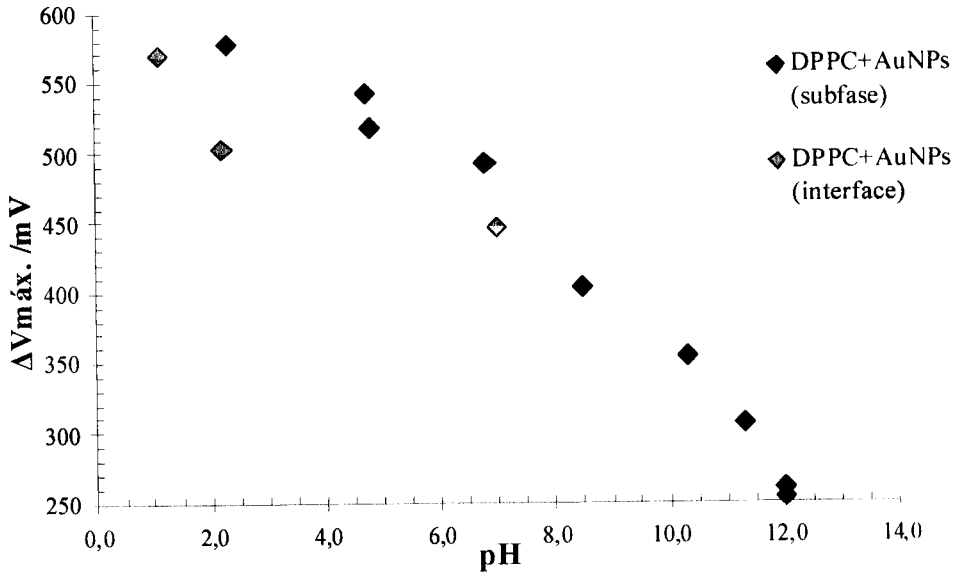


Figura 53 – Representação gráfica do potencial de superfície máximo de filmes de DPPC e OLA-AuNPs na interface e na subfase, em função do pH

Para justificar os valores de ΔV obtidos é necessário ter conta as diferentes contribuições do potencial e a sua natureza, o que se torna difícil tendo em conta que a monocamada é constituída por dois componentes, logo as variações de potencial podem estar associadas a mudanças da contribuição do momento dipolar, uma vez que a interacção dos

dois constituintes pode estimular reorientações do dipolo da água, ou dos dipolos da região polar ou ainda das cadeias hidrofóbicas; as variações de potencial podem ter origem também a nível da contribuição da dupla camada, o que também não é fácil de ajuizar, visto que têm que ser contabilizados o grau de ionização de três grupos, o grupo amina das nanopartículas e os grupos fosfato e colina do DPPC.

Dos valores de $\Delta V_{máx}$ obtidos, o potencial a pH 2,2 evidencia-se, visto que a isotérmica apresenta um potencial máximo (503 mV) inferior ao esperado, quando comparado com os valores de potencial obtidos no estudo das nanopartículas de ouro (606 mV) e no estudo do DPPC na presença de um volume de AuNPs na subfase (577 mV).

Esta variação indica que os valores de $\Delta V_{máx}$ são mais difíceis de medir em meios mais ácidos, devido às grandes flutuações nos resultados.

Na Figura 54 estão representados os valores de compressibilidade máxima determinados para as monocamadas mistas e para a monocamada de DPPC com nanopartículas de ouro na subfase. Verifica-se que, tal como ocorrera no estudo dos filmes de oleamina, surgem duas tendências distintas que convergem para um valor mínimo de compressibilidade a pH próximo de 4. No caso da OLA conjecturou-se que havia dois efeitos a ter em conta: o efeito de blindagem e o efeito de carga da monocamada. No estudo de filmes mistos é mais complicado sugerir uma explicação, pois como já foi referido o sistema tem diversas variantes sendo o resultado um equilíbrio entre estas.

Ao comparar os valores de compressibilidade das monocamadas mistas com os valores obtidos para as monocamadas de DPPC com AuNPs na subfase, verifica-se a mesma tendência para valores de pH superiores a 4, contudo com um ligeiro deslocamento para valores de κ_C mais elevados para as monocamadas mistas, à excepção dos filmes a pH 4,7/4,8 em que a compressibilidade é praticamente igual.

Os filmes mistos de DPPC e OLA-AuNPs mais compactos são formados a pH 4,7 (κ_C igual a 0,016 $m.mN^{-1}$) o que vai de encontro com as ilações retiradas da análise das isotérmicas π-A, em que considera que, a este pH, os filmes têm um arranjo molecular mais ordenado. Os filmes menos compactos surgem para meios alcalinos (pH 10,2 a 12,0) com factores de compressibilidade a variar entre 0,041 e 0,056 $m.mN^{-1}$.

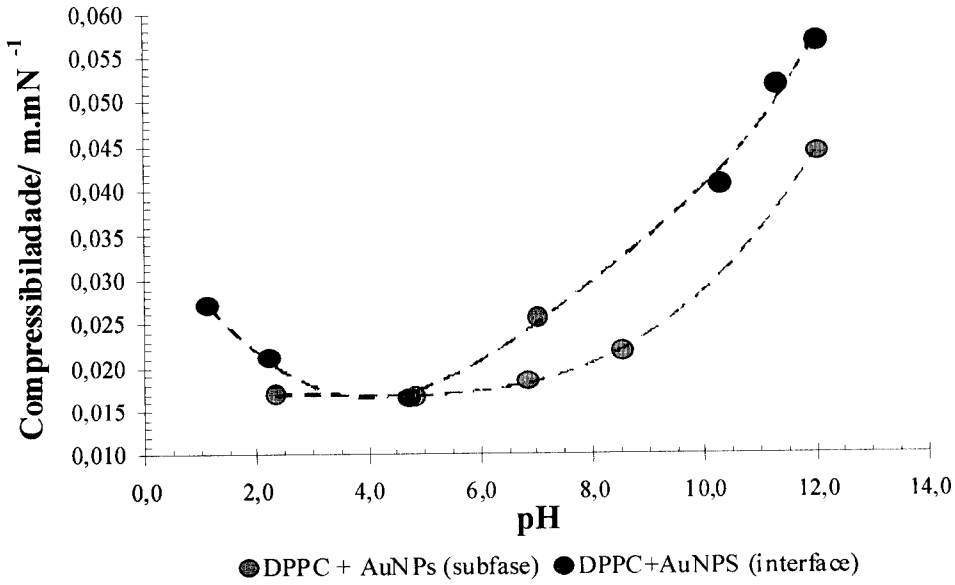


Figura 54 – Variação da compressibilidade k_c dos filmes mistos de DPPC e OLA-AuNPs (na interface) e DPPC com OLA-AuNPs na subfase

As propriedades termodinâmicas da compressão do filme de DPPC e OLA-AuNPs, foram estudadas, determinando-se os valores de $\Delta G_c(\pi)$ e de $\Delta F_c(A)$. Na Figura 55 estão representados os valores calculados para a energia de Gibbs necessária ao processo de compressão de filmes compostos por DPPC e AuNPs em que, contrariamente ao estudo do DPPC na presença de NPs na subfase, há uma ligeira tendência da diminuição dos valores de ΔG_c com o pH.

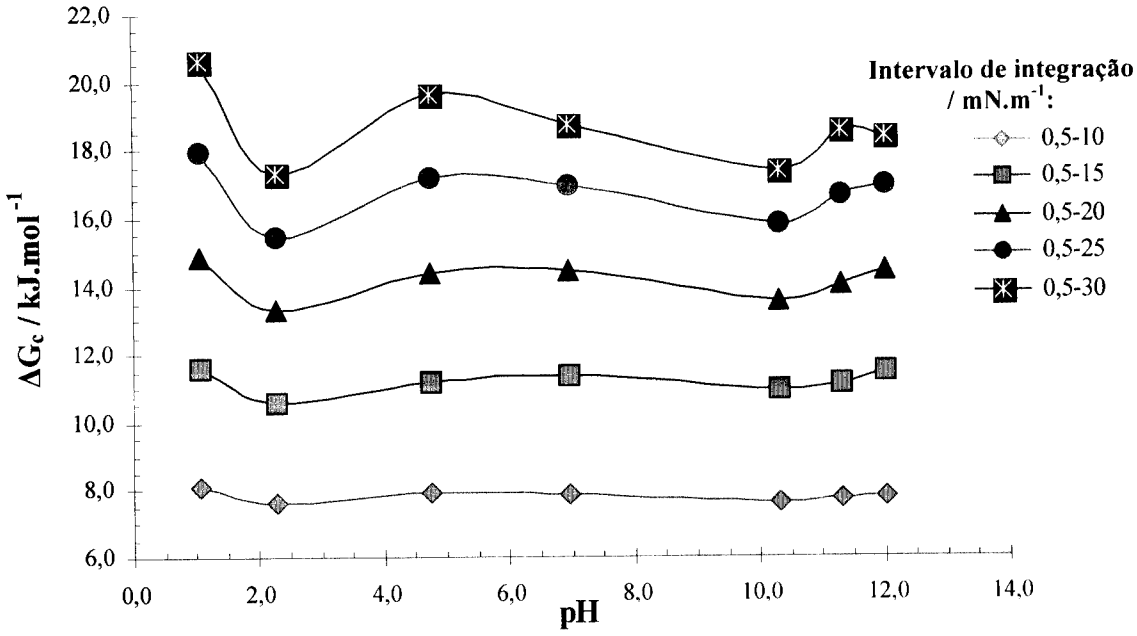


Figura 55 – Efeito do pH na energia de Gibbs de compressão de filmes de DPPC e OLA-AuNPs

Na compressão da monocamada até aos 10 $mN.m^{-1}$, os valores de ΔG_c praticamente não variam com o pH, só para valores de pressão superficial mais elevados é que a diferenças de energia necessária à compressão se começam a definir, verificando-se dois valores mínimos de ΔG_c para os valores de pH 2,2 e 10,3. É provável, que o decréscimo de energia esteja associada com o facto do pH se encontrar próximo dos valores de pKa do grupo fosfato ou do pKa da amina, logo há uma alteração da carga da monocamada que facilita a sua compressão devido à diminuição das repulsões.

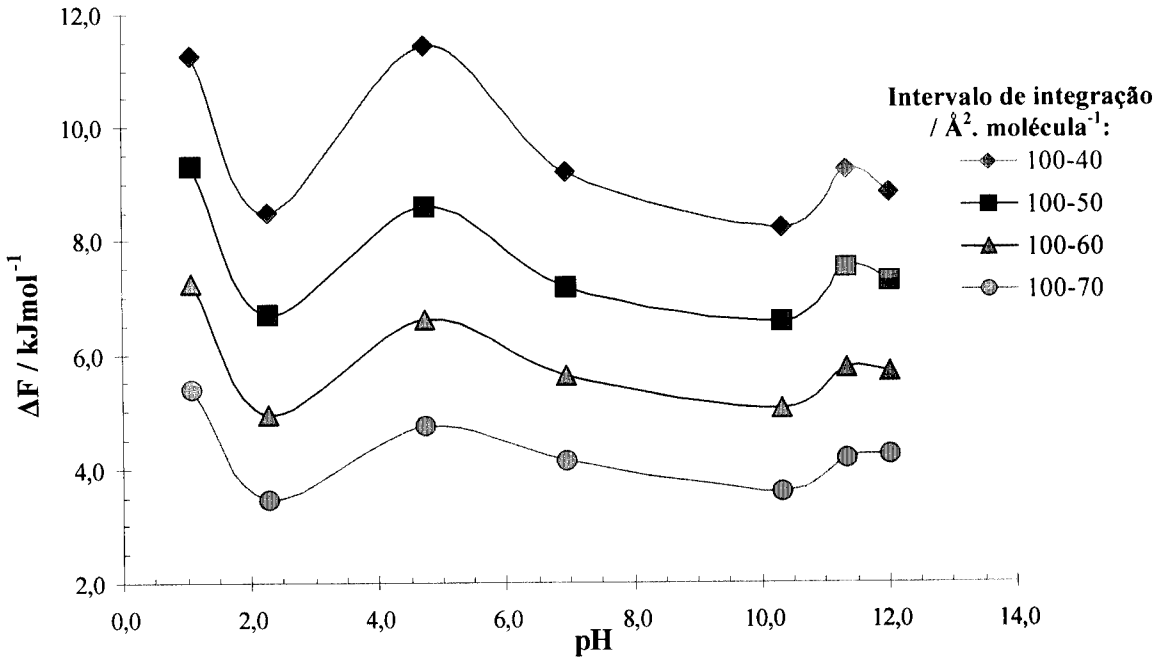


Figura 56 – Efeito do pH na energia de Helmholtz de compressão de filmes de DPPC e OLA-AuNPs

A tendência dos valores de ΔF_c (Figura 56) é semelhante à apresentada pelos valores da energia de Gibbs. Constata-se que esta tendência surge desde o início da compressão da monocamada, acentuando-se à medida que a compressão prossegue. Os valores de ΔF_c para os valores de pH 1,1 e 4,7 apresentam os valores mais elevados, 11,3 e 11,4 $kJ.mol^{-1}$, respectivamente, enquanto que para os restantes pHs, ΔF_c varia entre 8,2 (pH 10,3) e 9,2 $kJ.mol^{-1}$ (pH 11,3).

Os resultados para ΔG_c e ΔF_c parecem indicar o efeito da protonação do grupo fosfato do fosfolípido (pKa = 1,9) e da colina e oleamina (pKa = 9).

3.3. Estudo de Filmes de Langmuir-Blodgett

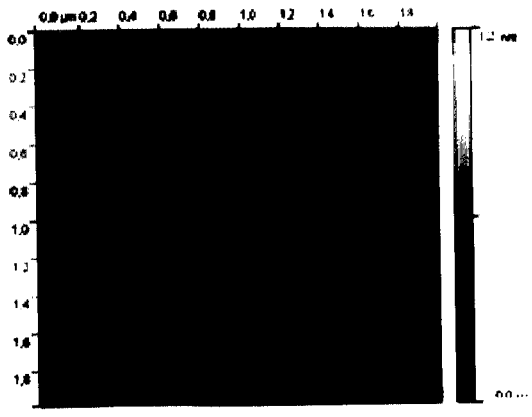
O estudo das monocamadas de OLA-AuNPs foi precedido da deposição dos filmes em substrato de mica e caracterização da sua superfície por AFM. A transferência da monocamada de nanopartículas de ouro para a mica foi realizada a três pressões superficiais distintas: 5, 20 e 30 $mN.m^{-1}$.

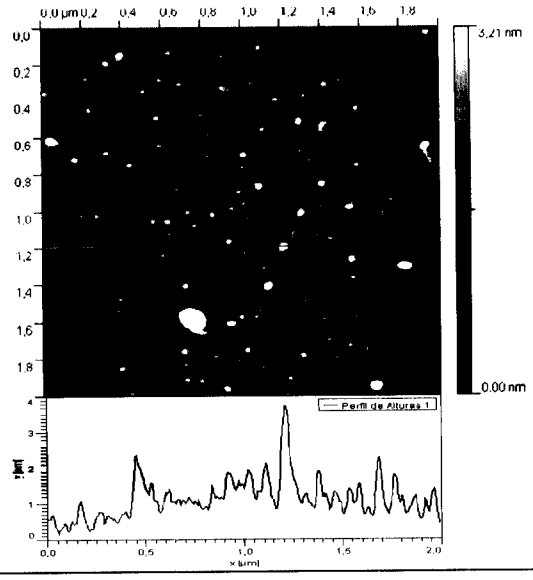
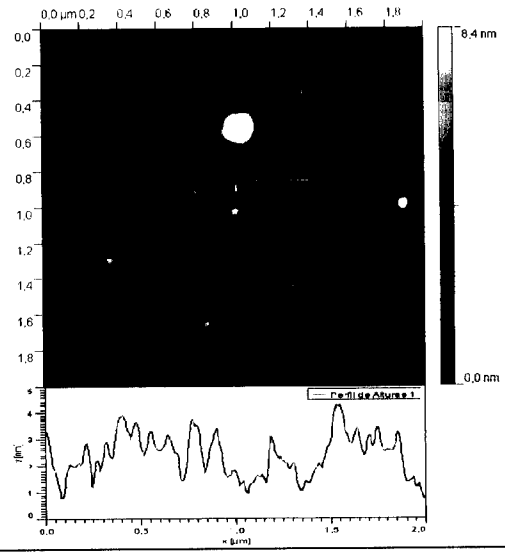
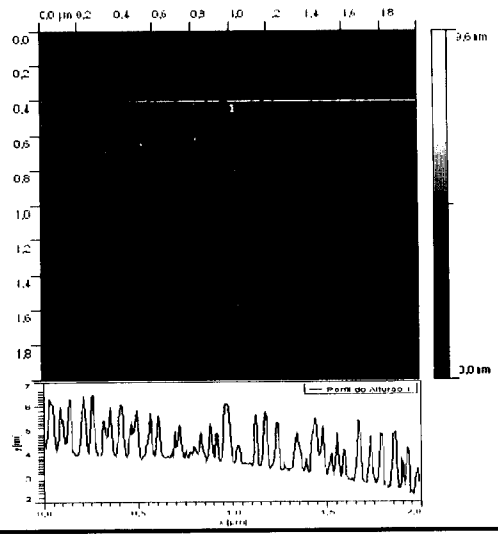
A eficácia da deposição dos filmes de AuNPs depende muito da pressão superficial a que a esta é efectuada, uma vez que a estrutura e a densidade superficial da monocamada de nanopartículas de ouro podem ser controladas por alteração deste parâmetro. Verificou-se que a deposição de filmes pouco compactos é um processo delicado, em que podem ocorrer alterações estruturais durante a transferência, que se traduzem em transferências de fraca qualidade, mesmo quando a velocidade de deposição é reduzida (5 $mm.min^{-1}$).

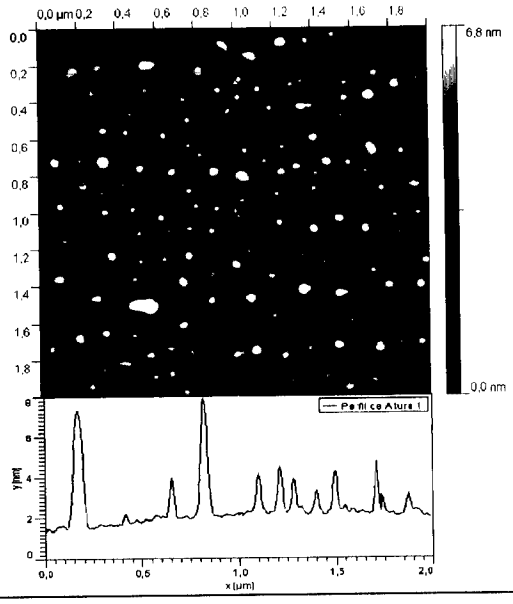
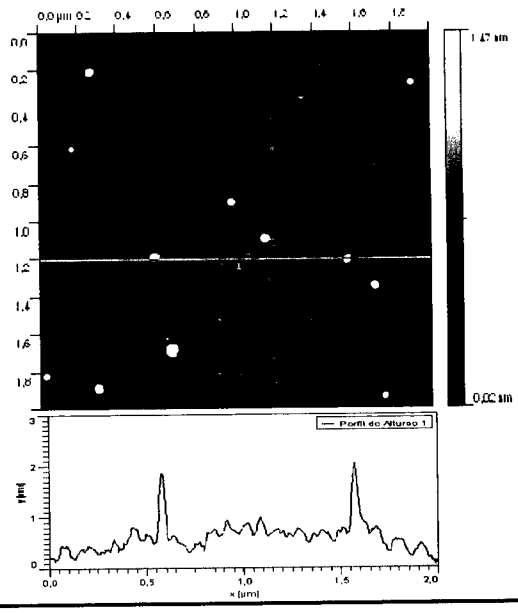
Nos ensaios realizados a pressões baixas obtiveram-se razões de transferência praticamente nulas e a sua caracterização por AFM foi ineficaz, não tendo sido possível obter imagens topográficas de qualidade aceitável. Deste modo apenas são apresentadas imagens de AFM de filmes LB à pressão superficial de 30 $mN.m^{-1}$, para uma velocidade de deposição de 5 $mm.min^{-1}$.

Na Tabela 7 são apresentados alguns dados referentes aos filmes de LB, como a razão de transferência, as imagens topográficas 2000x2000 nm, o perfil de alturas e a rugosidade (RMS) da superfície do filme.

Tabela 7 – Dados referentes à deposição da monocamada de OLA-AuNPs em mica a diferentes pHs, a pressão superficial de 30 $mN.m^{-1}$ e correspondente imagem topográfica obtida por AFM

	$R_{transferência}$	*Imagem Topográfica*	*RMS / nm*
Mica	-		0,036

OLA-AuNPs a pH 2.2	0,776		0,590
OLA-AuNPs a pH 4.9	0,569		1,090
OLA-AuNPs a pH 7.0	0,692		0,855

OLA-AuNPs a pH 8.0	0,263		0,890
OLA-AuNPs a pH 12.0	0,110		0,175

As razões de transferências das monocamadas de nanopartículas para o slide de mica apresentam valores baixos, nunca se aproximando dos 100%, sendo que os valores mais elevados foram nas deposições dos filmes em meios com pH ácido ou neutro.

Na análise das imagens topográficas obtidas por AFM, verifica-se que há uma maior cobertura da mica quando a deposição é efectuada numa subfase tamponada a pH 4,9 ou 7,0 observando-se uma diminuição progressiva no grau de cobertura para pHs alcalinos, sendo quase inexistente a pH 12. A cobertura da mica vai diminuindo à medida que o pH da subfase se torna mais alcalino devido à diminuição do grau de ionização da monocamada, assim quando o pH se encontra entre 4,9 e 7,0 a monocamada está bastante ionizada fomentando as ligações das nanopartículas à mica que tem na sua superfície cargas negativas, quando o meio

se torna alcalino o grau de ionização é menor traduzindo-se num menor número de ligações entre nanopartículas e mica, quando o pH é superior ao valor de pKa da oleamina (estabilizante das AuNPs), a monocamada encontra-se num estado não ionizado inviabilizando a ligação das nanopartículas à mica, o que justifica o reduzido número de nanopartículas que se observa na imagem a pH 12.

Ao observar a imagem topográfica do filme LB a pH 4,9 verifica-se a formação de domínios de nanopartículas (zonas mais claras) e pequenas zonas escura correspondentes à superfície da mica. A estrutura do filme de nanopartículas de ouro a este pH diverge das imagens obtidas para os restantes valores de pH, em que são bastante perceptíveis as formas arredondadas das nanopartículas ou aglomerados formando em torno da nanopartículas.

Os valores de RMS revelam que os filmes com maior rugosidade são obtidos em pH ácido ou neutro, sendo que a rugosidade apresenta a mesma tendência que o grau de cobertura da mica, isto é a rugosidade diminui tendencialmente para valores de pH alcalinos.

Na análise das imagens de AFM foi possível determinar o tamanho das nanopartículas, verificando-se que, estas têm uma dispersão de tamanhos entre 19 e 35 nm.

Utilizaram-se três técnicas de caracterização de nanopartículas distintas: TEM, AFM e Potencial Zeta. A partir destas três técnicas foi possível determinar o diâmetro das AuNPs e o erro associado a este valor. Todavia, verifica-se que os valores obtidos divergem entre si. Esta divergência deve-se ao facto das diferentes técnicas se basearem em príncipios distintos que são sujeitos a erros diferentes.

Assim, no TEM pode observar-se aglomeração de partículas devido ao método de deposição, não existindo uma grande resolução em profundidade. Com esta técnica a determinação do diametro das partículas é baseado na diferença de contraste da imagem resultado da reflexão dos electrões. Ao visualizar uma imagem TEM, normalmente, só é notório a zona do núcleo metálico, logo o valor determinado para o diâmetro das nanopartículas é inferior ao real, uma vez que a contribuição espacial dos ligandos não é contabilizada.

No AFM, a forma e dimensões das partículas estão fortemente condicionadas pela forma e dimensão das pontas usadas na obtenção das imagens topográficas, podendo-se afirmar que, de forma geral, a dimensão obtida por este método é superior ao valor real.

Sendo as determinações do potencial zeta realizadas em solução, as espécies estarão hidratadas e rodeadas por contra-iões, havendo um efeito de grau de hidratação e da dupla camada eléctrica nas características e dimensões da partículas determinadas por este método.

Cada técnica mede uma diferente propriedade das partículas e como tal surgirão diferentes respostas consoante a técnica de caracterização e dependendo das dimensões medidas. Deste modo, os resultados obtidos só devem ser comparados, de forma correcta, quando usada a mesma técnica de caracterização.

CAPÍTULO IV

Conclusões

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões do estudo de filmes dos Langmuir e Langmuir-Blodgett. Na parte final são apresentadas algumas sugestões para futuros estudos.

A utilização da oleamina como agente redutor e estabilizante, permitiu obter uma solução coloidal de AuNPs com forma bem definida, com carga positiva, extremamente estáveis e com a capacidade de formar monocamada flutuantes.

A partir de análise das imagens obtidas no TEM, observou-se que as OLA-AuNPs apresentam uma forma quase esférica e um diâmetro médio de 12,1 nm com uma dispersão um pouco elevada, que provavelmente estará relacionada com o rácio molar Au:OLA. O potencial zeta permitiu avaliar a carga superficial das nanopartículas (positiva). Os espectros de absorção UV-Vis mostram a presença de uma banda a 527 nm e demonstraram que as nanopartículas são estáveis um ano após a sua síntese.

As medições da pressão e do potencial superficial realizadas com oleamina e OLA-AuNPs permitiram avaliar em que medida o estabilizante das nanopartículas era responsável pelo comportamento da monocamada de AuNPs ao longo da compressão. Foram identificadas algumas similitudes entre os ensaios da oleamina e das nanopartículas de ouro. Da análise das isotérmicas foi possível reconhecer dois efeitos associados ao pH da subfase: o de carga e o de blindagem por iões fosfato, o que nos permitem concluir que o pH e os sais utilizados na preparação da solução tampão interferem na forma da monocamada e consequentemente no processo de compressão.

A monocamada de DPPC foi estudada apenas em água, contudo o ideal seria fazer um estudo da monocamada a vários valores de pH com a utilização de sais de fosfato na preparação das soluções tampão usadas como subfase. Todavia devido a escassez de tempo não foi possível fazer um estudo tão aprofundado, tendo os resultados sido baseados em estudos realizados por alguns grupos de investigação, que afirmam que a monocamada de DPPC não é influenciada pelo pH, nem interage com os iões fosfato que se encontram dissolvidos na subfase.[83,104-108, 110] Contudo quando as nanopartículas se encontram diluídas na subfase pode-se observar uma forte interacção entre estas e a monocamada do DPPC, sugerindo que as nanopartículas têm um forte carácter hidrofóbico, que viabiliza as interacções electrostáticas e hidrofóbicas entre estes. Neste caso, verifica-se que as interacções entre o DPPC e as OLA-AuNPs sofrem influência do pH, obtendo-se filmes mais compactos para meios ácidos em detrimento de meios mais alcalinos.

No estudo de monocamadas mistas, compostas por DPPC e AuNPs, verificou-se que os dois componentes são miscíveis, sendo a interacção entre os dois componentes favorecida a pH 4,7, obtendo-se um filme mais estável com um arranjo das moléculas mais organizado.

Na Tabela 8 são apresentados os valores de pka aparentes determinados a partir dos valores de $\Delta V_{máx}$ obtidos para cada estudo.

Tabela 8 – Valores de pka aparentes determinado a partir dos valores de $\Delta V_{máx}$

	OLA	*OLA-AuNPs*	*DPPC + AuNPs subfase*	*DPPC + AuNPs interface*
pKa	9,0	10,5	9,0	9,0

Os valores de pka apresentados na Tabela 8 são referentes ao grupo amina, tendo sido determinados no decorrer deste trabalho, verificando-se que a neutralização da amina ocorre a um pH 9, à excepção do estudo as nanopartículas de ouro, para o qual, a amina torna-se neutra a um pH mais alcalino do que nos restantes estudos.

A caracterização dos filmes LB de nanopartículas de ouro por AFM permitiu concluir que o grau de cobertura do filme de AuNPs na mica depende do pH a que ocorre a transferência da monocamada para o substrato sólido. Os filmes de nanopartículas em que a cobertura é mais efectiva são transferidos para a mica em meio ácido. Com o aumento do pH da subfase diminui a rugosidade do filme e a cobertura do substrato.

Para completar o estudo das interacções entre o DPPC e as nanopartículas de ouro, seria importante utilizar técnicas que permitissem avaliar a sua natureza de uma forma inequívoca, tais como a microscopia de ângulo de Brewster ou a análise TEM de monocamadas flutuantes.

Como consequência da falta de tempo, não foi possível realizar o estudo de filmes Langmuir-Blodgett para filmes mistos. A realização deste estudo seria importante na caracterização das interacções entre o DPPC e as nanopartículas.

Lista de Referências

[1] Ghosh, S.; Pal T.; *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4797.
[2] Daniel, M.; Astruc, D.; *Chem. Rev*, **2004**, *104*, 293.
[3] Heriot, S.; Pedrosa, J.M.; Camacho, L.; Richardson, T.; *Mater. Science and Engineering C* , **2006**, *26*, 154.
[4] Schmid, G.; *Chem. Rev.*; **1992**, *92*, 1709.
[5] Ca, D.; Sun, L.; Cox, J.; *Electrochimica Acta*, **2006**, *51*, 2188.
[6] Subramaniam, C.; Tom, R.; Pradeep, T.; *J. Nanoparticles Research*, **2005**, *7*, 209.
[7] Evans, S.; Johnson, S.; Cheng, Y.; Shen, T.; *J. Mater. Chem.*, **2000**, *10*, 183.
[8] Niazov, T.; Pavlov, V.; Xiao, Y.; Gill, R.; Willner, I.; *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1683.
[9] Hone, D.; Walkner, I.; Evans, R.; Fitz, S.; Beeby, A.; Chambrier, I.; Cook, M.; Russell, D.; *Langmuir*, **2002**, *18*, 2985.
[10] Niemeyer, C.; *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4128.
[11] Wang, C.; Ma, Z.; Su, Z.; *Nanotechnology*, **2006**, *17*, 1819.
[12] Shan, J.; *Polymer Protected Gold Nanoparticles*, PHD. Thesis, Faculty of Sciences of the University of Helsinki, 2006.
[13] Toma, H.; Bonifácio, L.; *Quim. Nova*, **2005**, *28*, 5, 897.
[14] Kumar, A.; *On the problems related to hidrophobilization and assembly of inorganic nanoparticles*; Dissertation for the degree of Doctor, University of Pune, 2003.
[15] Couto, G.; *Nanopartículas de níquel: síntese, caracterização, propriedades e estudo da sua utilização como catalisadores na obtenção de nanotubos de carbono*; Dissertação de Mestrado, Universidade federal do Paraná – Departamento de Química, 2006.
[16] Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R.; *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, **1994**, 801.
[17] Tan, Y.; Li, Y.; Zhu, D. *Langmuir*, **2002**, *18*, 3392.
[18] Leff, D.V.; L. Brandt & J.R. Health; *Langmuir*, **1996**, *12*, 4723.
[19] Aslam, M.; Fu, L.; Su, M.; Vujayamohanan, K.; Vinayak, V.; *J. Materials Chem.*; **2004**, *14*, 1795.
[20] Presa, P.; Multigner, M.; Venta, J.; García, M.; *J. Applied Phys.*; **2006**, *100*, 123915.
[21] Aryal, S.; Remant, B.; Dharmaraj, N.; Bhattarai, N.; Kim, C.; Kim, H.; *Spectrochimica Acta A*, **2006**, *63*, 160.
[22] Ma, Z.; Han, H.; *Colloids and Surfaces A*, **2008**, *317*, 229.
[23] Turkevich, J.; Stevenson, C.P.; Hillier, J.; *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, *11*, 55.
[24] Pomerantz, M.; Segmüller, A.; Netzer, L.; Sagiv, J.; *Thin Solid Films*, **1985**, *132*, 153.
[25] Decher, G.; Hong, J.D.; Schmitt, J.; Thin Solid Films, **1992**, *210*, 831.
[26] Paterno, L.; Mattoso, L.; Oliveira, O.; *Quím. Nova*, **2001**, *24*, 2, 228.
[27] Fendler, J.H.; *Chem. Mater.*; **1996**, *8*, 1616.
[28] Davis, F.; Higson, S.; *Biosensors and Bioelectronics*; **2005**, *21*, 1.
[29] Fendler, J.H.; *Chem. Mater.*; **2001**, *13*, 3196.
[30] http://www.ifm.liu.se/applphys/ftir/sams.html – site acedido em 13/09/07.
[31] Chirea, M.; Morales, V.; Manzanares, J.; Pereira, C.; Gulaboski, R.; Silva, F.; *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 21808.
[32] Chen, S.; Langmuir, **2001**, *17*, 2878.
[33] Meldrum, F.; Kotov, N.; Fendler, J.; *Langmuir*, **1994**, *10*, 2035.
[34] Fendler, J.; Meldrum, F.; *Adv. Mater.*, **1995**, *7*, 607.
[35] Tian, Y.; Fendler, J.; *Chem. Mater.*, **1996**, *8*, 969.
[36] Burghard, M.; Philipp, G.; Roth, S.; Klitzing, K.; Pugin, R.; Schmid, G.; *Adv. Mater.*, **1998**, *10*, 842.

[37] Bourgoin, J.; Kergueris, C.; Lefèvre, E.; Palacin, S.; *Thin Solid Films*, **1998**, *327-329*, 515.
[38] Chi, L.; Rakers, S.; Hartig, M.; Fuchs, Schmid, G.; *Thin Solid Films*, **1998**, *327-329*, 520.
[39] Chen, X.; Li, J.; Jiang, L; *Nanotechnology*, **2000**, *11*, 108.
[40] Torimoto, T.; Tsumura, N.; Nakamura, H.; Kuwata, S.; Sakata, T.; Mori, H.; Yoneyama, H.; *Electrochimica Acta*, **2000**, *45*, 3296.
[41] Damle, C.; Gole, A.; Sastry, M.; *J. Mater. Chem.*, **2000**, *10*, 1389.
[42] Chen, S.; *Adv. Mater.*, **2000**, *12*, 186.
[43] Sastry, M.; Gole, A.; Patil, V.; *Thin Solid Films*, **2001**, *384*,125.
[44] Chen, S.; *Langmuir*, **2001**, *17*, 6664.
[45] Xu, W.; Zhang, D.; Xu, T.; Wang, T.; Zhu, D.; *Colloids and Surfaces A*, **2002**, *204*, 201.
[46] Nøgaard, K.; Weygand, M.; Kjaer, K.; Brust, M.; Bjørnholm, T.; *Faraday Discuss.*; **2004**, *125*, 221.
[47] Sun, Y.; Frenkel, I.; White, H.; Zhang, L.; Zhu, Y.; Xu, H.; Yang, J.; Koga, T.; Zaitsev, V.; Rafailovich, M.; Sokolov, J.; *J. Phys. Chem.B*, **2006**, *110*, 23022.
[48] Pei, L.; Mori, K.; Adachi, M.; *Colloids Surf. A*, **2006**, *281*, 44.
[49] Heriot, S.; Zhang, H.; Evans, S.; Richardson, T.; *Colloids Surf. A*, **2006**, 278, 98.
[50] Hansen, C.; Westerlund, F.; Moth-Poulsen, K.; Ravindranath, R.; Valiyaveettil, S.; Bjørnholm, T.; *Langmuir*, **2008**, *24*, 3905.
[51] Aleksandrovié, Vesna; CoPt3 Np: ligand Exchange and film preparation; PHD. Thesis, University de Hamburgo, 2006.
[52] Swani, A.; Kumar, A.; Selvakannan, P.; Mandal, S.; Sastry, M.; *J. Colloid Interface Science*, **2003**, *260*, 367.
[53] Mayya, K.; Patil, V.; Sastry, M.; *Langmuir*, **1997**, *13*, 2575.
[54] Sastry, M.; Mayya, K.; Patil, V.; Paranjape, D.; Hedge, D.; *J. Phys. Chem.B*, **1997**, *101*, 4954.
[55] Mayya, K.; Jain, N.; Gole, A.; Langevin, D.; Sastry, M.; J. Colloid Interface Science, **2004**, *270*, 133.
[56] Chen, L.; Dudek, A; Lee, Y.; Chang, C.; *Langmuir*, **2007**, *23*, 3123.
[57] Yang, J.; Meldrum, F.; Fendler, J.; *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 5500.
[58] Kyunghee, C.; Mendieta, V.; Castanares, F.; Meldrum, F.; Fendler, J.; *J.Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 9869.
[59] Ravaine, S.; Fanucci, G.; Seip, C.; Adair, J.; Talham, D.; *Langmuir*, **1998**, *14*, 708.
[60] Swani, A.; Selvakannan, P.; Pasricha, R.; Sastry, M.; *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 19269.
[61] Swani, A.; Kasture, M.; Pasricha, R.; Sastry, M.; *J. Colloid Interface Science*, **2004**, *14*, 709.
[62] Hac-Windro, K.; Kapusta, J.; Jagoda, A.; *Chem. Phys. of Lipids*, **2007**, *150*, 66.
[63] KSV Instruments Ltd; Applications note #107 – *Langmuir and Langmuir-Blodgett F*ilms; P.O. Box 128, 00381 Helsinki, Finland.
[64] Roberts, G.; *Langmuir-Blodgett Films*; Plenum Press, New York, 1990.
[65] http://www-gap.dcs.st-and.ac.uk/~history/Mathematicians/Rayleigh.html – site acedido em 18/09/07.
[66] http://www.physics.ucla.edu/~cwp/articles/pockels/pockels.html – site acedido em 18/09/07.
[67] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1932/langmuir-lecture.pdf – site acedido em 18/09/07.
[68] Ferreira, Elisabete; *Estudos da Tensão Superficial da Dipalmitoilfosfatidilcolina na interface ar-água*; Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto – Dep. Química, 2005.
[69] http://www.engineergirl.org/savikhin/index.html – site acedido em 18/09/07.
[70] KSV Instruments Ltd; Applications note #101; P.O. Box 128, 00381 Helsinki, Finland.

[71] http://www.bbm1.ucm.es/teach/bioq/metod4/teoria/monocapas.pdf – site acedido em 04/09/07.

[72] Ferreira, M.; Itri, W.; Oliveira, O.; *Quim. Nova*, **2005**, *28*, 3, 502.

[73] Santos, Hélder; Relatório anual: *Estudo de adsorção de fosfatidilcolinas em interface ar-água e líquido-líquido polarizadas*; Faculdade de Ciências da Universidade do Porto – Dep. Química, 2003.

[74] Shin, H.; Kim, H.; Há, J.; Lim, K.; Lee, M.; *Superlattices Microstructures*, **2008**, *44*, 657.

[75] Oliveira, O.; *Branz. J. of Phys.*; **1992**, *22*, 60.

[76] Miñones, J.; Patino, J.; Conde, O.; Carrera, C.; *Colloids and Surfaces A.*; **2002**, *203*, 273.

[77] Ahuja, R.; Caruso, P.; Möbius, D.; *Langmuir*, **1993**, *9*, 1534.

[78] Nicolini, C.; Carrara, S.; Facci, P.; Sivozhelezov, V.; Adami, M.; Erokhin, V.; Picard, G.; Sartore, M.; Vakula S.; Molecular Bioelectronics, World Scientific, 1996.

[79] Maltseva. E.; Shapovalov, V.; Möhwald, H.; Brezesinski, G.; *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 919.

[80] Demchak, R.; Fort, T.; *J. Colloid Interf. Sci.*, **1974**, *46*, 191.

[81] Vogel, V.; Möbius, D.; *Thin Solid Films*, **1988**, *159*, 73.

[82] Taylor, D.; Oliveira, O.; Morgen, H.; *J. Colloid Interface Sci.*, **1990**, *139*, 508.

[83] Hoda, K.; Ikeda, Y.; Kawasaki, H.; Yamada, K.; Higuchi, R.; Shibata, O.; *Colloids Surf. B*, **2006**, *52*, 57.

[84] Baldyga, D.; Dluhy, R.; *Chem. and Phys. of Lipids*, **1998**, *96*, 81.

[85] Pretty, M.; *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction,* Cambridge University Press, 1996.

[86] Imaura, T.; Sakai, H.; Yamauchi, H.; Kozawa, K.; Yokohama, S.; Matsumoto, M.; Abe, M.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; **2000**, *19*, 81.

[87] Gonçalves, Silvia; *Extracção e Purificação e estudos sobre a formação de filmes monomoleculares da hialuronidase bovina*; Dissertação de Doutoramento, Universidade Federal Rio de Janeiro, 2007.

[88] http://www.mpip-mainz.mpg.de/~jonas/Master_Surf_Chem/lecture_IntroSurfChem_3a.pdf site acedido em 14/09/07.

[89] http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Phospholipids_aqueous_solution_structures.svg – site acedido a 29/09/08.

[90] http://www.chemicalland21.com/specialtychem/perchem/OLEYLAMINE.htm – site acedido em 28/08/07.

[91] Cabral, João; Tabelas e Formulários de Química, Porto, 1993.

[92] Zetasizer Nano series technical note: *Zeta Potential – An introduction*; Malvern Instruments.

[93] Chirea, M.; *Supramolecular Self-Assembly of Gold Nanoparticles*; PHD. Thesis, Faculty of Sciences, University of Porto, 2006.

[94] http://www.malvern.co.uk/labeng/products/zetasizer/zetasizer.htm - site acedido em 23/07/08.

[95] http://www.nisenet.org/publicbeta/articles/seeing_atoms/index.html - site acedido em 03/10/08.

[96] Pereira, E.; *Desenvolvimento de uma plataforma versátil para biosensores com base em nanopartículas de ouro modificadas com ADN*; Relatório no âmbito do projecto POCTI/QUI/57679/2004; 2006.

[97] Ferreira, A.; Yamanaka, *H.; Quim. Nova*, **2006**, *29*, 1, 137.

[98] Dziri, L; Boussaad, S.; Tão, N.; Leblanc, R.; *Thin Solid Films*, **1998**, *327-329*, 56.

[99] Caseli, L.; Nobre, T.; Silva, D.; Loh, W.; Zaniquelli, M.; *Colloids and Surfaces B*; **2001**, *22*, 309.

[100] Gaines, G.; *Insoluble Monolayers at liquid-gas interfaces*, Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1966.

[101] Aguilella, V.; Mafé, S.; Manzanares, J.; *Chem. Phys. Lipids*, **2000**, *105*, 225.

[102] Hidalgo, A.; Caetano, W.; Tabak, M.; Oliveira, O.; *Biophysical Chem.*, **2004**, *109*, 85.
[103] Ducharme, D.; Max, J-J; Salesse, C.; Leblanc, R.M.; *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, 1925.
[104] Nakahara, H.; Nakamura, S.; Nakamura, K.; Inagaki, M.; Aso, M; Higuchi, R.; Shibata, O.; *Colloids Surf. B*, **2005**, *42*, 157.
[105] Cavalli, A.; Borissevitch, G.; Tabak, M.; Oliveira, O.; *Thin Solid Films*, **1996**, *284-285*, 731.
[106] Hoda, K.; Nakahara, H.; Nakamura, S.; Nagadome, S.; Sugihara, G.; Yoshino, N.; Shibata, O.; *Colloids Surf. B*, **2006**, *47*, 165.
[107] Nakahara, H.; Nakamura, S.; Kawasaki, H.; Shibata *Colloids Surf. B*, **2005**, *41*, 285.
[108] Maruta, T.; Hoda, K.; Inagaki, M.; Shibata, O.; *Colloids Surf. B*, **2005**, *44*, 123.
[109] Osvaldo, O.; Bonardi, C.; *Langmuir*, **1997**, *13*, 5920.
[110] Eeman, M.; Pegado, L:; Dufrêne, Y.; Paquot, M.; Deleu, M.; *J.Colloid Interface Sci.*, **2008**, doi:10.1016/j.jcis.2008.10.017.
[111] Shapovalov, V.; *Thin Solid Films*, **1998**, *327-329*, 599.
[112] Carreira, Cátia; Relatório anual: *Estudo da interacção entre fosfolípidos na interface ar-água*; Faculdade de Ciências da Universidade do Porto – Dep. Química, 2007.