



Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM



Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química – PPGMQ-MG

Dissertação de Mestrado

INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOCIDAS DE NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA PREPARADAS EM MEIO DE CITRATO DE SÓDIO.

Autora: Isabela Fernandes Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Junior

Uberaba

2017

Isabela Fernandes Rodrigues

Investigação das propriedades biocidas de nanopartículas de prata preparadas em meio de citrato de sódio.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química. Orientador: Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Junior  
Co-Orientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

Uberaba

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

R613i	<p>Rodrigues, Isabela Fernandes Investigação das propriedades biocidas de nanopartículas de prata preparadas em meio de citrato de sódio / Isabela Fernandes Rodrigues. -- 2018. 80 f.: il., fig., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Química) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018 Orientador: Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Junior Coorientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino</p> <p>1. Nanotecnologia. 2. Prata. 3. <i>Candida Albicans</i>. I. Oliveira Junior, Robson Tadeu Soares de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p>CDU 620.3</p>
-------	---

ISABELA FERNANDES RODRIGUES

Investigação das propriedades biocidas de nanopartículas de prata preparadas em meio de citrato

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, área de concentração Química de Materiais, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

Uberaba, 23 de Junho de 2017.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Junior

Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dr. Luis Antônio da Silva

Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dra. Maria Theresa Cerávolo Laguna Abreu

Universidade de Uberaba

## DEDICATÓRIA

Dedico ao meu avô Dulfe Evandro Duarte, fonte de incentivo que sempre acreditou no meu potencial.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado e ser Luz em meu caminho.

Aos meus pais, Ana Amélia F. D. Rodrigues e Joaquim Lúcio Rodrigues da Silva, que fizeram de meus objetivos, os seus objetivos.

À minha avó Terezinha Fernandes Duarte, por ser exemplo de amor, paz e perseverança.

Ao Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Junior, pela amizade, incentivo e por toda contribuição no meu aprendizado.

Ao amigo Fernando Resende que não mediu esforços para realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Tony de Paiva Paulino e Me. Rodrigo Magrin de Andrade e à Ana Ruth Santiago Paolinetti pela parceria para a determinação de alterações bioenergéticas em *Candida albicans* tratada com nanopartículas de prata.

Aos amigos da Engenharia Química Nicoli Rodrigues, Fernanda Siena, Silas Tavares, Thaise Braga e Rodolfo Bizinoto pelas horas de estudos e por todo apoio recebido.

A todos do laboratório de Bioquímica da UFTM por me acolherem e por toda ajuda.

Ao Allan por todo carinho e paciência, pelo apoio e incentivo na reta final.

“O aprendizado é acumulativo. Você vai ganhando experiência ao longo da vida. É assim que se aprende.”

Prof. Falconi

## RESUMO

A prata na forma de nanopartículas possui elevada razão área volume, o que eleva grandemente suas propriedades antimicrobianas. Apresenta ação contra uma ampla faixa de microrganismos patogênicos como bactérias Gram Negativas e Gram Positivas, algas e fungos. Nanopartículas de prata podem ser obtidas empregando-se agentes redutores como álcoois, carboidratos, ácido tartárico, ácido ascórbico, etc. O presente trabalho teve como objetivo preparar nanopartículas de prata para investigação biocida. Para isso, realizou-se a síntese das nanopartículas através da redução por citrato de sódio na presença do surfactante dodecilsulfato de sódio. A caracterização das nanopartículas de prata foi feita através de espectroscopia UV-Vis. Obteve-se nanopartículas com diâmetro entre 10 e 50 nm. Foi feito um planejamento fatorial  $2^3$  utilizando como variáveis as concentrações dos reagentes e os comprimentos de onda característicos das bandas de plasmons de superfície das nanopartículas de prata. Através de superfícies de resposta obteve-se uma relação entre as concentrações dos reagentes utilizados na síntese e os tamanhos das nanopartículas formadas. Como o tamanho das nanopartículas influencia diretamente nas propriedades biocidas, foram empregadas nanopartículas na faixa de 10-14 nm sobre *Candida Albicans*. Buscou-se avaliar também a toxicidade da prata em suspensão e veiculada a lipossomos como carreadores em meio planctônico e biofilme. Concluiu-se que as nanopartículas de prata em suas diferentes microformulações (suspensão e lipossomo) possuíram atividade biocida sobre a *C.albicans* tanto em meio planctônico quanto em biofilme.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, Lipossomos, *Candida albicans*

## ABSTRACT

Silver nanoparticles have a high area/volume ratio, therefore their antimicrobial property is greatly increased. They exhibit action against a wide range of pathogenic microorganisms such as gram negative and gram positive bacteria, algae and fungi. Silver ions can be reduced by a wide range of organic substances such as alcohols, carbohydrates, tartaric acid, ascorbic acid, etc. Synthesis of the nanoparticles was carried out using sodium citrate as reducing agent in the presence of the sodium dodecylsulfate. Characterization of silver nanoparticles was performed by UV-Vis spectroscopy, where it was obtained nanoparticles with diameter of 10-50 nm.

A factorial design of  $2^3$  was done using as variables the reagent concentrations and the surface plasmon absorption spectra of silver nanoparticles. Through response surfaces a relationship was obtained between the reagents concentrations and the nanoparticles sizes.

The size of the nanoparticles directly influence their biocidal properties, therefore, nanoparticles in the range of 10-14 nm were used on *Candida albicans*. In this way, the toxicity of silver suspensions and silver encapsulated by liposomes as carriers in plankton and biofilm medium was evaluated. It was concluded that the silver nanoparticles in their different microforms (suspension and liposome) presented activity on *C. albicans* in both planktonic and biofilm environments.

Keywords: Silver Nanoparticles, Liposomes, *Candida albicans*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
1.1. PLANEJAMENTO FATORIAL .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	19
2.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	23
3 OBJETIVOS .....	34
3.1 OBJETIVO GERAL .....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	35
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	35
4.2 DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES BIOENERGÉTICAS EM CANDIDA ALBICANS .....	39
4.2.1 Obtenção e ativação da cepa de Candida albicans .....	39
4.2.2 Confeção dos lipossomos com nanopartículas de prata pela técnica da sonicação.....	39
4.2.3 Tempo de atuação das microformulações da prata sobre a C. albicans (UFC).....	39
4.2.4 Contagem dos tubos germinativos.....	40
4.2.5 Curva de crescimento da C. albicans em meio planctônico.....	41
4.2.6 Análise de glicose da C.albicans .....	41
4.2.7 Viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) no biofilme exposto aos grupos experimentais .....	41
4.2.8 Crescimento do biofilme na presença da suspensão de prata .....	42
4.2.9 Análise estatística .....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	44
5.2 DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES BIOENERGÉTICAS EM CANDIDA ALBICANS .....	58
6 CONCLUSÃO.....	69
7 REFERÊNCIAS.....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo geral de crescimento da nanopartícula de Au em concordância com a síntese proposta por Turkevich .....	28
Figura 2: Coloração amarelada observada durante a síntese.....	37
Figura 3: Espectros UV-Vis obtidos das suspensões de nanopartículas de prata ....	45
Figura 4: Distribuição normal dos efeitos. Notações utilizadas de acordo com a tabela 3. ....	50
Figura 5: Valores observados para a banda de absorção máxima (nm) vs valores preditos pelo tratamento estatístico.....	50
Figura 6: Valores observados para a banda de absorção máxima (nm) vs resíduos do tratamento estatístico .....	51
Figura 7: Superfícies de resposta do comprimento de onda, $\lambda$ . ....	52
Figura 8: Valores observados para a banda de absorção máxima (nm) vs valores preditos pelo tratamento estatístico.....	54
Figura 9: Valores observados para a banda de absorção máxima (nm) vs resíduos do tratamento estatístico .....	55
Figura 10: Superfícies de resposta para o modelo reduzido .....	56
Figura 11 - Imagem de microscopia de força atômica ilustrando a morfologia das nanopartículas de prata sobre substrato de silício monocristalino .....	58
Figura 12- Imagem de microscopia de força atômica ilustrando a morfologia das nanopartículas de prata sobre substrato de silício monocristalino .....	59
Figura 13: Contagem de células expostas a diferentes agentes e tempos .....	61
Figura 14: Avaliação da ausência de tubo germinativo nas células submetidas aos tratamentos com prata em suspensão (Ag), prata lipossomal (Lipo+Ag), água (Ctr-) e clorexidina durante 30,60 e 120 minutos. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença.....	63
Figura 15: Avaliação das variações do pH das células de <i>C. albicans</i> submetidas aos grupos de tratamento de prata em suspensão (AG), prata lipossomal (Lipo+AG), água (Ctr-) e clorexidina durante 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença. ....	64
Figura 16: Avaliação do consumo de glicose pelas células de <i>C. albicans</i> submetidas aos grupos de tratamento de prata em suspensão (AG), prata lipossomal (Lipo+AG),	

água (Ctr-) e clorexidina durante 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença. ....	65
Figura 17: Avaliação da densidade óptica das células de <i>C. albicans</i> submetidas aos grupos de tratamento de prata em suspensão (AG), prata lipossomal (Lipo+AG), água (Ctr-) e clorexidina durante 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença. ....	66
Figura 18: Avaliação da viabilidade das células de <i>C. albicans</i> submetidas aos tratamentos com prata em suspensão, prata lipossomal, água e clorexidina através do método do MTT. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença.....	67
Figura 19: Avaliação da viabilidade celular do biofilme formado na presença da prata em concentrações de 0 µL/mL, 5 µL/mL, 10 µL/mL, 50µL/mL, 100 µL/mL, 200 µL/mL divididos em dois grupos distintos (lavado e não lavado). Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença. ....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial obtida com os níveis das variáveis do planejamento.....	36
Tabela 2: Relação da matriz do planejamento fatorial $2^3$ com a média de $\lambda$ e diâmetro das nanopartículas .....	48
Tabela 3: Valores estimados dos efeitos das variáveis sobre a resposta da banda de absorção.....	49
Tabela 4: Nova estimativa dos efeitos das variáveis sobre a resposta dos comprimentos de onda.....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O uso da nanotecnologia vem modificando substancialmente a forma como os diversos tipos de materiais são utilizados. Em escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) os materiais, invariavelmente, apresentam comportamento muito distinto de suas conhecidas propriedades físicas e químicas em escalas maiores, principalmente no que tange à sua reatividade química, resistência mecânica e comportamento sob a ação da luz (Cammarata 1996; Nouailhat 2010).

Como consequência da diminuição do tamanho médio das partículas que compõe os materiais, verifica-se um aumento da área superficial por volume. Por exemplo, a área superficial de um cubo de 1 cm de aresta é de  $6 \text{ cm}^2$  que corresponde a um volume de  $1 \text{ cm}^3$ . Ao fracionar o cubo em várias partes com 1 mm, considerando o volume total de  $1 \text{ cm}^3$ , existem 1000 cubos cuja área superficial totaliza  $60 \text{ cm}^2$ . Se as dimensões forem expressas a uma escala nanométrica, isto é, admitindo que cada cubo tem 1 nm de aresta, existem  $10^{21}$  cubos por  $1 \text{ cm}^3$  de volume total, e a área superficial resultante passa para  $60.000.000 \text{ cm}^2$ . Analogamente, por exemplo, em uma nanopartícula de ferro com 30 nm de diâmetro, 5% dos átomos encontram-se na superfície, enquanto em uma nanopartícula de 10 nm 20% dos átomos encontram-se na superfície e já metade dos átomos do nanocristal são superficiais se for considerada uma nanopartícula de 3 nm de diâmetro (Klabunde & Richards 2001) . Ou seja, a percentagem de átomos na superfície, relativamente ao número total de átomos na partícula, aumenta quando o tamanho diminui. Este aumento significativo da área superficial, relativamente ao volume de material, determina diversas propriedades dos nanomateriais (Martins et al. 2007).

Graças ao enorme aumento da superfície de contato das nanopartículas em comparação às usuais dimensões micrométricas, o uso de substâncias pulverizadas de tamanho nanométrico vem proporcionando avanços na área de catálise química e na montagem de estruturas maiores utilizando nanomateriais como alicerces básicos (Cammarata, 1996; Nouailhat, 2010). As ciências da saúde pesquisam a maior eficiência de fármacos sejam com novos compostos farmacêuticos bem como a reatividade desses compostos, principalmente os de ação contra microorganismos. Particularmente, as nanopartículas metálicas e de seus óxidos provaram, no decorrer dos anos, terem aplicações medicinais pela ação dos íons e metais com

tamanhos reduzidos contra bactérias patológicas graças à interação com as células vivas.

As nanopartículas ferromagnéticas de óxidos de ferro,  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (maguemite) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetite), têm sido muito utilizadas em bioaplicações, como por exemplo, em imagiologia de ressonância magnética, liberação controlada de fármacos e em hipertermia. Na forma macrocristalina, a magnetita e a maguemita têm a estrutura de espinélio invertida, tendo a maguemita defeitos catiônicos (Lu et al. 2007).

A decomposição térmica de precursores de ferro em solventes contendo tensoativos, cujos pontos de ebulição são elevados, é o método mais indicado para a preparação de nanopartículas monodispersas de óxidos de ferro, com diâmetros que podem variar entre 3 e 50 nm. Neste contexto, têm sido usados precursores como  $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ,  $\text{Fe}(\text{acetilacetato})_3$ , entre outros (Hyeon, Su Seong Lee, Park, Chung, & Hyon Bin Na, 2001; Teng & Yang, 2004; Sun & Zeng, 2002; Jana, Chen, & Peng, 2004)

Apesar de a literatura ser rica em pesquisas sobre a ação biocida da prata, poucos estudos abordaram as condições de síntese das nanopartículas, incluindo sua estabilidade em diferentes meios (Morones et al. 2005). Deste modo, a padronização de alguns métodos de síntese e o estudo de sua estabilidade a curto e médio prazo são variáveis importantes que devem ser investigadas.

Há séculos se tem conhecimento da ação antimicrobiana da prata, tanto em sua forma metálica como na sua forma iônica. No caso das nanopartículas, sua elevada razão área/volume aumentam consideravelmente suas propriedades biocidas. Deste modo, nanopartículas de prata podem ser empregadas em tratamentos de infecções bacterianas e fúngicas, substituindo em parte o uso de antibióticos que são geralmente bastante tóxicos e com grande tendência a se tornarem inócuos, devido ao crescente aumento da resistência dos microrganismos a estas drogas (Atiyeh et al. 2007). As nanopartículas de prata mostraram-se eficazes contra coliformes e outros microrganismos patogênicos (Atiyeh et al. 2007). Estudos apontam também o emprego das nanopartículas de prata na sanitização de embalagens e alimentos, além do uso na desinfecção de água.

A prata coloidal apresenta ação contra uma ampla faixa de microrganismos: bactérias (Gram positivas e Gram negativas), fungos e vírus. A prata tem como benefício maior toxicidade contra microrganismos e, em contrapartida, apresenta menor toxicidade para as células animais, quando comparada com demais metais. O

único efeito negativo conhecido para o ser humano é a Argyria, um irreversível escurecimento da pele causado por contínuo e prolongado tratamento com prata. Este “envenenamento” pela prata, porém, só ocorre com partículas em escala micrométrica, pois estas obstruem as membranas celulares. De forma diferente, as nanopartículas são tão finamente dispersas e estão em tão baixa concentração que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos a organismos superiores, haja vista que a concentração efetiva para atuação contra microrganismos é de  $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$  e a concentração tóxica a seres humanos é de  $10 \text{mgL}^{-1}$  (NETO et al. 2008).

Os mecanismos de ação bactericida são hoje atribuídos à reação entre a prata e grupos tióis, prata e aminoácidos e prata com grupos funcionais de enzimas (Mcdonnell & Russell 1999). A prata mostrou-se eficaz na retirada de cátions  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Zn}^{++}$  das células bacterianas por efeito de substituição. O efeito biocida é diretamente proporcional à concentração de íons  $\text{Ag}^+$ . Assim, quanto maior a concentração de prata maior seu efeito antimicrobiano (Schierholz et al. 1999). Como resultado, inibe a multiplicação e crescimentos dos microrganismos (ação bacteriostática) que causam odor e infecções. Ainda não é bem conhecida sua ação contra espécies viróticas, porém seu uso pode impedir a proliferação de bactérias oportunistas durante o período de infecção viral.

O uso da prata como desinfetante para água potável é relativamente comum em países da Europa. Importante salientar que a concentração de prata para fins de tratamento de água potável com suficiente ação bactericida não impacta no sabor, odor ou coloração da água (NETO et al. 2008).

Um fator importante é a estrutura cristalina que as nanopartículas apresentam. Estudos apontam que quanto maior o número de faces nas partículas, maior será sua reatividade. As nanopartículas de prata têm comprovada afinidade com grupos que possuem elementos químicos como o enxofre e o fósforo, que são encontrados tanto nas membranas exteriores como no interior das células bacterianas. Como é de amplo conhecimento, cada vez mais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, forçando assim a síntese constante de novas drogas, que na maioria dos casos não acompanham a velocidade de imunogenicidade dos vírus e bactérias (M.Raffi, F.Hussain, T.M.Bhatti, J.I.Akhter 2008). Assim, as nanopartículas de prata despertaram o interesse da área da saúde com vários trabalhos publicados envolvendo nanocompostos contendo

prata, com foco em bactérias como a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (NETO et al. 2008).

A ação da prata coloidal, no entanto, não é apenas desinfetante, mas esterilizante, o que faz com que a sua ação seja indiscriminada contra microrganismos patogênicos e também contra constituintes da flora bacteriana benéfica, o que limita seu uso para a terapêutica.

Devido à imensa reatividade na forma de nanopartículas, a prata pode ser danosa ao meio ambiente, principalmente no tocante à contaminação do solo e águas. Com seu efeito indiscriminado contra microrganismos, a prata nanoparticulada pode interferir na ação de bactérias fixadoras de nitrogênio, bem como pode esterilizar águas que necessitam da ação de microrganismos na despoluição, afetar a decomposição de tecidos vegetais e animais, causando um fenômeno similar ao da chuva ácida, onde a diminuição do pH das águas provoca uma redução da ação de microrganismos na decomposição de matéria orgânica. Muitos métodos de reação de redução têm sido usados para a síntese de nanopartículas de prata derivadas de sais. A prata pode ser reduzida a partir de seu nitrato por uma gama redutores orgânicos, como álcoois, carboidratos, ácido tartárico, ácido ascórbico, etc. O tamanho e morfologia das nanopartículas são afetadas pelos métodos de preparação, por meio do emprego de diferentes agentes redutores, pelas concentrações das espécies reativas, bem como pela temperatura, velocidade de agitação e duração do processo de redução. A espectroscopia UV-Visível é o método mais difundido na caracterização de nanopartículas, onde se pode estimar o tamanho das nanopartículas por meio dos comprimentos de onda de absorção relacionadas à ressonância plasmônica de superfície (Guzmán et al. 2008; Mulfinger et al. 2007a). Entretanto, também são empregadas técnicas como microscopia de varredura por tunelamento (STM) e a microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de raios-x entre outras (Klabunde & Richards 2001).

### 1.1. PLANEJAMENTO FATORIAL

Os sistemas de planejamento fatorial permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos uni variados (PERALTA-ZAMORA et al. 2005).

Entre os conceitos fundamentais (CUNICO et al. 2008) do planejamento fatorial estão:

- Fator: cada variável do sistema em estudo.
- Nível: condições de operação dos fatores de controle investigados nos experimentos.
- Geralmente são identificados por nível baixo (-) e nível alto (+).
- Modelo estatístico: modelo do tipo  $y=b_0+b_1x_1$  sendo  $b_0, b_1, \dots, b_n$  efeitos de cada fator na resposta.
- Efeito: mudança ocorrida na resposta quando se muda do nível baixo (-) para o nível alto (+).
- Efeito principal: é a diferença média observada na resposta quando se muda o nível do fator de controle investigado.
- Efeitos de interação: é a metade da diferença média entre os efeitos principais de um fator nos níveis de outro fator. Os valores de interação entre os fatores também podem ser calculados. Para tal, o efeito de interação entre as variáveis é obtido levando-se em consideração os sinais já atribuídos às variáveis envolvidas, como se fosse uma operação matemática de multiplicação.
- Erro padrão para os efeitos: erro na determinação dos efeitos. É o mesmo, tanto para os efeitos principais quanto para os de interação.

Planejar experimentos é definir uma sequência de coletas de dados experimentais para atingir certos objetivos (CUNICO et al. 2008). Dentre os métodos de planejamento experimental, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em cada tentativa ou réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas (BARROS NETO et al. 2001).

O Planejamento fatorial normalmente é representado por  $b^k$ . Onde,  $k$  representa o número de fatores e  $b$  o número de níveis escolhidos (PEREIRA FILHO 2015). O caso mais simples de planejamento fatorial é aquele em que cada fator  $k$  está presente em apenas dois níveis, ou seja, em um experimento com  $k$  fatores e dois níveis, são realizadas  $2 \times 2 \times \dots \times 2$  ( $k$  vezes) =  $2^k$  observações da variável resposta. Tais planejamentos se mostram vantajosos, pois permitem verificar tendências importantes para a realização de investigações posteriores.

Os níveis deste tipo de planejamento fatorial são codificados com os sinais (+) e (-), a atribuição aos níveis superiores ou inferiores se dá de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados. Estes sinais também permitem esquematizar estas variáveis na forma de matrizes de planejamento, assim como determinar, por meio de cálculos, a influência das mesmas e das suas interações no sistema (Brasil et al. 2007).

Dentre as diversas vantagens da utilização do planejamento fatorial, destacam-se as seguintes (Carpena & Dal 2005):

- Redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação;
- Estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos;
- Determinação da confiabilidade dos resultados;
- Realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios;
- Seleção das variáveis que influenciam um processo com número reduzido de ensaios;
- Representação do processo estudado através de expressões matemáticas;
- Elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Partículas em dimensões nanométricas podem ser manipuladas para que o material possua propriedades singulares. Tais propriedades baseiam-se no fato de que as superfícies envolvidas são muito maiores em comparação aos volumes, propiciando maiores áreas de contato. Assim, uma grande proporção de seus átomos é encontrada na superfície quando comparado com camadas mais internas. Uma vez que as reações químicas ocorrem na superfície do material, conclui-se que as nanopartículas são mais reativas que um material elaborado com partículas maiores (Garcia 2011).

A utilização de partículas metálicas na forma coloidal pode ser encontrada desde o século V a.C. no Egito e China e, desde então, são vários os exemplos da sua utilização com motivações decorativas ou medicinais (Gómez Villarraga 1857).

Um exemplo no uso de metais nanocristalinos para fins decorativos que se tornou famoso com o advento de investigação em nanomateriais é o do cálice de Lycurgus. Trata-se de um cálice datado do período romano (século IV, d.C.) fabricado em matriz vítrea e cuja cor depende do ângulo de incidência da luz visível sobre a sua superfície. A cor verde resulta da reflexão da luz pela superfície do cálice, enquanto a luz ao ser transmitida através do vidro origina uma cor vermelha. Este efeito óptico deve-se à existência de nanopartículas metálicas, nomeadamente de ouro e prata, que se encontram dispersas no vidro do cálice, originando um vidro dicróico (Martins & Trindade 2012).

Em 1857, Michael Faraday adiantou uma primeira explicação científica para a cor vermelha exibida por coloides de Au preparados a partir de um sal de ouro (III), posteriormente reduzido com fósforo num sistema bifásico água e CS<sub>2</sub>. Faraday sugeriu que a interação da luz visível com partículas de ouro finamente divididas dispersas no solvente estaria na origem das cores observadas (Faraday 1857).

A propagação de ondas eletromagnéticas ao longo da interface entre um metal e o meio dielétrico circundante cria um campo eletromagnético acoplado à oscilação coerente dos elétrons da banda de condução. As energias destas oscilações encontram-se quantizadas e os respetivos quantuns de energia designam-se por plasmons de superfície. Para partículas metálicas com um diâmetro muito inferior ao comprimento de onda da radiação incidente,  $d \ll \lambda$ , o campo elétrico

induz a polarização de cargas, com os elétrons livres na partícula deslocados relativamente à rede catiônica do metal. A diferença na distribuição de cargas na superfície da partícula origina uma força restauradora, verificando-se condições de ressonância quando a oscilação dos elétrons livres está em fase com a radiação eletromagnética, isto é, para o valor de frequência de ressonância dos plasmões de superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*). As condições de ressonância dependem das propriedades dielétricas e da densidade de elétrons livres dos metais. Os colóides de cobre, ouro e prata têm a frequência de SPR na parte visível do espectro eletromagnético, o que tem motivado muitos estudos de efeitos plasmônicos nestes metais (Liz-Marzán 2006).

A resposta ótica de nanopartículas metálicas, como por exemplo, ouro, depende de fatores como a função dielétrica do meio circundante (Jiang et al. 2007; Kelly et al. 2003; Marzán & Philipse 1994) e a distância entre nanopartículas (NP) vizinhas que, por sua vez, determina o acoplamento plasmônico entre partículas (Wei et al. 2004; Ung et al. 2002). A variação controlada destes parâmetros permite o ajuste das propriedades óticas de nanoestruturas de ouro. Mais especificamente, está estabelecido que a posição espectral da ressonância de plasmões de superfície é desviada para maiores comprimentos de onda quando é aumentada a constante dielétrica do meio circundante. Isto se deve ao enfraquecimento da força restauradora, devido à formação de cargas de polarização na interface com o dielétrico (Underwood & Mulvaney 1994). Para, além disso, quando as NP de ouro se aproximam para distâncias comparáveis com o seu diâmetro, a banda SPR característica da NP isolada começa a desviar-se para o vermelho e apresenta-se alargada, como resultado do acoplamento plasmônico (Jain et al. 2006; Wei et al. 2004; Ung et al. 2002).

## 2.1 APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Na literatura científica, vários trabalhos objetivam os estudos das aplicações das nanopartículas metálicas explorando suas propriedades.

A atividade biológica das nanopartículas de prata depende dos seguintes fatores: a química da superfície, o tamanho, a distribuição de tamanho, a forma, a morfologia das partículas, a composição das partículas, o revestimento, a aglomeração e a taxa de dissolução, a reatividade das partículas em solução, a

eficiência de liberação de íons e o tipo de célula biológica. O tipo de agentes redutores utilizados para a síntese de nanopartículas de prata é outro fator crucial para a determinação da citotoxicidade (Carlson et al. 2008). Dependendo das propriedades físico-químicas das nanopartículas pode-se aumentar a biodisponibilidade dos agentes terapêuticos após a administração sistêmica e local e, por outro lado, ela pode afetar a captação celular, a distribuição biológica, a penetração em barreiras biológicas e os efeitos terapêuticos resultantes (Jo et al. 2015; Staquicini et al. 2011; Duan & Li 2013; Albanese et al. 2012). Portanto, o desenvolvimento de nanopartículas de prata com estruturas controladas em relação à uniformidade do tamanho, morfologia e funcionalidade são essenciais para várias aplicações biomédicas (Panáček et al. 2009; Zodrow et al. 2009; Wong et al. 2009; Gurunathan et al. 2009; Sriram et al. 2010).

Métodos químicos usam água ou solventes orgânicos para preparar as nanopartículas de prata (Tao et al. 2006; Wiley et al. 2005). Este processo normalmente emprega três componentes principais, tais como precursores de metais, agentes redutores e agentes de estabilização. Basicamente, a redução de sais de prata envolve dois estágios: nucleação e crescimento subsequente. No geral, nanopartículas de prata podem ser obtidas por dois métodos classificados como "top-down" e "bottom-up" (Deepak et al. 2011). O método físico "top-down" é a moagem mecânica de metais a granel com subsequente estabilização utilizando agentes de proteção coloidais. Os métodos químicos "bottom-up" incluem redução química, métodos eletroquímicos e sono-decomposição. A principal vantagem dos métodos químicos é o alto rendimento em relação ao método físico. Os materiais utilizados para a síntese de nanopartículas de prata, tais como, borohidreto, tio-glicerol e 2-mercaptoetanol, são tóxicos e perigosos (Mallick et al. 2004). Além destas desvantagens, os precursores podem comprometer a pureza esperada para as nanopartículas fabricadas, podendo ocorrer à sedimentação de impurezas na superfície das mesmas. Também é muito difícil preparar nanopartículas de prata com um tamanho bem definido, exigindo um passo adicional para a prevenção da agregação de partículas (Malik et al. 2002). Métodos físicos para a preparação de nanopartículas empregam muita energia; dentre os métodos físicos pode-se destacar ablação a laser, litografia, redução eletroquímica, irradiação com laser, sono-decomposição e decomposição térmica (Sergeev et al. 1999; Mafune et al. 2000; Hulteen et al. 1999; Zhu et al. 2001; Abid et al. 2002; Talebi et al. 2010;

Hosseinpour-Mashkani & Ramezani 2014; Zhang et al. 2011). As vantagens dos métodos químicos de nanopartículas são a facilidade de produção, baixo custo e alto rendimento. No entanto, o uso de agentes redutores químicos é prejudicial aos organismos vivos (Ganaie et al. 2015).

Gibelli (2012) testou a ação antibacteriana de nanopartículas de prata em Poli ácido láctico – PLA (poli latic acid). Para isso, utilizou cepas padrão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e realizou-se testes antimicrobianos. O PLA foi modificado com nanopartículas de prata nas concentrações de 0,3, 0,5,1 e 1,5%. Observou-se que, para a concentração de 1%, não houve redução da população inicial de *Staphylococcus aureus* e houve redução de 70% da população inicial de *Escherichia coli* após 24hs de contato. Na avaliação quantitativa das células viáveis recuperadas do filme bacteriano, observou-se uma melhor ação antibacteriana para *Escherichia coli* em 3 dias na concentração de 1% de nanopartículas de prata. A autora concluiu que a melhor ação antibacteriana para *Escherichia coli*, se deve ao fato de que as bactérias Gram-positivas são menos suscetíveis a atividade da prata do que as Gram-negativas. Concluiu-se também ao fato das propriedades das nanopartículas de prata variar de acordo com o tamanho das mesmas e uma diminuição da atividade antibacteriana com o aumento do tamanho da nanopartícula (GIBELLI 2012).

Araújo et al. (2015) comparou a ação antimicrobiana de nanopartículas de prata com os sanitizantes hipoclorito de sódio e dicloroisocianurato de sódio, utilizados na produção de cenouras minimamente processadas, para o controle microrganismos mesófilos aeróbios, *Pseudomonas spp*, bactérias lácteas e coliformes a 35°C. Para isso, a cenoura minimamente processada foi imersa em água a 5°C, nos sanitizantes e, em seguida, nanopartículas de prata. As análises microbiológicas ocorreram após o processamento final da cenoura. Observou-se que as nanopartículas de prata foram mais eficientes na descontaminação da cenoura minimamente processada sobre os mesófilos aeróbios, *Pseudomonas ssp* e coliformes a 35°C quando comparada com os demais sanitizantes antimicrobianos estudados. Quando se comparou a descontaminação da cenoura com o controle feito somente em água, observou-se que, em número de reduções decimais, as nanopartículas de prata apresentaram maior redução dos microrganismos. O maior efeito antimicrobiano foi obtido para microrganismos mesófilos. Para o grupo das bactérias lácteas, não se observou diferença da descontaminação entre os

sanitizantes, pois, a população inicial das bactérias lácteas era a menor na superfície das cenouras em relação aos outros microrganismos estudados. Os autores atribuíram à eficiência na ação antimicrobiana das nanopartículas de prata à habilidade em alcançar os sítios de colonização dos microrganismos presentes no alimento. Uma vez que, o tamanho nanométrico das partículas proporciona maior relação superfície/volume e também por possuírem capacidade de penetrar nas fissuras existentes na superfície do alimento (Araújo et al. 2015).

Fernandes (2014) apresenta um estudo da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata, no qual foi determinado o espectro de ação antimicrobiana, a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida sobre espécies de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*; e Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Pseudomonas aeruginosa*. Constatou-se que a menor concentração de nanopartículas de prata que inibiu completamente o crescimento microbiano após 18hs de incubação, foi de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sobre as bactérias Gram-positivas e de 6,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sobre as bactérias Gram-negativas. A concentração mínima bactericida das nanopartículas de prata sobre as bactérias Gram-negativas foi de 4 a 8 vezes maior que a concentração mínima inibitória. Já sobre as bactérias Gram-positivas, não foi determinado a concentração mínima bactericida, o que, segundo a autora, indica que as nanopartículas de prata apresentam somente efeito bacteriostático sobre estas bactérias. Foi atribuído à menor eficiência das nanopartículas de prata contra as bactérias Gram-positivas, quando comparada com as Gram-negativas, a diferença estrutural da parede celular entre essas bactérias. As Gram-negativas apresentam uma membrana externa composta por proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídeos. Já as Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptídeoglicona e são desprovidas de camada externa. Foi constatado ainda, por meio do teste da inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar, que as nanopartículas de prata apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana. Tal constatação indica, segundo a autora, que as nanopartículas de prata possuem atividade antimicrobiana sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FERNANDES 2014).

Henrique de Lima (2011) incorporou nanopartículas de prata no estado e em solução coloidal em cimento ortopédico e observou que, tal incorporação gera biomateriais mais hidrofóbicos que sugerem uma menor tendência de adesão de

bactérias e formação de biofilme. Foi constatado que o material produzido é apropriado para utilização em artroplastias, pois o material apresentou resistência à compressão maior que 70 MPa. Portanto, a associação de nanopartículas de prata ao cimento ósseo não altera significativamente as propriedades do mesmo e atribui características importantes à sua utilização como agente de fixação de próteses (De Lima 2011).

## 2.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A síntese de nanopartículas é realizada geralmente utilizando três abordagens diferentes, incluindo métodos físicos, químicos e biológicos. Nos métodos físicos, as nanopartículas são preparadas por evaporação-condensação usando um forno tubular à pressão atmosférica (Gurav et al. 1994; Kmis et al. 2000; Magnusson et al. 1999; Schmidt-Ott 1988). Métodos convencionais físicos, incluindo a descarga de faísca e pirólise já foram utilizados para a síntese de nanopartículas de prata (Yamamoto & Nakamoto 2003; Pluym et al. 1993). As vantagens dos métodos físicos são a velocidade, a radiação utilizada como agentes redutores e ausência produto químico tóxico, e como desvantagens tem-se o rendimento, alto consumo de energia, contaminação por solvente e falta de distribuição uniforme (Elsupikhe et al. 2015; Shameli et al. 2010; Tsuji et al. 2005; Abou El-Nour et al. 2010).

A preparação de partículas com controle do tamanho e/ou morfologia uniforme é possível utilizando a interação controlada de átomos ou moléculas durante o processo de síntese, que ocorre geralmente em fase vapor ou líquida. A formação de partículas coloidais em fase líquida, a partir de soluções homogêneas, é especialmente interessante, pois as variáveis experimentais podem ser ajustadas na bancada do laboratório de química, nomeadamente a concentração de reagentes, temperatura, pH (em soluções aquosas), presença de aditivos (tensoativos, sais, polímeros, etc.), propriedades do solvente (temperatura de ebulição, afinidade com as superfícies criadas), adição de sementes de nucleação, entre outros. A influência destes fatores durante os processos de nucleação e crescimento das partículas ditarão o tamanho e/ou morfologia final das partículas (Martins & Trindade 2012).

A investigação dos mecanismos de precipitação de partículas coloidais com uma pequena variação de distribuição de tamanhos estreita (amostra “monodispersa”) data dos anos 1940, quando foi introduzido o conceito de nucleação instantânea. Neste processo, forma-se um número elevado de núcleos primários em um intervalo de tempo curto, em seguida o crescimento ocorre sem posterior nucleação. Como a formação de núcleos ocorre de forma quase simultânea, o histórico de crescimento é praticamente o mesmo, desde que devidamente controlado, permitindo obter amostras com uma distribuição homogênea de tamanhos de partícula (Park et al. 2007).

A síntese de nanopartículas inorgânicas com elevado grau de monodispersão tem sido preparada frequentemente com solventes de elevado ponto de ebulição que, normalmente, atuam também como agentes tensoativos. Neste caso, há dois métodos principais para se criar condições de nucleação instantânea - a injeção dos reagentes no solvente que se encontra à temperatura elevada: injeção a quente; ou pelo aquecimento conjunto do sistema reacional e solvente - aquecimento em lote (Talpin et al. 2001; Hambrock et al. 2002; Jana & Peng 2003; Park et al. 2004; Seo et al. 2003; Yu et al. 2004; Joo et al. 2003).

Murray e colaboradores (1993) descreveram uma técnica de injeção de grande sucesso para a preparação de nanopartículas de CdE (E = S, Se, Te). Os autores conseguiram elevado grau de supersaturação de espécies precursoras pela injeção rápida dos reagentes num solvente de elevado ponto de ebulição, a uma temperatura que permite a decomposição dos reagentes. A nucleação instantânea de CdE reduziu a energia livre como consequência do aumento rápido da supersaturação. No decorrer da nucleação, a concentração de precursor em solução diminui, bem como a velocidade de nucleação. Por outro lado, a injeção de uma solução a uma temperatura inferior à temperatura a que se encontra o solvente leva à sua diminuição quase imediata, caso seja uma diminuição significativa, o processo de nucleação será interrompido. O processo de crescimento posterior ocorre de forma controlada pelos núcleos primários formados, consumindo os reagentes existentes em solução. Este tem sido o principal método para a preparação de nanocristais de elevada qualidade, nomeadamente conhecido como semicondutores (Murray et al. 1993).

No método de aquecimento em lote, primeiro fez-se a mistura de reagentes e solventes à temperatura ambiente, em seguida a mistura é aquecida até uma

temperatura apropriada para que ocorra a reação de formação do sólido. Este método, pela sua simplicidade, é particularmente vantajoso para produção em larga escala. A uniformidade de tamanhos das nanopartículas formadas é, em alguns casos, comparável aos resultados obtidos para o método de injeção (Soon et al. 2007).

Shevchenko e colaboradores (2002) descreveram um método para a síntese de nanopartículas de  $\text{CoPt}_3$  a partir da decomposição de  $[\text{Co}_2(\text{CO})_8]$  e redução simultânea de  $[\text{Pt}(\text{acac})_2]$  com hexadecanodiol-1,2 utilizando diferentes estabilizantes. O diâmetro das nanopartículas variou de 1,5 a 7,2 nm, em concordância com a variação da temperatura de reação (Shevchenko et al. 2002). A preparação de ligas metálicas de Co-Pt nestas condições resultou em nanopartículas de  $\text{CoPt}_3$ , independentemente da razão molar dos precursores de cobalto e platina. Para obter a liga metálica na forma Co-Pt, Chen e colaboradores (2002) utilizaram  $[\text{Co}(\text{CO})_3(\text{NO})]$  como precursor de cobalto e  $[\text{Pt}(\text{acac})_2]$  como precursor de Pt, na presença de ácido oleico e oleilamina em éter octílico. Por este método é possível obter as duas estequiometrias, CoPt e  $\text{CoPt}_3$ , simplesmente por variação da relação inicial dos precursores de cobalto e platina (Chen & Nikles 2002).

Os métodos de síntese com solventes tensoativos de elevado ponto de ebulição dão origem a nanopartículas hidrofóbicas, como resultado da passivação da superfície com as respectivas moléculas orgânicas. A transferência de fase das nanopartículas hidrofóbicas para meios aquosos é possível com a introdução de funcionalidades químicas passíveis de interagir com biomoléculas, sendo um procedimento importante, para a aplicação biológica das nanopartículas. As estruturas biológicas são especialmente sensíveis ao meio, em particular às condições de pH e força iônica de soluções aquosas. Nestas condições, as nanopartículas deverão ser suficientemente estáveis, para que sejam compatíveis com os fluídos biológicos. Às vezes estas condições são agressivas para as nanopartículas, como por exemplo, os processos de oxidação, a modificação da superfície de nanopartículas, criando barreiras que inibem a degradação química das nanopartículas. Por outro lado, em termos de biocompatibilidade, os processos de modificação superficial podem contribuir para limitar efeitos de citotoxicidade que eventualmente possam existir (Gupta et al. 2003).

O método de revestimento de nanopartículas com sílica envolve a formação de microemulsão de água em óleo. O método foi reportado para uma grande variedade de nanopartículas hidrofóbicas - CdSe, CdSe/ZnS, PbSe,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, bem como para misturas de nanopartículas na preparação de nanocompósitos multifuncionais (Selvan et al. 2007). A formação de uma microemulsão resulta da combinação de um tensoativo não iônico em fase orgânica, com adição de uma base, como a amônia. As nanopartículas dispersas inicialmente na fase orgânica migram para o interior aquoso da microemulsão. A hidrólise e condensação do precursor de sílica (TEOS - Tetraetoxissilano) na superfície da nanopartícula hidrofóbica ocorrem devido à afinidade do TEOS hidrolisado com a superfície da nanopartícula, substituindo o ligante original. O mecanismo de incorporação da nanopartícula hidrofóbica nas esferas de sílica, em substituição ao ligante original pelo TEOS hidrolisado, foi descrito recentemente (Koole et al. 2008).

A estabilidade das nanopartículas em solução aquosa é garantida pela formação de uma bicamada constituída de moléculas surfactantes, introduzidas durante a síntese das nanopartículas, e de moléculas de CTAB (agente tensoativo brometo de cetiltrimetilamônio). A adição de TEOS na suspensão aquosa de nanopartículas, em meio alcalino, favorece a formação da capa de sílica. Devido ao caráter ligeiramente hidrofóbico da molécula de TEOS, a reação de hidrólise ocorre, preferencialmente, na interface entre as moléculas de surfactante, isto é, na superfície das nanopartículas (Kim et al. 2009).

A modificação da superfície de nanopartículas utilizando polímeros, formando nanocompósitos, conduz a uma nova classe de materiais com diversas aplicações (Zarbin 2007). Adicionalmente às propriedades singulares das nanopartículas, há interesse em explorar efeitos sinérgicos que surgem da combinação das nanopartículas inorgânicas com a matriz polimérica. Como por exemplo, a estabilidade coloidal de pontos quânticos revestidos com moléculas orgânicas, estabilidade mantida em meios orgânicos pelos estabilizantes originais na superfície, pode ser explorada para preparar nanocompósitos poliméricos usando o processo de polimerização "in situ" por miniemulsão na presença dos pontos quânticos. Esta técnica foi estudada para uma grande variedade de partículas inorgânicas, tais como, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> e pós de carbono negro, sem tratamento prévio da superfície e dispersas na fase orgânica contendo o monômero (Erdem et al. 2000; Tiarks et al. 2001). A encapsulação de diversas nanopartículas inorgânicas com propriedades

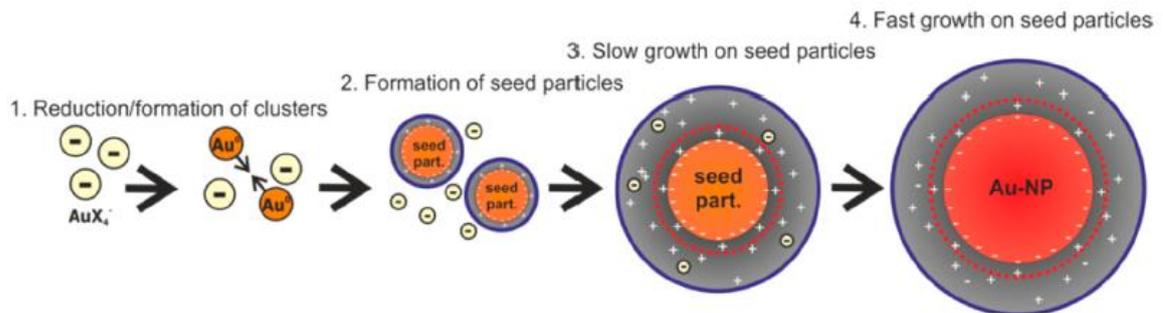
hidrofóbicas por métodos de polimerização por miniemulsão “in situ” foi demonstrada para poli(estireno) (PS), poli(acrilato de butilo) (PBA) e copolímeros de poli(estireno) e poli(metacrilato de metilo) (PS/PMMA) (Esteves et al. 2005; Joumaa et al. 2006; Martins et al. 2007; Fleischhaker & Zentel 2005). No caso dos nanocompósitos de pontos quânticos em matrizes poliméricas, o comportamento ótico dos nanocompósitos depende de um variado número de parâmetros, com destaque para o tipo de polímero utilizado. Como por exemplo, o estudo do comportamento ótico de pontos quânticos dos nanocompósitos de CdSe em PBA apresentam forte luminescência quando comparados com os nanocompósitos análogos com PS (Peres et al. 2005).

A grande variedade de tamanhos dos materiais compósitos e as dificuldades em obter distribuições homogêneas de nanopartículas no interior das cadeias poliméricas, têm suscitado interesse no desenvolvimento de métodos de polimerização iniciada na superfície da nanopartícula funcionalizada. Apesar da sua implementação em larga escala ser ainda um desafio, esta metodologia foi demonstrada com sucesso para o crescimento controlado de cadeias poliméricas a partir da superfície de várias nanopartículas inorgânicas, tais como ouro, SiO<sub>2</sub> e magnetite (Bao et al. 2006; Ohno et al. 2005; Marutani et al. 2004). A grande aplicação em pontos quânticos favoreceu o intenso desenvolvimento do método de polimerização iniciada na superfície de nanopartículas inorgânica. As principais aplicações são a polimerização controlada por reações reversíveis de adição-fragmentação de agentes de transferência de cadeia, polimerização mediada com nitróxidos e polimerização radicalar por transferência de átomo (Skaff & Emrick 2004; Sill & Emrick 2004; Esteves et al. 2007).

Nanopartículas de metais geralmente são sintetizadas através da redução química de sais. Wuithschick *et al.* (2015) apresentaram um estudo sobre a síntese de nanopartículas de ouro através da redução do ácido tetracloroáurico (H[AuCl<sub>4</sub>]) pelo citrato trisódico (Na<sub>3</sub>Ct), conhecido como método de Turkevich. O mecanismo de crescimento está apresentado na figura 1. O mecanismo é compreendido por quatro etapas. A primeira é a redução parcial do ouro com a formação de pequenos aglomerados. Na segunda etapa, as partículas formam um aglomerado com raio > 1,5nm. Os íons de ouro restantes são atraídos pela dupla camada elétrica do grupo formado. Na terceira e quarta etapas, ocorre a redução total do ouro iônico e posterior deposição na superfície dos aglomerados formados na etapa 2. Nas duas

últimas etapas, não há a formação de novas partículas. Portanto, o número de partículas formadas é determinado na fase inicial da síntese.

Figura 1: Mecanismo geral de crescimento da nanopartícula de Au em concordância com a síntese proposta por Turkevich



Fonte: WUITHSCHICK, Maria *et al.* Turkevich in *New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis* pg 7054. ACS Author Choice, 2015.

Os autores afirmam que as dimensões das partículas formadas dependem da segunda etapa do mecanismo de crescimento. Sendo dependente do número de partículas formadas e distribuição das mesmas. O número de partículas formadas nessa etapa depende da concentração inicial de  $H[AuCl_4]$ .

Um fator que influencia no tamanho das partículas é a barreira de agregação, definida pelos autores como energia necessária para agregação de duas partículas, estando relacionado com a estabilidade coloidal, resultado das interações de Van der Waals e forças repulsivas entre duas partículas. Assim, a barreira de agregação aumenta com o aumento do tamanho das partículas (Wuithschick et al. 2015).

Brust e Schiffrin descreveram a obtenção de nanopartículas de Au com dimensões mais reduzidas (diâmetros entre 1,5 e 5,2 nm) com boa estabilidade térmica e coloidal (Brust et al. 1994). Os autores desenvolveram um método que utiliza  $Na[BH_4]$  como agente redutor do ouro (III) ( $H[AuCl_4]$ ) num sistema de duas fases: tolueno/água. O íon  $[AuCl_4]^-$  é transferido para a fase orgânica pela ação de um tensoativo (brometo de tetraoctilamônio, TOAB) o que permite a redução de ouro iônico pelo  $Na[BH_4]$ . A ligação do TOAB à superfície das nanopartículas formadas não é suficientemente forte para garantir estabilidade coloidal com longo tempo. A estabilidade do coloide é promovida pela adição de tióis de cadeia

carbonada longa que, devido à afinidade do  $\text{Au}^+$  (ácido mole) pelo  $\text{S}^{2-}$  (base mole), coordenam fortemente à superfície das nanopartículas (Brust et al. 1995).

Posteriormente, os mesmos autores desenvolveram um método de síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas por p-mercaptofenol em sistema monofásico.

Jana e colaboradores obtiveram nanopartículas de Au com tamanhos médios entre 5-40 nm, utilizando agentes redutores distintos na preparação de sementes (pequenos aglomerados) e na fase de crescimento em partículas maiores. As sementes de ouro foram preparadas por redução de  $\text{H}[\text{AuCl}_4]$  utilizando  $\text{Na}[\text{BH}_4]$  na presença de íon citrato. Na fase de crescimento adicionou-se ácido ascórbico. A estabilidade das partículas durante a fase de crescimento foi promovida pela adição do agente tensoativo brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB. O ácido ascórbico é um redutor fraco na redução de espécies de Au(III) a Au coloidal, em solução aquosa. No entanto, na presença de sementes de Au formadas previamente na presença de  $\text{NaBH}_4$ , revelou-se bastante eficaz no crescimento controlado dessas sementes (Jana et al. 2001).

Perrault e colaboradores (2009) conseguiram aumentar o tamanho médio da nanopartícula de ouro, preparadas por redução com íon citrato, até uma faixa de tamanhos de 50 a 200 nm, mantendo-se monodispersas, utilizando um agente redutor mais suave como a hidroquinona na fase de crescimento de partícula. O íon citrato adsorvido na superfície das nanopartículas garante o crescimento controlado das NP coloidais estabilizadas eletrostaticamente. Inicialmente produzem-se sementes de nanopartículas de ouro, pelo método do citrato, e o crescimento posterior é garantido pela ação catalítica da hidroquinona à superfície das sementes previamente formada (Perrault & Chan 2009).

A redução do sal do metal também pode ser efetuada por ação de um glicol como, por exemplo, o etanodiol-1,2 (etilenoglicol). Este método foi proposto originalmente na síntese de partículas monodispersas e micrométricas para vários metais, tendo sido adaptado à obtenção de nanopartículas utilizando solventes tensoativos como a oleilamina ou o ácido oleico (Fievet et al. 1989).

Jhuang e Cheng (2015) estudaram a síntese de nanopartículas de prata sobre a superfície de partículas de dióxido de titânio disperso em etileno glicol através do processo de sonoquímica. O dióxido de titânio é atraído pelo polietileno glicol por ligação de hidrogênio e por força de Van der Waals. Assim, com a aplicação de energia (ondas ultrassônicas) o íon prata é induzido a reduzir sobre a

superfície do dióxido de titânio. Segundo os autores, a reação monitorada por espectro de absorção UV-Vis é rápida, com tempo menor que 30s. O valor máximo da banda absorbância relacionado com o tempo de reação mostrou-se dependente do comprimento de onda. A observação demonstra que a nanopartícula de prata cresceu com o tempo de reação. A superfície da nanopartícula de dióxido de titânio demonstrou agir como catalisador para a redução da Ag na presença de ultrassom (Jhuang & Cheng 2016).

No mesmo sentido, Sifontes *et al.* (2010) estudou as condições de formação de nanopartículas de prata por um processo poliol, utilizando NaOH e aquecimento por fonte de micro-ondas. Para análise do efeito do NaOH na ausência de meio de síntese, a síntese foi realizada com a suspensão do nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em etilenoglicol com adição de solução alcalina de NaOH. A suspensão formada foi aquecida por uma fonte de micro-ondas durante 60s. Partículas com tamanhos na ordem de 4-18 nm foram obtidas com morfologia esférica. O procedimento de síntese apresenta um método rápido para obtenção de nanopartículas de prata na ausência de polímeros ou surfactantes (Sifontes et al. 2010).

Melo Jr *et al.* (2012) propuseram sínteses simples para formação de nanopartículas de prata e de ouro utilizando a redução química de sais. Para a formação das nanopartículas de prata, adicionou-se à solução de boroidreto de sódio ( $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ), em banho de gelo, gota a gota de uma solução de nitrato de prata ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Tal procedimento proporcionou a obtenção de uma solução coloidal de nanopartículas de prata estável e de coloração amarelada. A estabilidade se deve ao fato do boroidreto de sódio ter sido adicionado em excesso. Assim, os íons boroidreto adsorvem nas superfícies das nanopartículas, gerando cargas nestas superfícies, criando repulsão eletrostática entre as nanopartículas, evitando a agregação das mesmas. Logo, o boroidreto de sódio em excesso foi o responsável pela estabilização das nanopartículas que se formaram. As nanopartículas sintetizadas possuíam um diâmetro médio na faixa de 20-30 nm.

Para a síntese de nanopartículas de ouro, aqueceu-se até a temperatura de ebulição com agitação uma solução de ácido tetracloroáurico ( $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Depois, adicionou-se rapidamente uma solução de citrato de sódio (1%). A agitação e a temperatura ebulição foram mantidas por 10 min, logo após esse tempo, o aquecimento foi cessado e a agitação foi mantida. O procedimento resultou numa suspensão coloidal estável de nanopartículas de ouro com diâmetro médio de 21

nm. A estabilidade da suspensão está relacionada com a adsorção dos íons citratos nas superfícies das nanopartículas de ouro (Melo et al. 2012).

Berni Neto, Ribeiro e Zucolotto (2008) sintetizaram nanopartículas de prata pela mistura de soluções de nitrato de prata, polivinil álcool (estabilizante polimérico) e boroidreto de sódio. O meio reacional foi mantido sob agitação e em temperatura ambiente. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por espectroscopia no UV Visível e Infravermelho. A caracterização por UV Visível só é possível pela existência do fenômeno ressonância da banda plasmônica. O fenômeno está relacionado com a incidência de uma onda eletromagnética na região do visível sobre a nanopartícula metálica (diâmetros de 1-100 nm) ocasionando a oscilação em ressonância da nuvem eletrônica da nanopartícula, transformando a energia das ondas eletromagnéticas em energia térmica. As nanopartículas de prata possuem banda de absorção por volta de 400 nm, variações nos espectros são justificados pelas diferentes estruturas que propiciam diferentes modos de vibração. A baixa reprodutibilidade para a síntese da nanopartícula de prata resulta morfologias variadas.

Os autores constataram que a estabilidade proporcionada por diferentes concentrações de polivinil álcool não afeta o tamanho das nanopartículas (NETO et al. 2008).

Garcia (2011) utilizou boroidreto de sódio e citrato de sódio como redutores para síntese de nanopartículas de prata. O autor buscou uma padronização dos métodos de síntese, baseado nos métodos de Turkevich e de Lee and Meisel, para aplicação em pequena ou grande escala de fabricação. A metodologia, utilizando citrato de sódio como agente redutor, consiste no aquecimento e agitação de 125 mL de solução de  $\text{AgNO}_3$   $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ . Após temperatura de ebulição e gotejamento de 5 mL da solução de citrato de sódio a 1% manteve-se a agitação e o aquecimento. Após observar uma coloração amarelada, o aquecimento foi interrompido, a agitação continuou até observar uma mudança de coloração de amarelo pálido para amarelo dourado.

A espectroscopia UV Visível revelou bandas no comprimento de onda entre 425 e 430 nm, características de nanopartículas entre 35 e 50 nm. Segundo Garcia, as bandas mais estreitas mostram menor agregação, enquanto as bandas mais largas indicam maior agregação das partículas. O autor concluiu que as partículas

sintetizadas por este método são instáveis quando puras, porém, estáveis na presença de polímeros estabilizadores.

No procedimento para a síntese de nanopartículas usando o boroidreto de sódio como agente redutor, consiste em adicionar 30 mL solução de  $2 \text{ mol dm}^{-3}$  de boroidreto de sódio em um erlenmeyer em banho de gelo e com agitação magnética. Cerca de 2 mL de solução de nitrato de prata  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  foi gotejada lentamente e em seguida, observou-se uma coloração amarelada da solução. O gotejamento foi mantido até um volume de 10 mL de solução de  $\text{AgNO}_3$ . Em seguida, a síntese foi interrompida com a remoção da agitação e resfriamento. As amostras puras, analisadas por espectroscopia UV-Visível, apresentaram bandas com comprimento de onda na faixa de 397-398 nm, caracterizando partículas na faixa de 10 a 14 nm de diâmetro. É importante lembrar que para interpretação dos resultados, o autor considerou como sendo esférica a morfologia das partículas formadas (Garcia 2011).

É importante ressaltar que após a síntese é necessária a caracterização precisa das nanopartículas, para prever os impactos sobre as propriedades biológicas. A caracterização é fundamental para manter a segurança de manipulação, desenvolvimento de novos medicamentos e no tratamento de doenças (Lin et al. 2014; Pleus 2011). O aspecto característico dos nanomateriais, como tamanho, forma, distribuição de tamanho, área superficial, solubilidade, agregação, etc., precisa ser avaliado antes de conhecer a toxicidade ou biocompatibilidade (Murdock et al. 2008).

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica muito útil e confiável para a caracterização primária de nanopartículas sintetizadas, sendo também usada para monitorar a síntese e a estabilidade de nanopartículas de prata (Gole et al. 2000). As nanopartículas de prata têm propriedades ópticas únicas que as fazem interagir fortemente com comprimentos de onda específicos da luz. Além disso, a técnica de espectroscopia UV-Vis é rápida, fácil, simples, sensível, seletiva para diferentes tipos de nanopartículas, não sendo necessária uma calibração prévia para a caracterização de partículas em suspensões coloidais (Huang et al. 2007; Leung et al. 2006; Tomaszewska et al. 2013). Para nanopartículas de prata, a banda de condução e a banda de valência estão muito próximas uma da outra, podendo os elétrons se moverem livremente. Estes elétrons livres dão origem a uma banda de absorção de ressonância plasmônica de superfície (SPR), devido à oscilação

coletiva dos elétrons das nanopartículas de prata em ressonância com a onda de luz (Kreibig & Vollmer 1995; Link & El-Sayed 2003; Noginov et al. 2007; Taleb et al. 1998). A absorção de luz pelas nanopartículas de prata depende do tamanho da partícula, do meio dielétrico e do ambiente químico (He et al. 2002). A observação de uma banda - atribuída a um plasmon de superfície - é atribuída a várias nanopartículas de metal com tamanhos variando de 2 a 100 nm (Henglein 1993; Sastry et al. 1997).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Preparação e caracterização das nanopartículas de prata.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da toxicidade das nanopartículas de prata tanto na forma de suspensão quanto em forma lipossomal, sobre cultura planctônica e biofilme de *Candida Albicans*;
- Aplicação de tratamento matemático na otimização do processo de preparação das nanopartículas;
- Utilização da técnica de espectroscopia na região UV-Vis e AFM para caracterizar as nanopartículas de prata.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Baseado no método proposto por Garcia (2011) para a síntese de nanopartículas de prata, utilizando citrato de sódio como agente redutor, desenvolveu-se uma metodologia específica de síntese de nanopartículas de prata com propriedades bactericidas.

A caracterização das nanopartículas sintetizadas foi realizada com medidas espectrofotométricas na região UV-Visível.

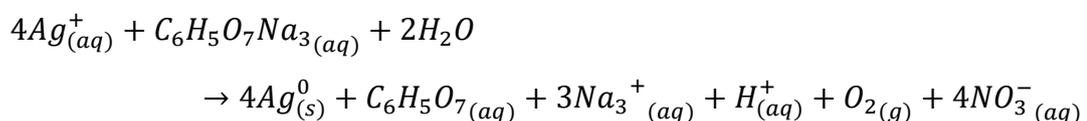
Os espectros eletrônicos das soluções coloidais foram obtidos empregando um espectrofotômetro da marca PerkinElmer, modelo lambda 25, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

Avaliou-se a toxicidade da prata em suspensão e veiculada a lipossomos como carreadores em meio planctônico e biofilme. E em seguida, realizou-se a análise do perfil da curva de crescimento, o consumo de glicose, a acidogenia, a viabilidade celular e a peroxidação lipídica das células tratadas, determinando assim alterações bioenergéticas em *Candida albicans*.

### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese das nanopartículas foi realizada utilizando a redução da prata presente no nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) pelo citrato de sódio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) na presença do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS), com a função de estabilizante.

A reação padrão entre o sal de prata e o íon citrato é dada por:



Foi utilizado um planejamento fatorial  $2^3$  para avaliar o efeito das concentrações dos reagentes na banda de absorvância, pois é conhecido da literatura que existe uma relação entre a banda de absorvância e o tamanho das nanopartículas de prata. Os níveis das variáveis do planejamento foram:  $\text{AgNO}_3$  em  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  (-) e  $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  (+),  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  em  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  (-) e  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  (+) e SDS em  $0,5\%$  (-) e  $1\%$  (+). Para os cálculos utilizou o software Statistica

7, uma tabela da estimativa dos efeitos para 95% de intervalo de confiança e também gráficos de superfícies de respostas. A matriz do planejamento fatorial está apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial obtida com os níveis das variáveis do planejamento

Experimento	[AgNO <sub>3</sub> ]	[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ]	[SDS]
1	1,0000	1,0000	1,0000
2	-1,0000	1,0000	1,0000
3	1,0000	-1,0000	1,0000
4	-1,0000	-1,0000	1,0000
5	1,0000	1,0000	-1,0000
6	-1,0000	1,0000	-1,0000
7	1,0000	-1,0000	-1,0000
8	-1,0000	-1,0000	-1,0000

Fonte: Da autora (2016)

Antes da realização dos experimentos, as vidrarias foram cuidadosamente lavadas com solução sulfonítrica com objetivo de eliminar qualquer contaminação.

O SDS e o AgNO<sub>3</sub>, em quantidades determinadas usando a matriz do planejamento fatorial, foram adicionados num balão volumétrico com capacidade para 100mL. Em seguida, adicionou-se água destilada até o menisco do balão.

Após o preparo de 100 mL da solução de AgNO<sub>3</sub> contendo o SDS, colocou-se a mesma num erlenmeyer de 500 mL sob aquecimento e agitação magnética com controle de temperatura. Acompanhou-se a temperatura da solução com um termômetro e, logo após o início da ebulição a 95°C, iniciou-se o gotejamento da solução de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>, concentração determinada usando também a matriz do planejamento fatorial, em um procedimento similar ao da titulação. Juntamente com o gotejamento, iniciou-se também a agitação do meio reacional em 100 rpm.

Em seguida, a solução de citrato foi gotejada em uma velocidade de 1 gota por segundo até observar-se uma coloração amarelo pálida, de acordo com a figura 2a. Cessou-se o gotejamento e o aquecimento, mantendo-se a suspensão sob

agitação até a observação de uma coloração amarelo ouro como apresentada na figura 2b. O volume da solução de citrato gotejada variou de 25 a 40 mL.

Figura 2: Coloração amarelada observada durante a síntese

- a) amarelo pálido quando cessou o gotejamento e o aquecimento
- b) amarelo ouro ao final da síntese.



a)

b)

Fonte: Da autora, 2015.

Após as sínteses, as suspensões de nanopartículas foram caracterizadas com medidas espectrofotométricas UV-Visível, na faixa de comprimento de onda de 600 – 280 nm.

Após conhecimento do comprimento de onda correspondente à banda de absorbância das suspensões de nanopartículas obtidas, analisou-se os dados de acordo com método de superfície de resposta utilizando o software Statistica 7. Os

resultados mostraram a influência das concentrações dos reagentes no tamanho estimado das nanopartículas.

A síntese das nanopartículas para aplicação na confecção dos lipossomos, colocou-se 100 mL de solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$   $10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) em um erlenmeyer de 500 mL com agitação magnética e aquecimento. Aguardou-se o tempo necessário para a solução entrar em ebulição e gotejou-se 8 mL de solução de citrato de sódio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$  1%) em uma velocidade de aproximadamente 1 gota por segundo. Após observação de coloração amarelo pálido, cessou-se o aquecimento e deixou a suspensão resultante sob agitação até o aparecimento de uma coloração amarelo ouro. O pH da suspensão obtida foi 6.

Com a suspensão de nanopartículas obtida realizou medidas espectrofotométricas na região do UV-Visível. As medidas foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 600–280 nm. A banda de absorbância foi observada no comprimento de onda de 422 nm, caracterizando nanopartículas de tamanho entre 35-50 nm.

As morfologias das nanopartículas de prata foram obtidas através de microscopia de força atômica (AFM), utilizando o modo dinâmico (microscópio Shimadzu modelo SPM9700). Varreduras em área de 1  $\mu\text{m}$  foram feitas visando obter a distribuição de diâmetros das partículas. Aproximadamente 5 microlitros da dispersão foram colocados sobre lâminas de silício (001) visando uma distribuição uniforme de partículas sobre esse substrato de baixíssima rugosidade. Após alguns minutos de secagem do solvente a 60 °C as amostras foram então submetidas às medidas no AFM.

Os resultados obtidos foram tratados no software Gwyddion 2.40 e as distribuições de tamanho de partículas foram feitas utilizando o software UTHSCSA Image Tool, através da seleção aleatória de um grande número de partículas presentes nas imagens obtidas por AFM, permitindo dessa forma o cálculo do tamanho médio das partículas e seu desvio padrão.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES BIOENERGÉTICAS EM *CANDIDA ALBICANS*

### 4.2.1 Obtenção e ativação da cepa de *Candida albicans*

A cepa de *Candida albicans*, CEC 1293, foi alíquotada em tubos criogênicos (1:1, v/v) com glicerol, armazenando-os no ultra freezer. Para a sua ativação, retirou-se uma alíquota do ultra freezer e ela foi semeada em placas petri com ágar Sabouraud, incubando-as por 24 horas em uma estufa a 37°C. Em seguida, realizou-se o primeiro repique retirando-se uma colônia crescida de uma das placas e inoculando-a em um tubo de vidro com 3 mL de solução caldo BHI (Brain Heart Infusion) estéril, incubando-o por 24 horas em uma estufa a 37°C. Após esse processo, realizou-se o segundo repique em que se pipetou 500 µL do tubo do primeiro repique e desprezou-se o volume em um novo tubo com solução BHI estéril, incubando-o por mais 24 horas em uma estufa a 37°C.

### 4.2.2 Confeção dos lipossomos com nanopartículas de prata pela técnica da sonicação

Para a confecção dos lipossomos, foi feita uma solução de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) e LPC (lisofosfatidilcolina) em clorofórmio (1 mL). Em seguida, este tubo foi seco sob uma atmosfera de nitrogênio e posteriormente dessecado *overnight* sob vácuo. Após esse processo, adicionou-se 1 mL da suspensão de nanopartículas de prata ao filme obtido que foi posteriormente incubado a 60°C intercalando uma vigorosa agitação. Esta solução foi então sonicada até a formação das vesículas.

### 4.2.3 Tempo de atuação das microformulações da prata sobre a *C. albicans* (UFC)

Uma suspensão de *C. albicans* (106 UFC/ cm<sup>3</sup>), uma suspensão lipossomal sem prata (lipossomos vazios) e uma suspensão lipossomal contendo prata foram utilizados para a confecção dos seguintes grupos experimentais:

- i) Lipossomos vazios (células tratadas com lipossomos vazios);
- ii) Lipossomos com nanopartículas de prata (células tratadas com lipossomos contendo prata);
- iii) Suspensão das nanopartículas de prata (células tratadas com solução de prata);
- iv) Controle positivo (células tratadas com solução de clorexidina);
- v) Controle negativo (células tratadas com solução de citrato de sódio, 1%).

Finalizada a montagem dos grupos e as células expostas aos seus respectivos tratamentos, os grupos foram incubados por 30, 60, 120, 240 e 480 minutos em uma estufa a 37°C. A cada tempo de incubação, foram coletadas amostras das células e semeadas em placas de Petri. Essas placas foram incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas. Após esse tempo foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

#### **4.2.4 Contagem dos tubos germinativos**

Preparou-se uma suspensão de  $10^6$  células em um tubo contendo BHI estéril e organizou-se 4 grupos em tubos Eppendorf, os quais foram:

- i) Controle negativo ( $10^6$  células + H<sub>2</sub>O estéril);
- ii) Controle positivo ( $10^6$  células + clorexidina);
- iii) Suspensão de nanopartículas de prata ( $10^6$  células + NP. Ag);
- iv) Lipossomo com prata ( $10^6$  células + Lipo. Ag).

Estes foram incubados a 37°C por 30, 60 e 120 minutos. Após cada tempo, retirou-se 25 µL de cada grupo, adicionando-os em tubos Eppendorf contendo Soro Fetal Bovino (SFB) e incubando-os a 37°C por 3 horas. Ao final deste período os 25 grupos foram submetidos à contagem do tubo germinativo contando-se 100 células em câmara de Neubauer. Os valores de formação de tubo germinativo foram expressos em porcentagem.

#### 4.2.5 Curva de crescimento da *C. albicans* em meio planctônico

Preparou-se uma suspensão de  $10^6$  células, adicionando-a a 4 grupos divididos em tubos Eppendorf da seguinte forma:

- i) Controle negativo ( $10^6$  células + H<sub>2</sub>O estéril);
- ii) Controle positivo ( $10^6$  células + clorexidina);
- iii) Nanopartículas de prata ( $10^6$  células + NP. Ag);
- iv) Lipossomos com prata ( $10^6$  células + Lipo. Ag).

Posteriormente, incubou-se os grupos a 37°C por 60 minutos e então retirou-se 375 µL de cada tubo e desprezou-se o volume em 4 tubos Falcon que continham BHI estéril. Os tubos então foram incubados à 37°C por 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. A cada tempo coletou-se uma alíquota para medir o pH, a absorbância e a glicose. Para a realização das medidas, utilizou-se, respectivamente, um pHmetro de bancada, um espectrofotômetro e um “kit” enzimático de glicose BioTécnica®.

#### 4.2.6 Análise de glicose da *C.albicans*

Para realização da análise de glicose, retirou-se alíquotas em tubos Eppendorf de cada grupo tratado e armazenou-os imediatamente no freezer -20°C. Após o tempo necessário para o término do experimento anterior, retirou-se as alíquotas, que após o descongelamento foram centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para a determinação da concentração de glicose (“kit” enzimático de glicose BioTécnica® adaptado).

Em seguida foram realizadas leituras utilizando-se um espectrofotômetro.

#### 4.2.7 Viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) no biofilme exposto aos grupos experimentais

Preparou-se uma suspensão de  $10^6$  células e inoculou-a em um tubo Falcon contendo BHI estéril suplementado com 1% de glicose. Agitou-se bem o tubo e o seu conteúdo foi distribuído em cada poço de uma placa de 24 poços e, em seguida, levou-se a placa para a estufa 37°C durante 24 horas. Após esse período, retirou-se

o meio de cultura cuidadosamente para não danificar o biofilme no fundo do poço e lavou-se os poços com água estéril. Esta placa foi dividida em 4 grupos de tratamentos diferentes, sendo cada grupo correspondente a uma linha horizontal da placa (6 poços para cada grupo), os quais são:

- i) Controle positivo (250  $\mu$ L de clorexidina);
- ii) Controle negativo (250  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril);
- iii) Nanopartículas de prata (250  $\mu$ L de NP. Ag);
- iv) Lipossomo com prata (250  $\mu$ L de Lipo. Ag).

Em seguida, esta placa foi incubada por 60 minutos. Ao final desta incubação os grupos experimentais foram lavados com água estéril. Posteriormente iniciou-se o protocolo da técnica do MTT, adicionando 1 mL de solução de MTT com BHI em todos os poços da placa e, em seguida, incubou-se na estufa a 37°C por 3 horas. Passado esse tempo, retirou-se a solução de MTT e adicionou-se DMSO (Dimetilsulfóxido). A leitura foi realizada utilizando um espectrofotômetro, fixando o  $\lambda$  em 540 nm.

#### **4.2.8 Crescimento do biofilme na presença da suspensão de prata**

Preparou-se uma suspensão de 10<sup>6</sup> células e adicionou-as em um tubo Falcon contendo BHI e suplementado com 1% de glicose. Posteriormente, agitou-se bem o tubo e distribuiu o seu conteúdo em 7 tubos Falcon, acrescentando em cada tubo os tratamentos experimentais. Organizou-se os tubos de acordo com as concentrações de prata:

- i) Tubo 1, controle negativo (água estéril);
- ii) Tubo 2 (5  $\mu$ L de solução coloidal de Ag/ mL);
- iii) Tubo 3 (10  $\mu$ L de solução coloidal de Ag/ mL);
- iv) Tubo 4 (50  $\mu$ L de solução coloidal de Ag/ mL);
- v) Tubo 5 (100  $\mu$ L de solução coloidal de Ag/ mL);
- vi) Tubo 6 (200  $\mu$ L de solução coloidal de Ag/ mL);
- vii) Tubo 7, controle positivo (clorexidina).

Em seguida, agitou-se bem os tubos e colocou 1 mL da solução em cada poço da placa de cada grupo experimental na coluna correspondente (4 poços/grupo). Em seguida, incubou-se as placas na estufa a 37°C por 24 horas. A leitura espectrofotométrica foi realizada de acordo com a técnica do MTT.

#### **4.2.9 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada usando o software Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). Os dados primeiramente foram avaliados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov com Dallal-Wilkinson-Lilliefors valor de P) e análise de variância (teste de Bartlett). Para os dados avaliados, foram utilizados teste não-paramétricos, teste de Kruskal-Wallis (para avaliação de colunas não pareadas) e teste de Friedman (para mensurações repetidas), ambos com pós teste de comparação múltipla de Dunn. Os valores de posição e dispersão dos dados plotados para o MTT foram representados em mediana, valores mínimos e máximos, já para os demais foram utilizados a média e o erro padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Após síntese das nanopartículas em triplicata, as suspensões obtidas foram submetidas à leitura espectrofotométrica. Os espectros obtidos para cada experimento da matriz do planejamento fatorial estão apresentados na figura 3. Cada experimento foi realizado em triplicata.

As bandas de absorvância obtidas foram em torno de 400 nm (tabela 2), que correspondendo a uma absorvância simétrica da banda de ressonância de plasmon relacionadas com as partículas esféricas de prata (Garcia 2011). Os espectros UV-Vis 1 e 6 apresentaram maior desvio da banda de absorvância. Tal desvio foi atribuído à diferentes estruturas formadas, o que proporciona diferentes vibrações e, conseqüentemente, diferentes espectros de absorção (NETO et al. 2008).

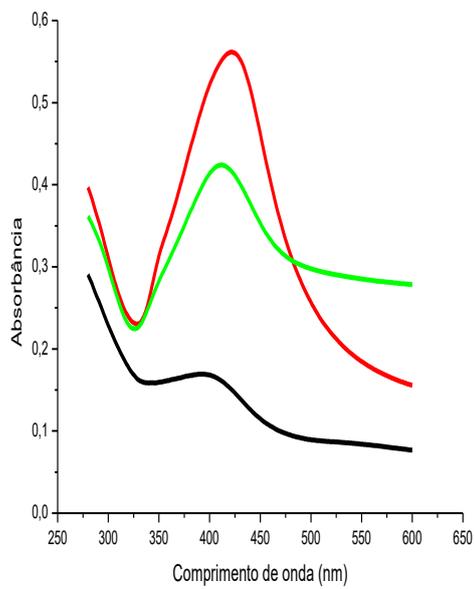
Atribuiu-se, também, aos desvios observados, a influência de fatores como velocidade de gotejamento da solução de  $C_6H_5O_7Na_3$  e presença impurezas nos reagentes. Sabe-se que a concentração inicial dos reagentes, a temperatura, velocidade de gotejamento e velocidade de agitação exercem influência sobre a estabilidade e concentração da suspensão coloidal formada. Tais fatores determinam a possibilidade de colisão e agregação das nanopartículas. A presença de impurezas e a exposição à radiação eletromagnética podem causar um aumento descontrolado das nanopartículas e, conseqüentemente, causam a desestabilização do coloide (De Lima 2011).

As bandas de absorção mais largas indicam agregação das nanopartículas e as mais estreitas são correspondentes às soluções com nanopartículas mais dispersas (Garcia 2011).

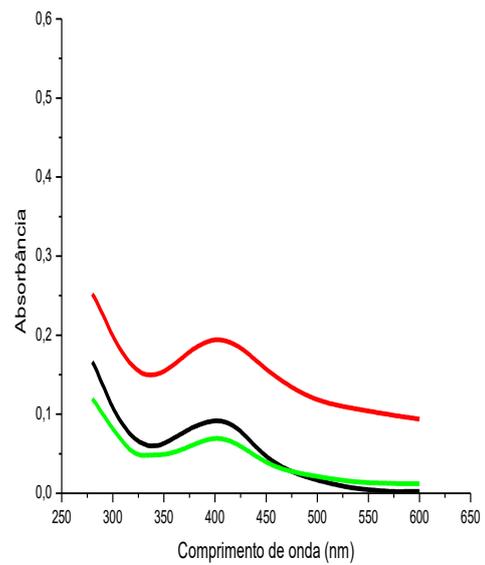
Figura 3: Espectros UV-Vis obtidos das suspensões de nanopartículas de prata

- a) Espectros obtidos do experimento 1.
- b) Espectros obtidos do experimento 2.
- c) Espectros obtidos do experimento 3.
- d) Espectros obtidos do experimento 4.
- e) Espectros obtidos do experimento 5.
- f) Espectros obtidos do experimento 6.
- g) Espectros obtidos do experimento 7.
- h) Espectros obtidos do experimento 8.

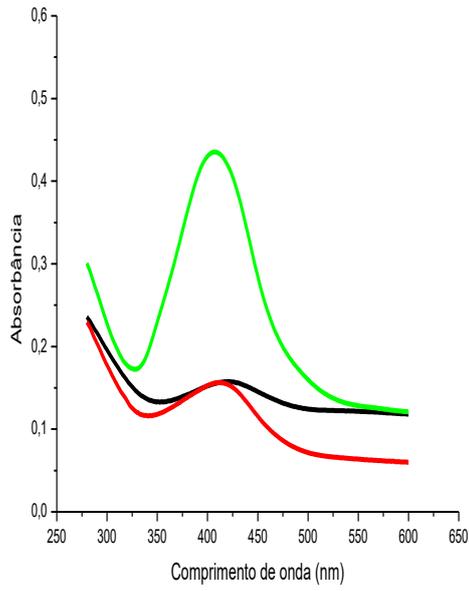
As cores dos espectros representam as réplicas dos experimentos.



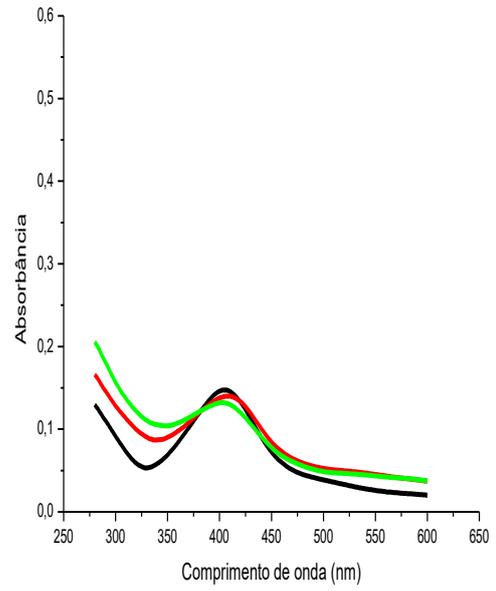
a)



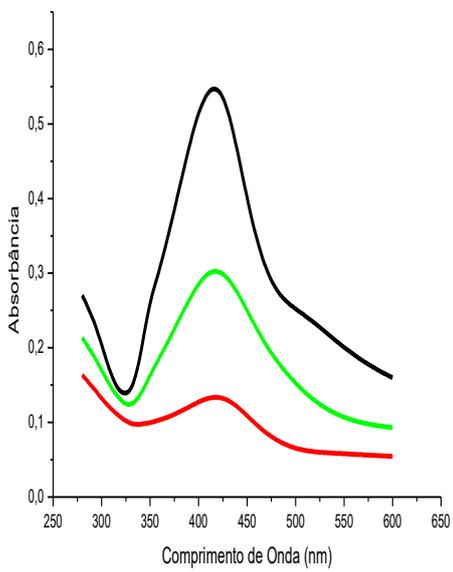
b)



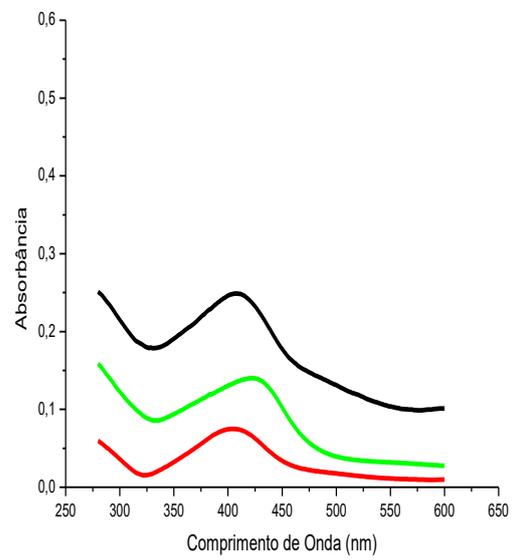
c)



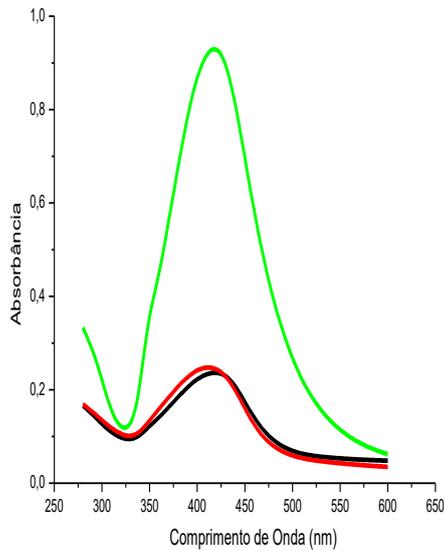
d)



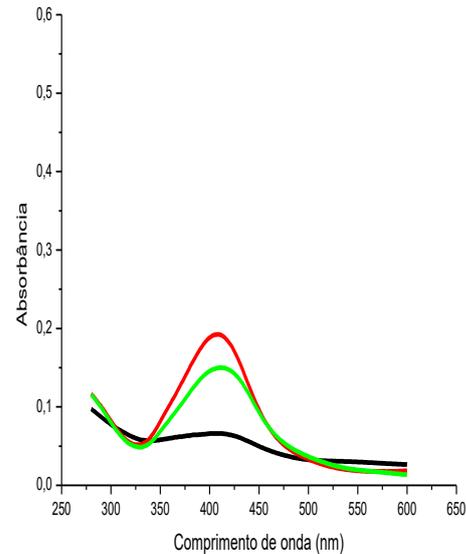
e)



f)



g)



h)

Fonte: Da autora (2016)

A coloração amarelada observada nas suspensões de nanopartículas de prata é causada pela ressonância da banda plasmônica das nanopartículas, resultando para cada suspensão preparada diferentes tons de amarelo.

O aquecimento mantido após a síntese provavelmente influenciou nas diferentes tonalidades das suspensões de nanopartículas. Garcia (2011) mostrou que, quanto maior o tempo de aquecimento após a síntese, mais forte é a agregação das nanopartículas, resultando diferentes tonalidades de cor.

A matriz do planejamento fatorial  $2^3$ , bem como a média do comprimento de onda relativo à banda de absorbância, o desvio padrão da mesma e a relação do comprimento de onda com o tamanho característico da nanopartícula estão apresentados na tabela 2. A faixa do tamanho das nanopartículas de prata foi retirada da correlação, conhecida na literatura, entre o diâmetro médio das nanopartículas e o comprimento de onda observado na banda (Mulfinger et al. 2007b).

Tabela 2: Relação da matriz do planejamento fatorial  $2^3$  com a média de  $\lambda$  e diâmetro das nanopartículas

Experimento	[AgNO <sub>3</sub> ]	[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> ]	[SDS]	$\lambda$ (nm)	Diâmetro das nanopartículas (nm)
1	1,0000	1,0000	1,0000	408,75 ± 14,610	14-35
2	-1,0000	1,0000	1,0000	402,96 ± 0,06083	10-14
3	1,0000	-1,0000	1,0000	413,34 ± 6,8551	14-35
4	-1,0000	-1,0000	1,0000	405,15 ± 2,02952	10-14
5	1,0000	1,0000	-1,0000	417,05 ± 1,5566	14-35
6	-1,0000	1,0000	-1,0000	415,00 ± 15,755	35-50
7	1,0000	-1,0000	-1,0000	415,88 ± 3,8520	14-35
8	-1,0000	-1,0000	-1,0000	409,08 ± 1,6398	14-35

Fonte: Da autora (2016)

A correlação entre o diâmetro médio das nanopartículas e o comprimento de onda observado para a banda de absorvância da suspensão define a melhor combinação no planejamento fatorial, pois, quanto menor o comprimento de onda observado, menor o tamanho das nanopartículas. Logo, pode-se estabelecer uma relação entre as interações das concentrações dos reagentes com o tamanho das nanopartículas.

Os efeitos foram considerados significativos para valores de probabilidade (p) menores que 5%. Logo, pela análise da tabela, não houve nenhum efeito significativo para as variáveis em questão e nem para as interações entre elas ([AgNO<sub>3</sub>] e [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>], [AgNO<sub>3</sub>] e [SDS], [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>] e [SDS]). O valor do efeito explicita o quanto a resposta vai variar se as variáveis em questão saírem do nível -1 e irem até o nível +1. Observa-se na tabela 3, que os valores do efeito são aproximadamente o dobro dos valores dos coeficientes.

Assim, o modelo matemático obtido utilizando o efeito de todas as variáveis e interações é linear e está apresentado na equação (1).

$$\begin{aligned} \lambda = & 410,90 + 2,8550[\text{AgNO}_3] + 0,03920[\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7] - 3,3508[\text{SDS}] \\ & - 0,89250[\text{AgNO}_3][\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7] + 0,63920[\text{AgNO}_3][\text{SDS}] \\ & - 1,7333[\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7][\text{SDS}] \end{aligned} \quad (1)$$

Tabela 3: Valores estimados dos efeitos das variáveis sobre a resposta da banda de absorção

Fatores	Efeito	p	Coefficientes
Média	410,9017	0,000457	410,9017
(1)[AgNO <sub>3</sub> ]	5,7100	0,065548	2,8550
(2)[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ]	0,0783	0,915968	0,0392
(3)[SDS]	-6,7017	0,055902	-3,3508
(1) com (2)	-1,7850	0,203226	-0,8925
(1) com (3)	1,2783	0,275279	0,6392
(2) com (3)	-3,4667	0,107319	-1,7333
R <sup>2</sup> = 0,99632			

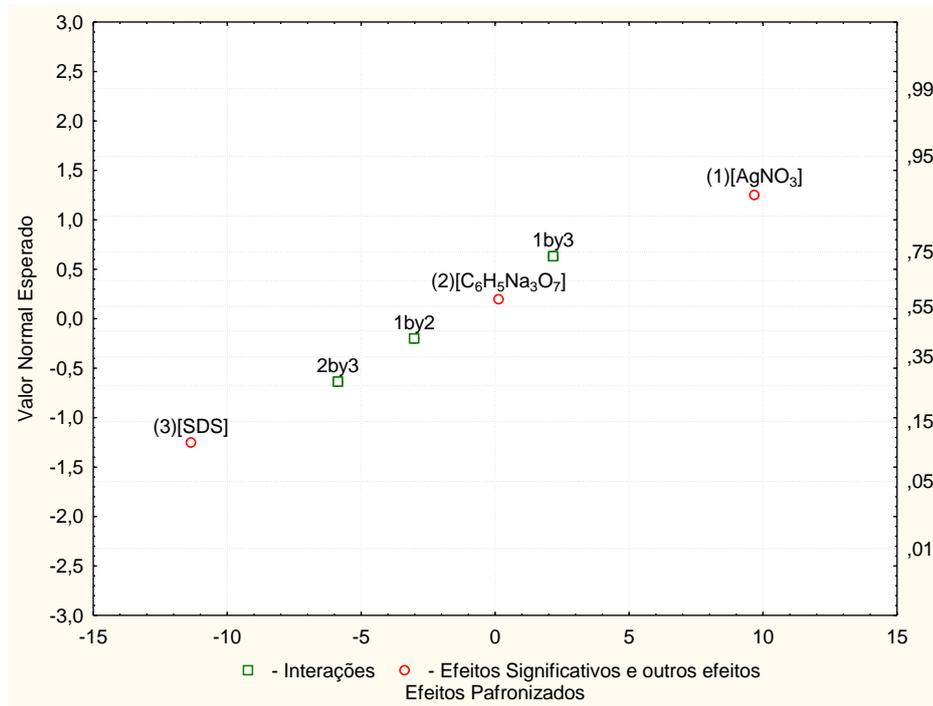
Fonte: Da autora (2016)

O gráfico da distribuição normal dos efeitos (figura 4) mostra que a variável [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>], a interação entre as variáveis (1) e (2) e a interação entre as variáveis (1) e (3) apresentam mesma ordem de medida do erro. A variável [AgNO<sub>3</sub>] exerce um fator positivo significativo sobre o comprimento de onda relativo à banda de absorbância da nanopartícula de prata. Já a variável [SDS] exerce um fator negativo significativo sobre o comprimento de onda relativo à banda de absorbância da nanopartícula.

O gráfico dos valores observados *versus* valores preditos (figura 5) apresenta a qualidade do ajuste obtido. A boa linearidade mostra que os dados se ajustam perfeitamente à reta identidade

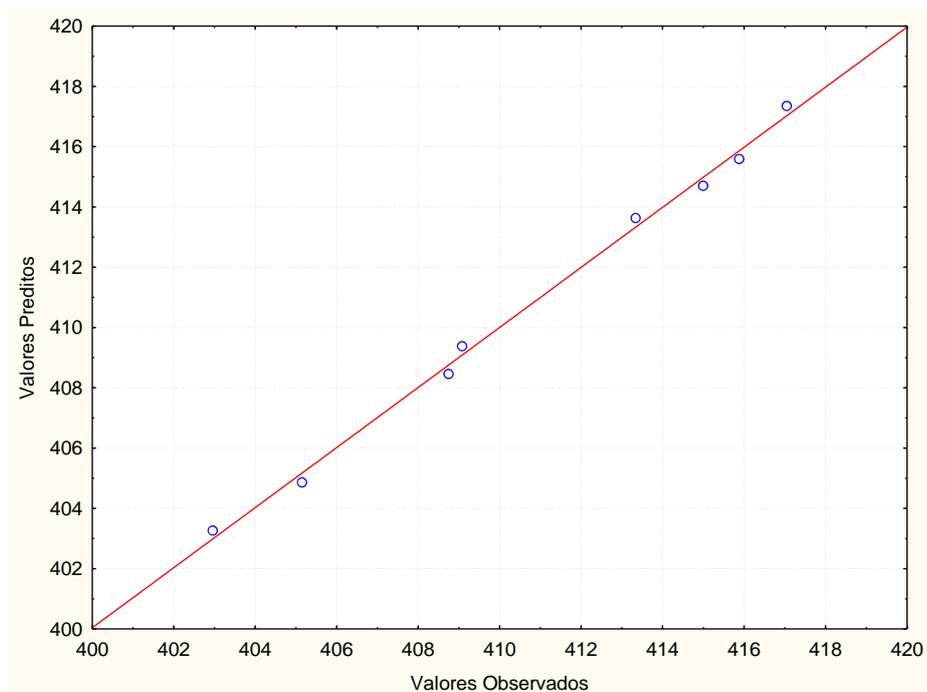
A figura 6 apresenta o gráfico dos valores observados *versus* resíduos, demonstrando a tendência dos dados. Logo, a variância não é constante para o modelo ajustado.

Figura 4: Distribuição normal dos efeitos. Notações utilizadas de acordo com a tabela 3.



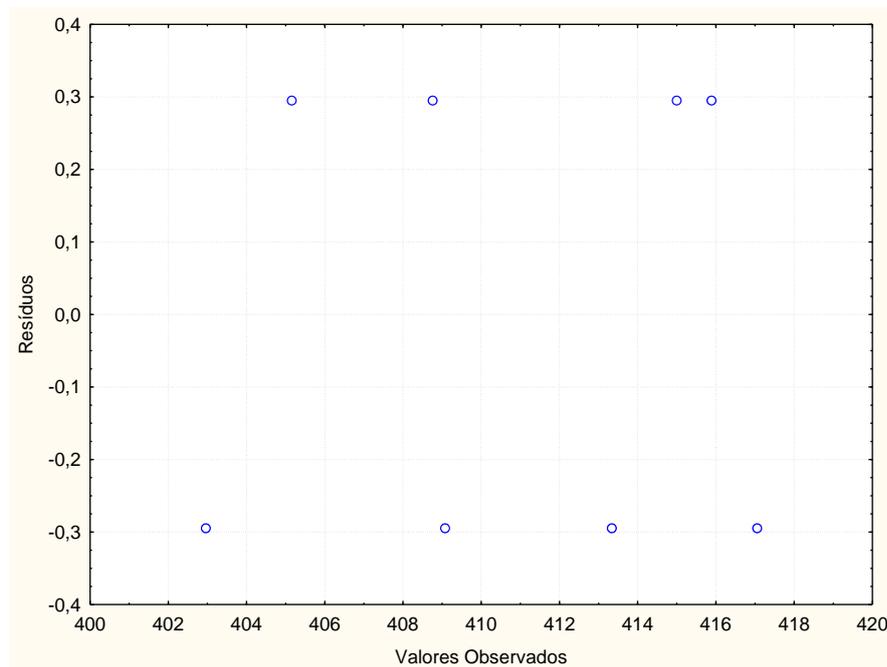
Fonte: Da autora (2016)

Figura 5: Valores observados para a banda de absorção máxima (nm) vs valores preditos pelo tratamento estatístico



Fonte: Da autora (2016)

Figura 6: Valores observados para a banda de absorção máxima (nm) vs resíduos do tratamento estatístico



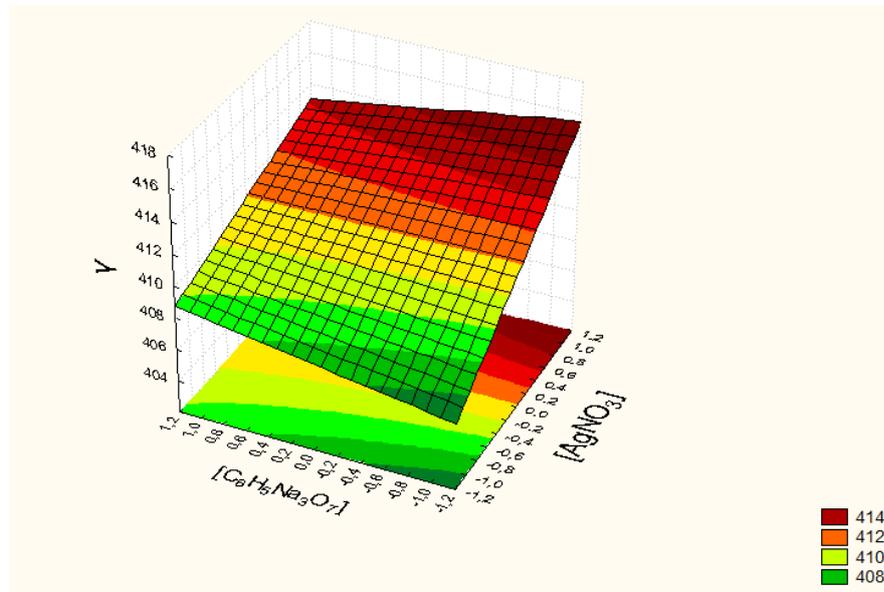
Fonte: Da autora (2016)

Sabe-se que partículas com menores tamanhos possuem maior efeito bactericida. Logo, avaliou-se como ponto ótimo resultado os menores comprimentos de onda da banda estando relacionado com os menores diâmetros das nanopartículas.

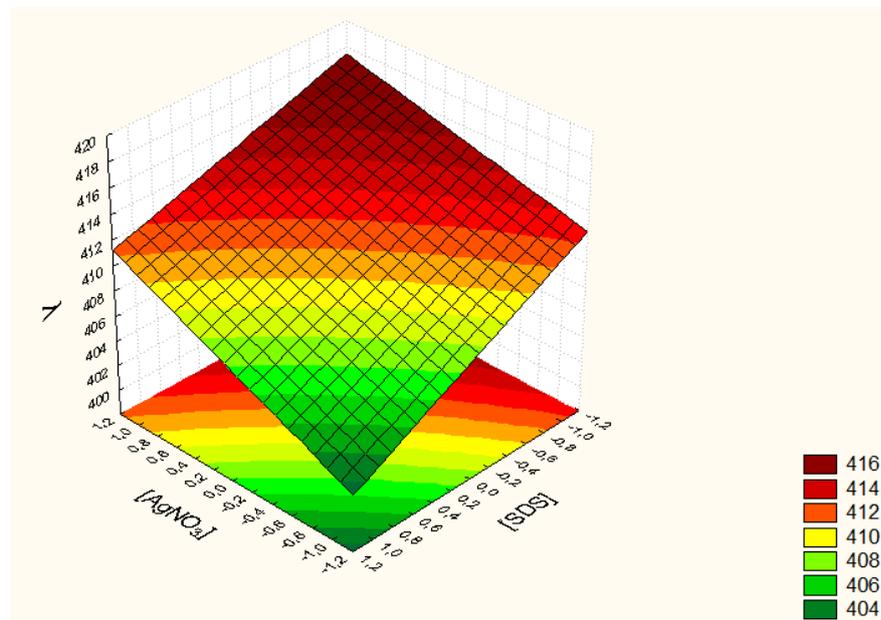
Através das superfícies de resposta plotadas para o modelo completo (figura 7), sabe-se que para menores valores da concentração de citrato de sódio e menores valores da concentração de nitrato de prata, obtém-se picos de absorvância em comprimentos menores. Assim, para a interação entre essas concentrações a resposta ótima obtida está entre 404 e 408 nm, obtendo-se então, empiricamente, partículas com tamanhos entre 10 e 14 nm. Para a interação entre as concentrações de nitrato de prata e de SDS sabe-se que, para menores valores da concentração de nitrato de prata e para maiores valores da concentração do surfactante, obtém-se o ponto ótimo entre 400 e 408 nm com partículas de tamanho entre 10 e 14 nm. Avaliando a interação entre as concentrações do citrato de sódio e do surfactante, observou-se que para maiores de valores das concentrações do citrato e do surfactante obtém-se o ponto ótimo entre 406 e 408 nm com partículas também de tamanho entre 10 e 14 nm.

Figura 7: Superfícies de resposta do comprimento de onda,  $\lambda$ .

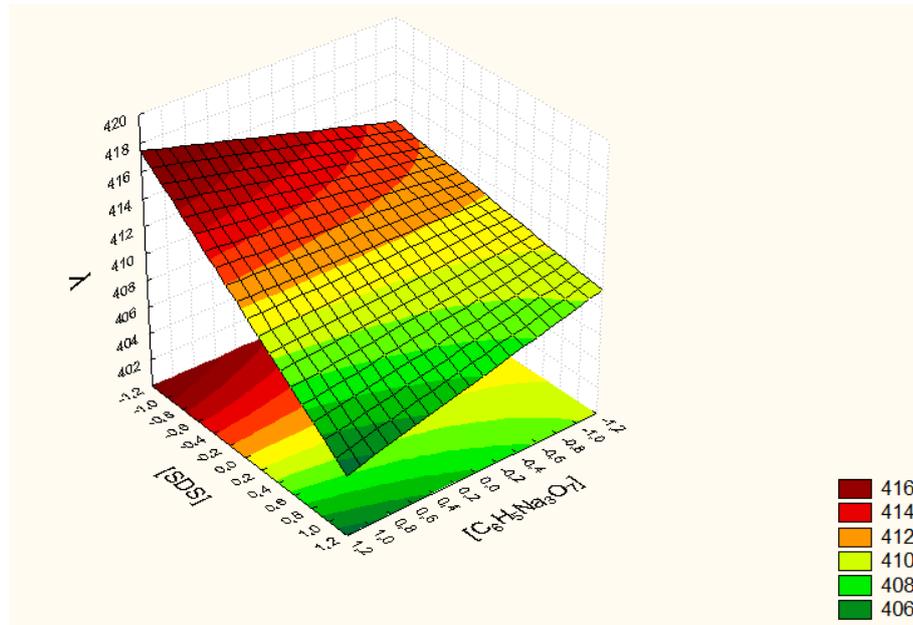
- Superfície de resposta obtida fixando a variável [SDS]
- Superfície de resposta obtida fixando a variável [ $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ]
- Superfície de resposta obtida fixando a variável [ $\text{AgNO}_3$ ]



a)



b)



c)

Fonte: Da autora (2016)

Eliminando-se as variáveis e as interações entre elas, cujo efeito sobre a resposta foi considerado não significativo, valores apresentados na tabela 3 e figura 4, obteve-se novos valores da estimativa dos efeitos sobre a resposta, mantendo o coeficiente de regressão significativo. Um novo modelo matemático foi proposto, sendo um modelo também linear, estando representado na tabela 4 e na equação (2).

$$\lambda = 410,90 + 2,8550[\text{AgNO}_3] - 3,3508[\text{SDS}] - 1,7333[\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7][\text{SDS}] \quad (2)$$

Tabela 4: Nova estimativa dos efeitos das variáveis sobre a resposta dos comprimentos de onda

Fatores	Efeitos	P	Coeficientes
Média	410,9017	0,000000	410,9017
(1)[AgNO <sub>3</sub> ]	5,7100	0,007384	2,8550
(3)[SDS]	-6,7017	0,004149	-3,3508
2 com 3	-3,4667	0,038106	-1,7333
$R^2 = 0,94536$			

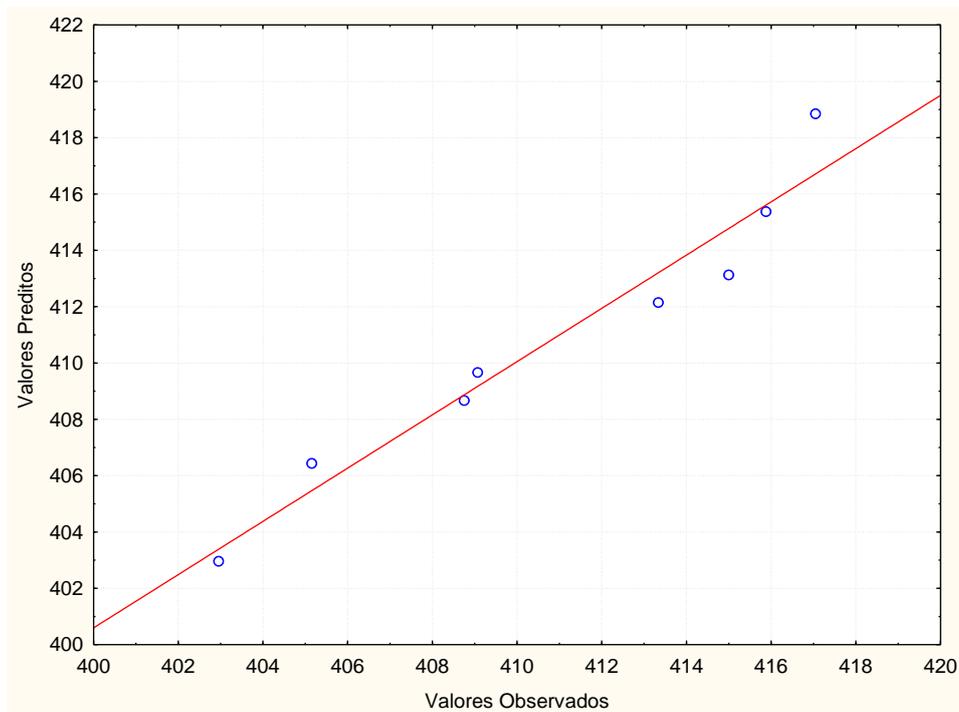
Fonte: Da autora (2016)

Para o modelo reduzido, todos os efeitos das variáveis foram significativos, pois, os valores de p são todos menores do que 5%.

O ajuste do modelo foi considerado de boa qualidade, uma vez que pelo gráfico dos valores observados *versus* valores preditos (figura 8), pode-se observar que os dados estão muito da reta identidade.

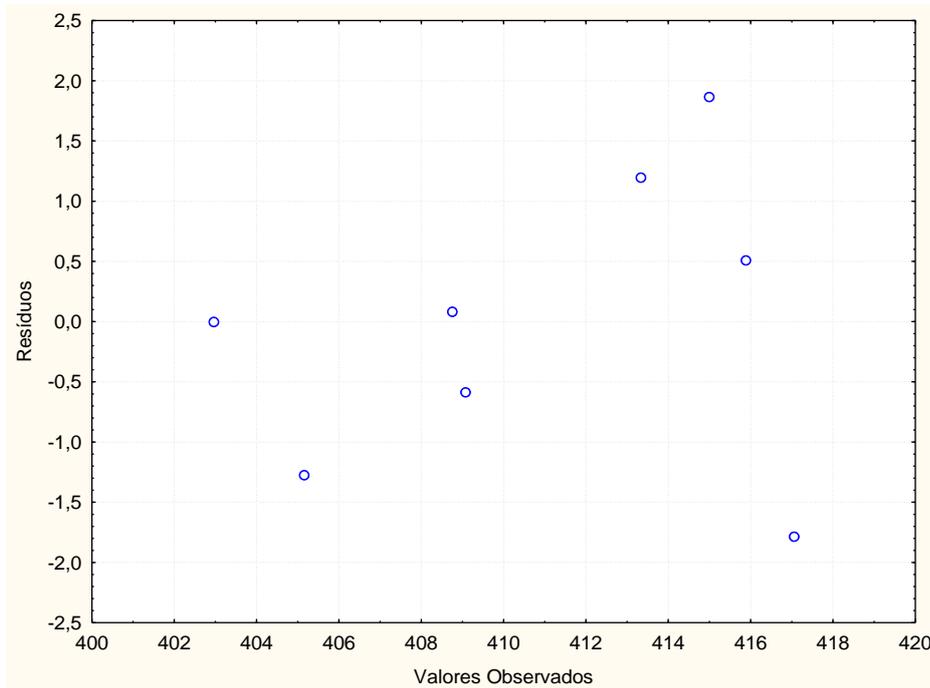
A variância foi considerada constante para o modelo ajustado, pois, não constatou uma tendência dos valores no gráfico dos valores observados *versus* resíduos apresentado na figura 9.

Figura 8: Valores observados para a banda de absorção máxima (nm) vs valores preditos pelo tratamento estatístico



Fonte: Da autora (2016)

Figura 9: Valores observados para a banda de absorção máxima (nm) vs resíduos do tratamento estatístico

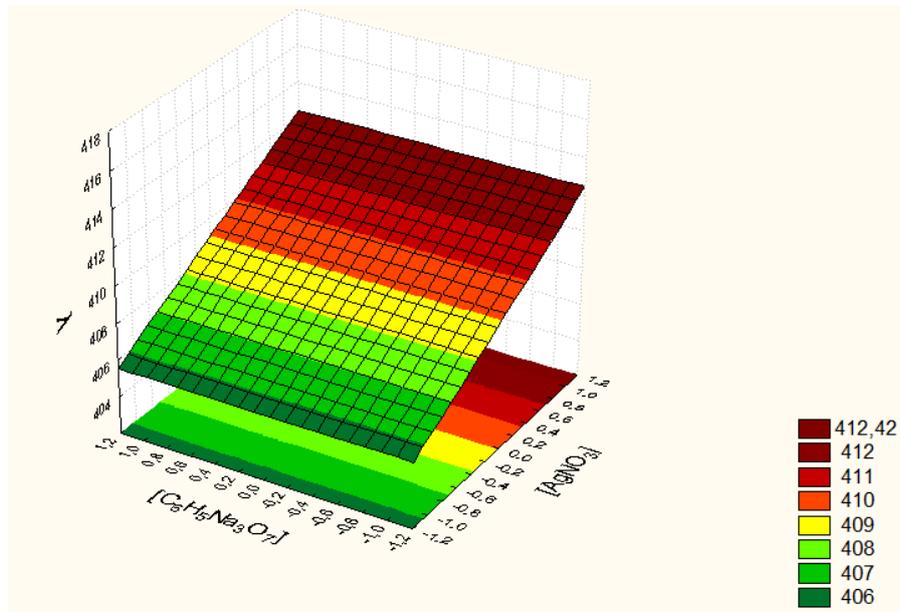


Fonte: Da autora (2016)

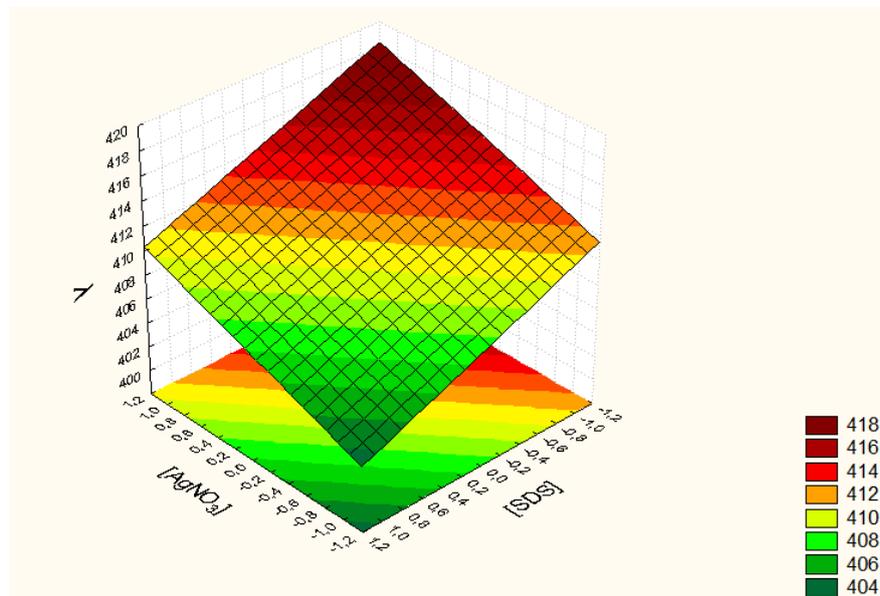
Para o modelo reduzido, as superfícies de resposta apresentadas na figura 10, mostram que para menores valores da concentração de citrato e maiores valores da concentração de citrato, o ponto ótimo encontra-se entre 406 e 408 nm. Fixando a variável  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7]$  tem-se que para menores valores da concentração de nitrato e maiores valores da concentração do surfactante obtém-se o ponto ótimo entre 404 e 406 nm. E, por fim, fixando a variável  $[\text{AgNO}_3]$  obtém-se o ponto ótimo entre 406 e 408 nm para maiores valores da concentração de citrato e maiores valores da concentração do surfactante.

Figura 10: Superfícies de resposta para o modelo reduzido

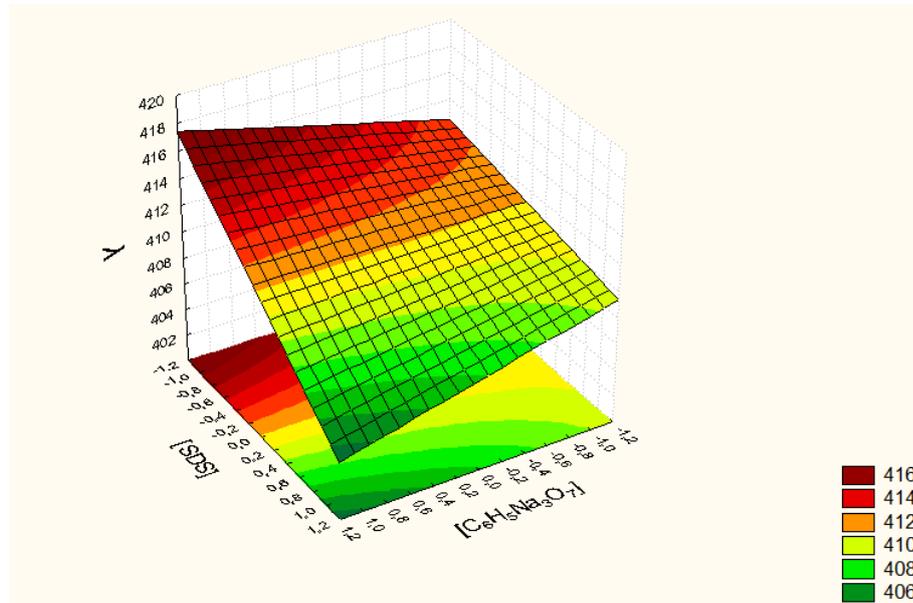
- Superfície de resposta obtida fixando a variável [SDS]
- Superfície de resposta obtida fixando a variável [ $C_6H_5Na_3O_7$ ]
- Superfície de resposta obtida fixando a variável [ $AgNO_3$ ]



a)



b)



c)

Fonte: Da autora (2016)

A concentração inicial do nitrato de prata interfere no número de partículas formadas, que por sua vez interfere na forma como as mesmas serão distribuídas, caso o mecanismo de síntese siga o mecanismo proposto por Turkevich (Wuithschick et al. 2015). A escolha do procedimento justifica a presença dos pontos ótimos encontrados para menores concentrações de nitrato de prata, resultando na formação de um número menor de partículas e então melhor dispersão, evitando a agregação.

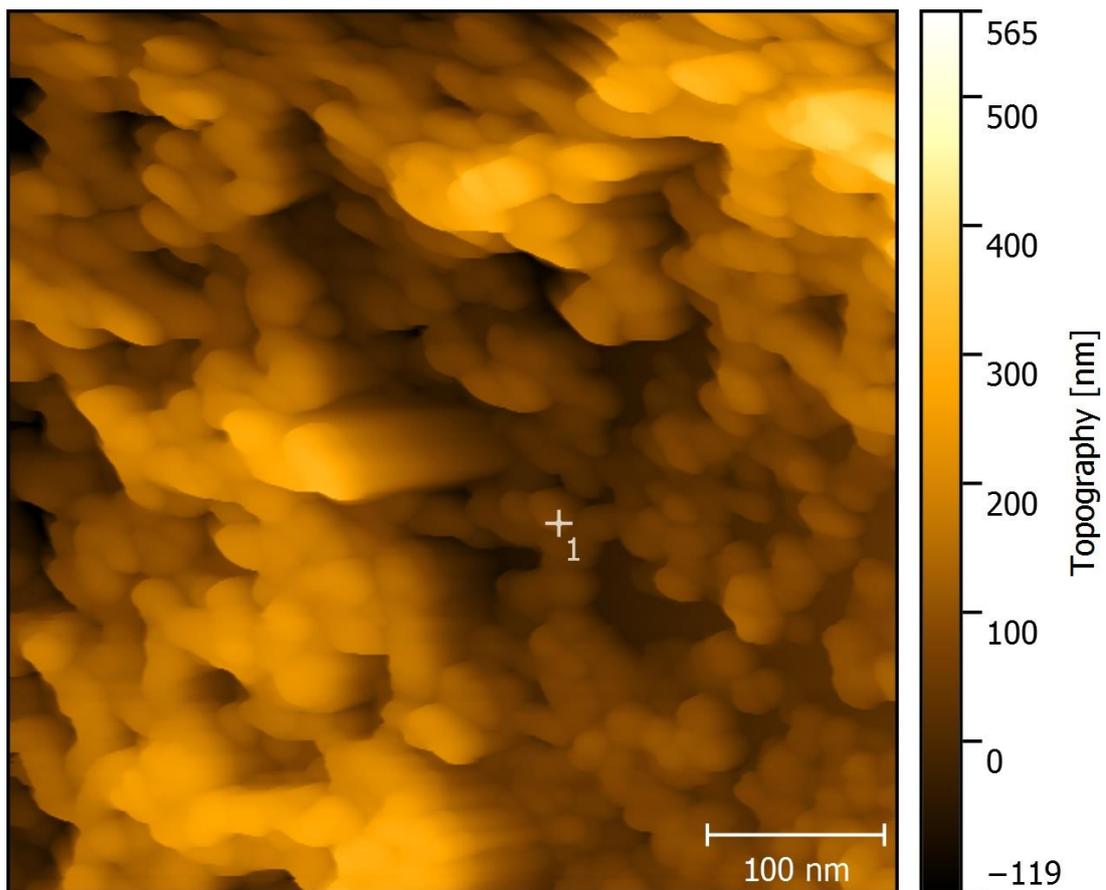
A concentração do íon citrato interfere no tempo necessário para que as nanopartículas se formem. Estudos mostram que para maiores concentrações de citrato, maior é o tempo necessário para a formação das nanopartículas (Garcia 2011). Assim, a melhor combinação dos reagentes é alcançada com maiores valores de concentração de citrato, resultando num maior tempo para formação das nanopartículas.

Observou-se que os surfactantes atuaram como estabilizadores das nanopartículas, sendo absorvidos pela superfície da partícula, resultando em cadeias liofílicas que fazem interações com o solvente, mas as partículas no interior dos surfactantes estão protegidas das interações da interação com o solvente (Melo et al. 2012).

Assim, as variáveis que tiveram efeito significativo sobre o diâmetro da nanopartícula foram às concentrações do nitrato de prata e do SDS e a interação entre as concentrações do citrato de sódio e do SDS.

As imagens de morfologia obtidas com AFM (Figura 11) indicam que a síntese das nanopartículas de prata preparadas empregando citrato nas condições do experimento 1 -  $[AgNO_3]=2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[C_6H_5Na_3O_7]=0,2 \text{ ml dm}^{-3}$  e  $[SDS]=1\%$  - gerou uma distribuição uniforme de partículas circulares com diâmetro médio de  $20,5 \pm 3,0 \text{ nm}$ . A distribuição apresentou um desvio pequeno o que reforça o sucesso do processo de síntese descrito neste trabalho. Os tamanhos médios das partículas estão de acordo com aqueles estimados por medidas de UV-Vis.

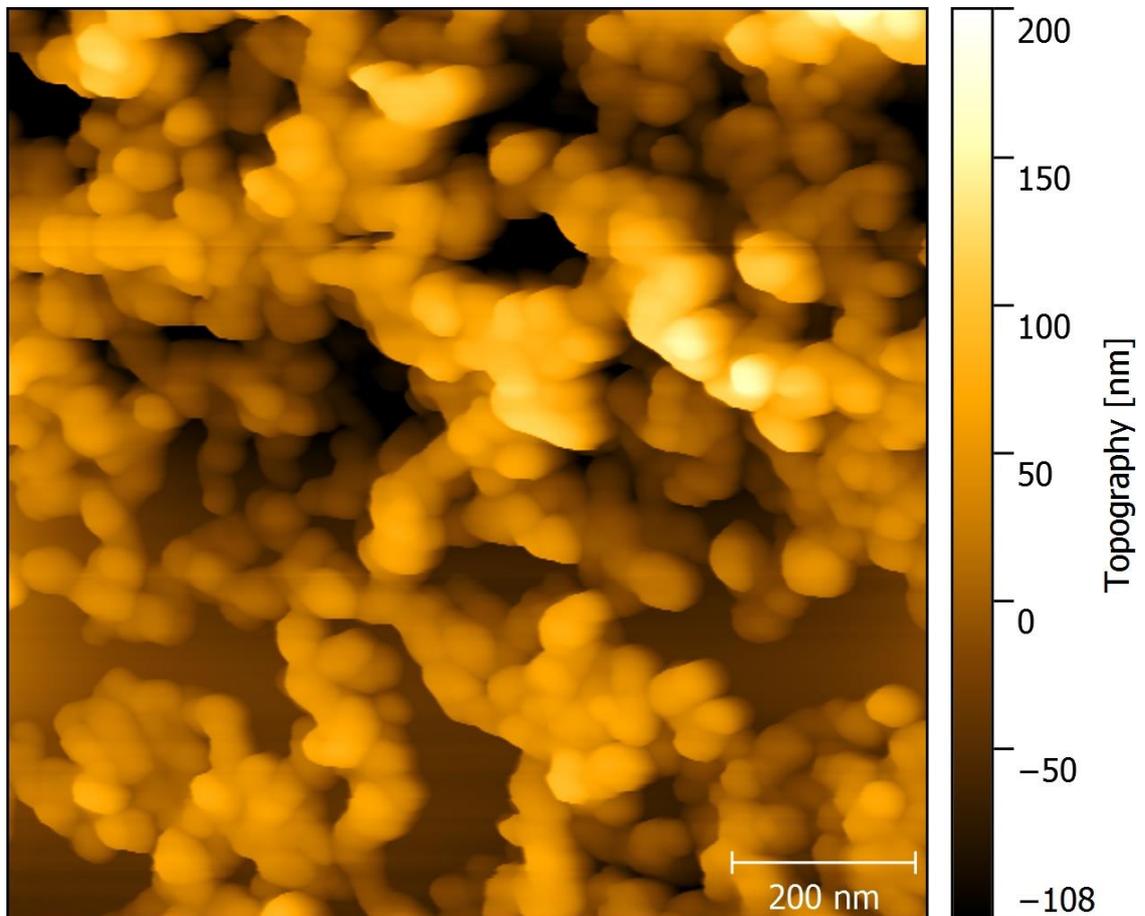
Figura 11 - Imagem de microscopia de força atômica ilustrando a morfologia das nanopartículas de prata sobre substrato de silício monocristalino



Fonte: Da autora (2016)

As imagens de morfologia obtidas com AFM (Figura 12) indicam que a síntese das nanopartículas de prata preparadas empregando citrato nas condições do experimento 6 - $[\text{AgNO}_3]=1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7]=0,2 \text{ ml dm}^{-3}$  e  $[\text{SDS}]=0,5\%$  - gerou uma distribuição uniforme de partículas circulares com diâmetro médio de  $48,6 \pm 6,0 \text{ nm}$ .

Figura 12- Imagem de microscopia de força atômica ilustrando a morfologia das nanopartículas de prata sobre substrato de silício monocristalino



Fonte: Da autora (2016)

## 5.2 DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES BIOENERGÉTICAS EM *CANDIDA ALBICANS*

Para avaliar a ação da prata na forma de nanopartículas e nanopartículas lipossomais, ambas em suspensão aquosa, sobre uma cepa de *C. albicans*,

estabeleceu-se grupos de controle em testes com clorexidina, lipossomos vazios e água, os quais serviram somente como parâmetro de efetividade dos experimentos realizados. Assim, grupos contendo a clorexidina serviram de controle, pois deste antimicrobiano esperava-se uma inibição do crescimento celular. Grupos contendo os lipossomos vazios serviram de controle na intenção de avaliar a ação única dos lipossomos, ainda isentos da prata, como agentes meramente carreadores e não antimicrobianos. Já as células tratadas com água serviram de modelo comparativo, indicando que a alteração de volume, ocasionada pela adição dos demais agentes, não interferiria nos resultados. Os grupos experimentais considerados como teste foram os que possuíam a nanopartícula de prata e a mesma incorporada às vesículas lipossomais.

A contagem de células permitiu observar que houve uma significativa diminuição na formação do número de colônias dos grupos tratados com prata lipossomal após 30 min, conforme figura 13 a, e no grupo tratado apenas com prata, conforme figura 13 b. Observou-se também um comportamento anômalo para o controle com água estéril e para lipossomos vazios, apesar de uma significativa diminuição do tempo de 30 minutos para 60 minutos dos grupos controle negativo (figura 13 c) e lipossomos vazios (figura 13 d), há um crescimento de colônias no primeiro grupo (figura 13 c) e uma constante no segundo grupo (figura 13 d) ambos em torno de  $4 \times 10^6$  células. No gráfico referente ao controle positivo – na presença da clorexidina (13 e) não houve crescimento de colônias, o que mostra a grande eficácia do antibiótico.

Figura 13: Contagem de células expostas a diferentes agentes e tempos

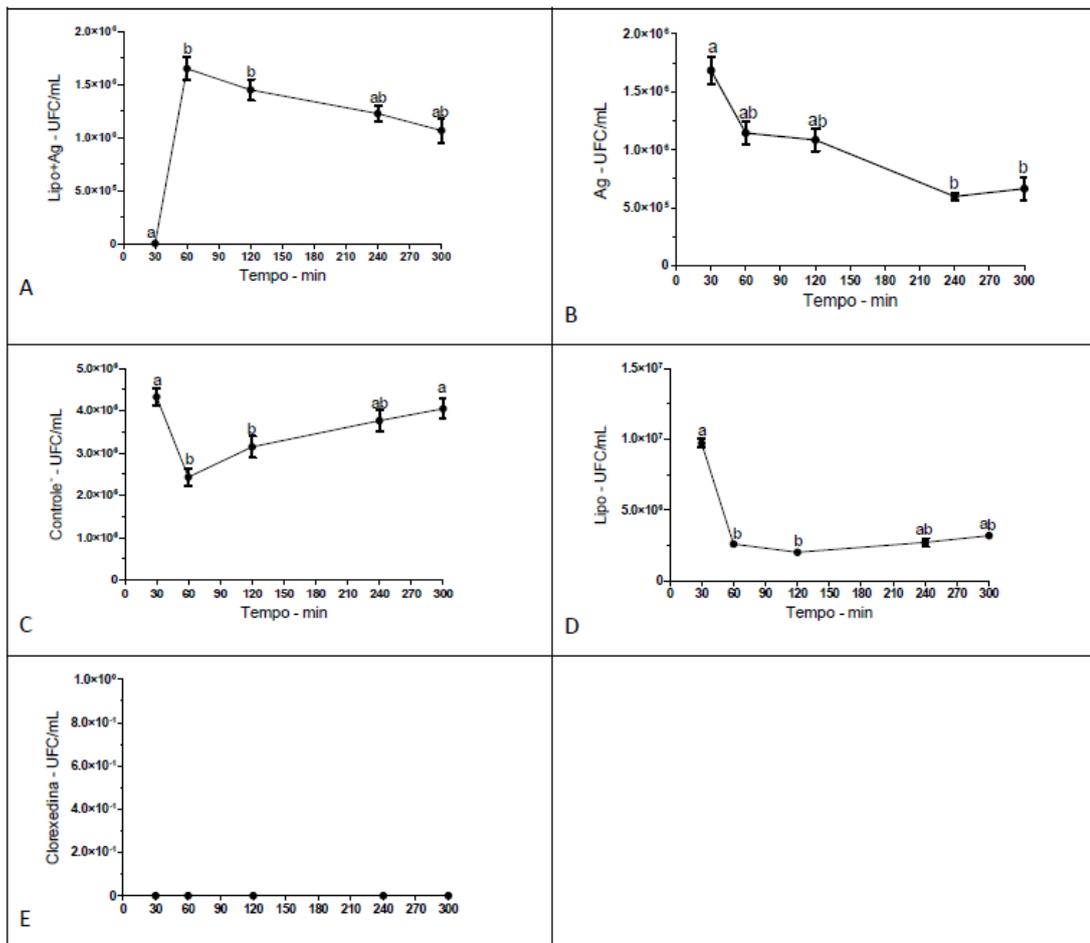
A – C) *albicans* tratada com solução de prata lipossomal durante 30, 60,120 e 240 minutos

B – C) *albicans* tratada com solução de prata durante 30, 60,120 e 240 minutos

C – C) *albicans* tratada com água estéril durante 30, 60,120 e 240 minutos

D – C) *albicans* tratada com solução de lipossomos vazios durante 30, 60,120 e 240 minutos

E – C) *albicans* tratada com clorexidina durante 30, 60,120 e 240 minutos. Utilização do teste de Friedman com teste de comparação múltipla de Dunn para os diferentes tempos, onde *a* e *b* denotam ou não significativa diferença.



Fonte: Da autora (2015)

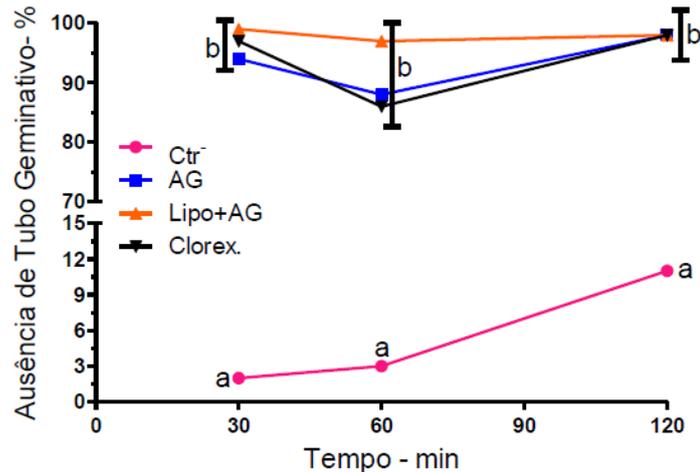
Pela avaliação da ação das nanopartículas de prata, na ausência ou presença de lipossomos, sobre a viabilidade celular pelo método de contagem de células, uma diminuição do crescimento das colônias nos grupos tratados com a prata, tanto lipossomal quanto suspensão, foi evidenciada mostrando a prata como principal agente dessa diminuição. Estudos realizados comprovam que as nanopartículas de prata apresentam toxicidade sobre colônias de *Candida albicans*.

A atividade das nanopartículas de prata em suspensão mostrou uma melhor ação contra as células da espécie estudada do que as nanopartículas de prata incorporadas às vesículas lipossomais. Isso deve-se a uma atuação direta da prata em suspensão sobre a membrana plasmática das células fúngicas, afetando a dinâmica e o potencial da membrana dos fungos, causando uma desestabilização e a ruptura da mesma.

Os grupos de células tratadas com lipossomos vazios e o controle negativo obtiveram uma quantidade de células semelhantes, mostrando que os lipossomos vazios não possuem atividade sobre as células fúngicas, desempenhando apenas a função de carreadores. O grupo controle positivo mostrou que a clorexidina possui ação eficaz sobre a *C. albicans*.

A figura 14 apresenta os resultados obtidos a partir da análise do tubo germinativo. Foi possível identificar que os grupos controle positivo, tratamento com prata e tratamento com lipossomos contendo prata, em 3 diferentes tempos (30, 60 e 120 minutos), apresentaram predominantemente células que não possuíam tubo germinativo e o oposto foi observado no grupo controle negativo, em que a maior parte das células não continham tubo germinativo. O que sugere uma ação inibitória da prata em suas diferentes formulações sobre o mecanismo de transição da forma de leveduras para uma morfologia de pseudo hifa na *C. albicans*. Tal transição é um importante parâmetro dos grupos experimentais testados neste estudo, pois, a forma de pseudo hifas é a que confere a patogenicidade a este fungo.

Figura 14: Avaliação da ausência de tubo germinativo nas células submetidas aos tratamentos com prata em suspensão (Ag), prata lipossomal (Lipo+Ag), água (Ctr-) e clorexidina durante 30,60 e 120 minutos. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença.

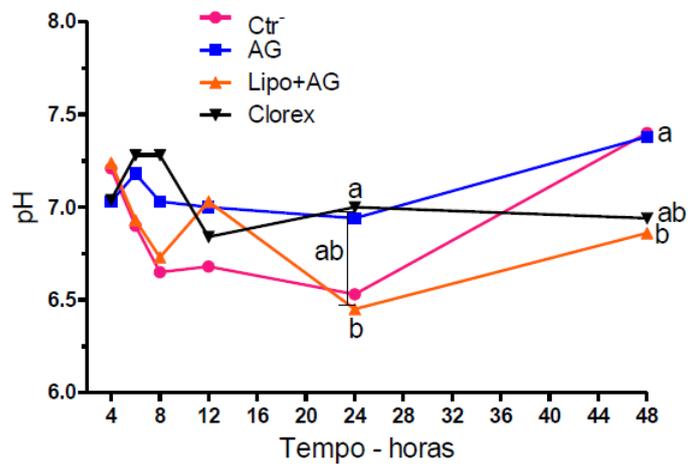


Fonte: Da autora (2015)

Avaliou-se a curva de crescimento da espécie estudada através de 3 parâmetros: pH, absorbância e o consumo de glicose. Observou-se uma diminuição do pH dos grupos controle negativo e lipossomos com prata. Através da figura 15 é possível observar que até o tempo de 24 horas, o grupo tratado com lipossomos que continham as nanopartículas de prata diminuiu o pH do meio para próximo de 6,5, demonstrando uma diferença significativa quando comparado com o grupo controle positivo, já nesse mesmo tempo os grupos tratados com prata e controle negativo não demonstraram diferença estatística significativa quando comparados com os outros grupos. Tal fato pode estar relacionado à queda brusca do consumo de glicose ao longo do tempo destes mesmos grupos, observada na figura 16. Assim, a análise do pH do meio pode estar interligada ao resultado do consumo da glicose pelas células fúngicas, devido à grande parte dos microrganismos consumirem glicose e produzirem metabólitos que acidificam o meio. Observou-se, também, que os grupos controle positivo e nanopartículas de prata em suspensão mantiveram uma média de pH. Porém, esse resultado quando comparado ao consumo de glicose deste mesmo grupo, pode ser reafirmado apenas pelo controle positivo, o

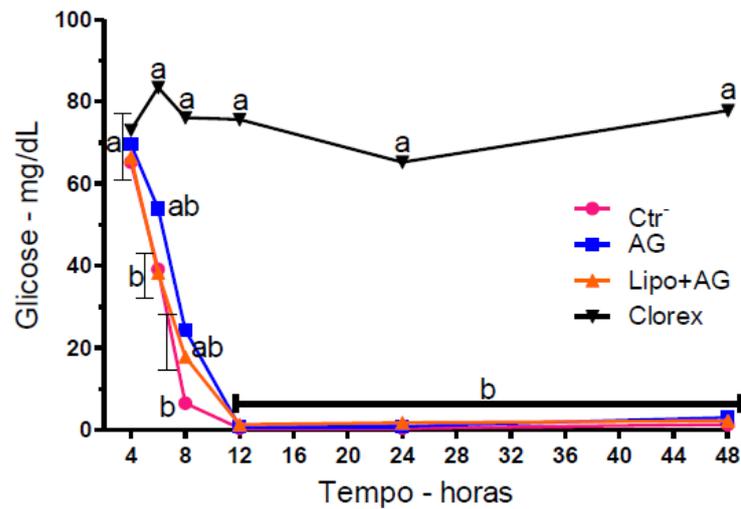
qual manteve uma alta e constante taxa de dosagem da glicose, sugerindo que as células *C. albicans* tenham morrido pelo tratamento e por isso não consumiram a glicose do meio. Já o grupo tratado com nanopartículas de prata demonstrou uma queda na taxa de glicose, indicando o consumo da mesma.

Figura 15: Avaliação das variações do pH das células de *C. albicans* submetidas aos grupos de tratamento de prata em suspensão (AG), prata lipossomal (Lipo+AG), água (Ctr-) e clorexidina durante 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde *a* e *b* denotam ou não significativa diferença.



Fonte: Da autora (2015)

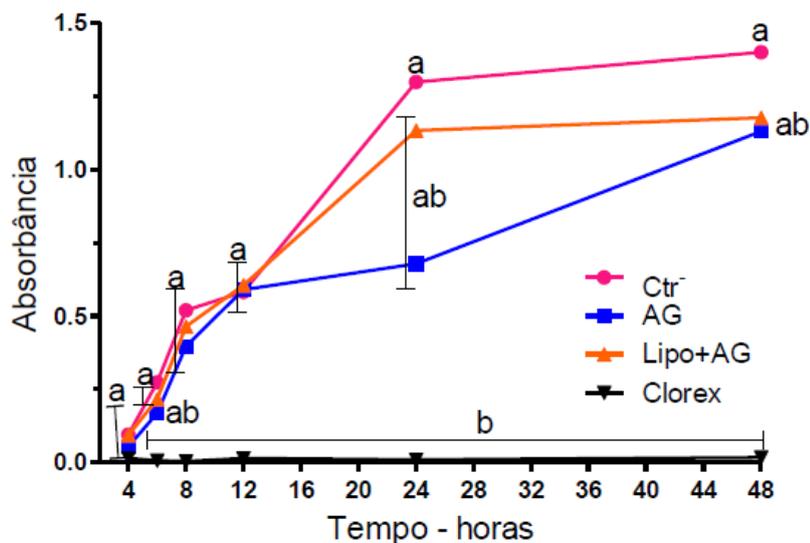
Figura 16: Avaliação do consumo de glicose pelas células de *C. albicans* submetidas aos grupos de tratamento de prata em suspensão (AG), prata lipossomal (Lipo+AG), água (Ctr-) e clorexidina durante 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença.



Fonte: Da autora (2015)

Tais resultados são ratificados através do parâmetro da absorvância, o qual mostra que há um aumento gradativo da absorvância em relação ao tempo das células tratadas com os diferentes grupos, exceto o controle positivo que indicou uma absorvância próxima a zero devido ao não crescimento de células fúngicas, conforme figura 17. Notou-se que houve um maior crescimento no grupo controle negativo, mostrando que os grupos experimentais apresentaram um menor crescimento em relação ao controle. O que demonstra que mesmo tendo ocorrido a expansão de células no meio, esta foi de forma mais lenta do que a apresentada no controle negativo, indicando a prata como causadora de um menor crescimento.

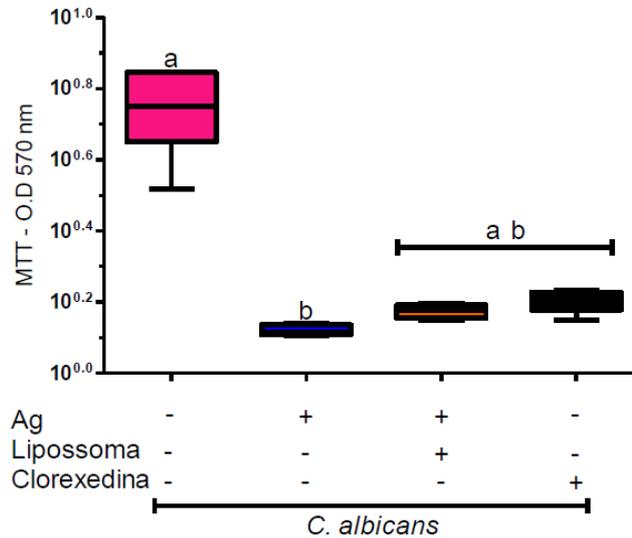
Figura 17: Avaliação da densidade óptica das células de *C. albicans* submetidas aos grupos de tratamento de prata em suspensão (AG), prata lipossomal (Lipo+AG), água (Ctr-) e clorexidina durante 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde *a* e *b* denotam ou não significativa diferença.



Fonte: Da autora (2015)

Empregou-se a técnica do MTT para a realização da viabilidade celular do biofilme. Tal técnica baseia-se na ação de desidrogenases mitocondriais que reduzem o sal MTT (coloração amarela) a um produto chamado “formazan” (coloração violeta). Esta transformação é proporcional à ação das mitocôndrias das células fúngicas, e conseqüentemente, sendo proporcional à viabilidade celular. Através da figura 18, observou-se que no biofilme exposto aos grupos experimentais houve uma diferença significativa entre o grupo de células tratadas com a suspensão de nanopartículas de prata em relação ao controle negativo. Notou-se também uma diferença não significativa microbiológica entre os grupos de prata lipossomal e controle positivo. Identificou-se, então, uma notável ação da prata sobre o biofilme, diminuindo sua viabilidade celular.

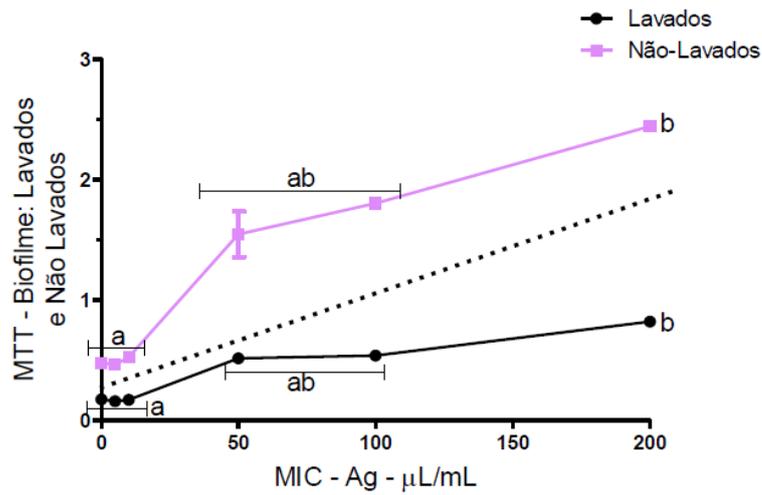
Figura 18: Avaliação da viabilidade das células de *C. albicans* submetidas aos tratamentos com prata em suspensão, prata lipossomal, água e clorexidina através do método do MTT. Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença.



Fonte: Da autora (2015)

Por fim, realizou-se um experimento que avaliou a viabilidade celular de um biofilme formado na presença de diferentes concentrações da suspensão de prata. A figura 19 mostra que houve um aumento da leitura conforme aumentou-se a concentração de suspensão de prata no meio. Isso poderia indicar um estímulo da suspensão de prata para o crescimento das células fúngicas. Porém, isso seria contrário a todos os outros resultados obtidos no trabalho. Tal aumento foi proporcional tanto no grupo de poços lavados quanto no de poços não lavados. Formulou-se, então, a hipótese de que a prata reagiria com o MTT, causando um aumento da leitura e dando resultados falso positivos.

Figura 19: Avaliação da viabilidade celular do biofilme formado na presença da prata em concentrações de 0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  divididos em dois grupos distintos (lavado e não lavado). Utilização do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, onde a e b denotam ou não significativa diferença.



Fonte: Fonte: Da autora (2015)

## 6 CONCLUSÃO

Utilizando a síntese de redução da prata pelo citrato de sódio na presença do surfactante SDS, foi possível obter nanopartículas de prata de tamanhos entre 10 e 50 nm. A caracterização feita por espectroscopia UV-Vis apresentou resultados semelhantes aos vistos na literatura, com bandas de picos de absorbância características da nanopartícula de prata em torno de 400 nm.

O planejamento fatorial  $2^3$  e as análises das superfícies de respostas permitiram identificar uma relação entre as concentrações dos reagentes utilizados na síntese e o tamanho das nanopartículas. Considerou-se dois modelos matemáticos, o primeiro com maior número de variáveis e interações e o segundo modelo utilizou apenas as interações significativas sobre a resposta, com 95% de intervalo de confiança. Os dois modelos apresentaram bons valores de ajustes.

Na determinação de alterações bioenergéticas em *Candida albicans* tratada com nanopartículas de prata, os resultados apresentados permitiram concluir que as nanopartículas de prata tanto em suspensão quanto lipossomal possuem uma característica antifúngica notável, capaz de interferir na curva de crescimento de *C. albicans* e formação de biofilme, constituindo uma possível alternativa futura ao tratamento de candidemias. Quanto à formulação em suspensão, está é mais eficiente que a formulação lipossomal.

## 7 REFERÊNCIAS

- Abid, J.P. et al., 2002. Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (7), pp.792–793.
- Abou El-Nour, K.M.M. et al., 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), pp.135–140.
- Albanese, A., Tang, P.S. & Chan, W.C.W., 2012. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14(1), pp.1–16. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>.
- Araújo, E.A. et al., 2015. Sanitização de cenoura minimamente processada com nanopartículas de prata. *Ciência Rural*, pp.1681–1687. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782015000901681&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000901681&lang=pt).
- Atiyeh, B.S. et al., 2007. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*, 33(2), pp.139–148.
- Bao, Z., Bruening, M.L. & Baker, G.L., 2006. Rapid growth of polymer brushes from immobilized initiators. *Journal of the American Chemical Society*, 128(28), pp.9056–9060.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E., 2001. *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, Available at: <http://books.google.com.br/books?id=FDnT9ygeOccC&pg=PA79&lpg=PA79&dq=como+fazer+experimentos+doi+Neto+barros&source=bl&ots=EGYrSdmUGw&sig=-FFC0dBw0TLT7iIJ0-fhFjtAL6I&hl=pt-BR&sa=X&ei=TPwRVMfKNoayggTyooGADw&ved=0CGkQ6AEwCA#v=onepage&q=como fazer experiment>.
- Brasil, J.L. et al., 2007. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. *Química Nova*, 30(3), pp.548–553.
- Brust, M. et al., 1995. Synthesis and Reactions of Functionalized Gold Nanoparticles.

- Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (16), pp.1655–1656.
- Brust, M. et al., 1994. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 0(7), pp.801–802. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C39940000801>.
- Cammarata, R.C., 1996. *Nanomaterials : Synthesis , Properties and Applications* Edited by A S Edelstein Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia. *Materials Science*, 580.
- Carlson, C. et al., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(43), pp.13608–13619.
- Carpena, D. & Dal, C., 2005. Contribuições ao planejamento de experimentos em projetos de pesquisa de engenharia civil. *Ambiente Construído*, pp.37–49.
- Chen, M. & Nikles, D.E., 2002. Synthesis of spherical FePd and CoPt nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 91(10 I), pp.8477–8479.
- CUNICO, M.W.M. et al., 2008. PLANEJAMENTO FATORIAL: UMA FERRAMENTA ESTATÍSTICA VALIOSA PARA A DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA PESQUISA CIENTÍFICA. *Visão Acadêmica*, 9(1). Available at: <http://revistas.ufpr.br/academica/article/view/14635>.
- Deepak, V. et al., 2011. Synthesis of gold and silver nanoparticles using purified URAK. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), pp.353–358.
- Duan, X. & Li, Y., 2013. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small*, 9(9–10), pp.1521–1532.
- Elsupikhe, R.F. et al., 2015. Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of κ-carrageenan. *Nanoscale Research Letters*, 10(1).
- Erdem, B. et al., 2000. Encapsulation of inorganic particles via miniemulsion polymerization. I. Dispersion of titanium dioxide particles in organic media using OLOA 370 as stabilizer. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 38(24), pp.4419–4430.
- Esteves, A.C. et al., 2005. Polymer encapsulation of CdE (E = S, se) quantum dot ensembles via in-situ radical polymerization in miniemulsion. *J. Nanosci .Nanotechnol*, 5(5), pp.766–771.

- Esteves, A.C.C. et al., 2007. Polymer grafting from CdS quantum dots via AGET ATRP in miniemulsion. *Small*, 3(7), pp.1230–1236.
- Faraday, M., 1857. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147(0), pp.145–181. Available at:  
<http://rstl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstl.1857.0011>.
- FERNANDES, P.É., 2014. Síntese, Caracterização E Ação Antimicrobiana De Nanopartículas De Prata.
- Fievet, F. et al., 1989. Homogeneous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and submicron size metal particles. *Solid State Ionics*, 32–33(PART 1), pp.198–205.
- Fleischhaker, F. & Zentel, R., 2005. Photonic crystals from core-shell colloids with incorporated highly fluorescent quantum dots. *Chemistry of Materials*, 17(6), pp.1346–1351.
- Ganaie, S.U., Abbasi, T. & Abbasi, S.A., 2015. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using an Otherwise Worthless Weed Mimosa ( *Mimosa pudica* ): Feasibility and Process Development Toward Shape/Size Control. *Particulate Science and Technology*, 33(6), pp.638–644. Available at:  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02726351.2015.1016644>.
- Garcia, M.V.D., 2011. Síntese , caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. *Universidade Estadual de Campinas, Campinas*, p.77.
- GIBELLI, I.C., 2012. Ação Antibacteriana de Nanopartículas de Prata em Poli ( ácido láctico ) – PLA e estudo da Biodegradação. , p.62.
- Gole, A., Sainkar, S.R. & Sastry, M., 2000. Electrostatically controlled organization of carboxylic acid derivatized colloidal silver particles on amine-terminated self-assembled monolayers. *Chemistry of Materials*, 12(5), pp.1234–1239.
- Gómez Villarraga, F., 1857. Nanopartículas Metálicas Y Sus Aplicaciones. *Revista Digita Innovación y Ciencia*. Available at:  
[https://innovacionyciencia.com/documentos/nanoparticulas\\_metalicas\\_y\\_sus\\_aplicaciones.pdf](https://innovacionyciencia.com/documentos/nanoparticulas_metalicas_y_sus_aplicaciones.pdf).
- Gupta, A.K. et al., 2003. Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2(4), pp.255–261.

- Gurav, A.S. et al., 1994. Generation of nanometer-size fullerene particles via vapor condensation. *Chemical Physics Letters*, 218(4), pp.304–308.
- Gurunathan, S. et al., 2009. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 30(31), pp.6341–6350. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.008>.
- Guzmán, M.G., Dille, J. & Godet, S., 2008. *Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity*, Available at: <http://www.waset.ac.nz/journals/ijcbe/v2/v2-3-21.pdf>.
- Hambrock, J. et al., 2002. A non-aqueous organometallic route to highly monodispersed copper nanoparticles using [Cu(OCH(Me)CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]. *Chemical Communications*, 1(1), pp.68–69. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b108797e>.
- He, R. et al., 2002. Preparation of polychrome silver nanoparticles in different solvents. *Journal of Materials Chemistry*, 12(12), pp.3783–3786. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b205214h>.
- Henglein, A., 1993. Physicochemical properties of small metal particles in solution: “Microelectrode” reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. *Journal of Physical Chemistry*, 97(21), pp.5457–5471.
- Hosseinpour-Mashkani, S.M. & Ramezani, M., 2014. Silver and silver oxide nanoparticles: Synthesis and characterization by thermal decomposition. *Materials Letters*, 130.
- Huang, X. et al., 2007. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine (London, England)*, 2(5), pp.681–693.
- Hulteen, J.C. et al., 1999. Nanosphere lithography: Size-tunable silver nanoparticle and surface cluster arrays. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(19), pp.3854–3863.
- Hyeon, T. et al., 2001. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *Journal of the American Chemical Society*, 123(51), pp.12798–12801.
- Jain, P.K., Qian, W. & El-Sayed, M.A., 2006. Ultrafast cooling of photoexcited electrons in gold nanoparticle-thiolated DNA conjugates involves the dissociation of the gold-thiol bond. *Journal of the American Chemical Society*, 128(7), pp.2426–2433.

- Jana, N.R., Chen, Y.F. & Peng, X.G., 2004. Size- and shape-controlled magnetic (Cr, Mn, Fe, Co, Ni) oxide nanocrystals via a simple and general approach. *Chemistry of Materials*, 16(20), pp.3931–3935.
- Jana, N.R., Gearheart, L. & Murphy, C.J., 2001. Seeding growth for size control of 5–40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir*, 17(22), pp.6782–6786.
- Jana, N.R. & Peng, X., 2003. Single-Phase and Gram-Scale Routes toward Nearly Monodisperse Au and Other Noble Metal Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 125(47), pp.14280–14281.
- Jhuang, Y.Y. & Cheng, W.T., 2016. Fabrication and characterization of silver/titanium dioxide composite nanoparticles in ethylene glycol with alkaline solution through sonochemical process. *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, pp.327–333.
- Jiang, G.Q. et al., 2007. Signal enhancement and tuning of surface plasmon resonance in Au nanoparticle/polyelectrolyte ultrathin films. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(50), pp.18687–18694.
- Jo, D.H. et al., 2015. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(7), pp.1603–1611.
- Joo, J. et al., 2003. Generalized and facile synthesis of semiconducting metal sulfide nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 125(36), pp.11100–11105.
- Joumaa, N. et al., 2006. Synthesis of quantum dot-tagged submicrometer polystyrene particles by miniemulsion polymerization. *Langmuir*, 22(4), pp.1810–1816.
- Kelly, K.L. et al., 2003. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(3), pp.668–677. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp026731y>.
- Kim, E.K. et al., 2009. Effects of silica nanoparticle and GPTMS addition on TEOS-based stone consolidants. *Journal of Cultural Heritage*, 10(2), pp.214–221.
- Klabunde, K.J. & Richards, R., 2001. *Nanoscale Materials in Chemistry*,
- Kmis, F.E., Fissan, H. & Rellinghaus, B., 2000. Sintering and evaporation characteristics of gas-phase synthesis of size-selected PbS nanoparticles. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 69, pp.329–334.

- Koole, R. et al., 2008. On the incorporation mechanism of hydrophobic quantum dots in silica spheres by a reverse microemulsion method. *Chemistry of Materials*, 20(7), pp.2503–2512.
- Kreibig, U. & Vollmer, M., 1995. *Optical Properties of Metal Clusters*, Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b304116f>.
- Leung, A.B., Suh, K.I. & Ansari, R.R., 2006. Particle-size and velocity measurements in flowing conditions using dynamic light scattering. *Applied Optics*, 45(10), p.2186. Available at: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ao-45-10-2186>.
- De Lima, T.H., 2011. Dissertação de Mestrado Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata.
- Lin, P.C. et al., 2014. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), pp.711–726.
- Link, S. & El-Sayed, M.A., 2003. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry*, 54(1), pp.331–366. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103759>  
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103759>.
- Liz-Marzán, L.M., 2006. Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir*, 22(1), pp.32–41.
- Lu, A.H., Salabas, E.L. & Schüth, F., 2007. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(8), pp.1222–1244.
- M.Raffi, F.Hussain, T.M.Bhatti, J.I.Akhter, A.H. and M.M.H., 2008. Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against E.coli ATCC-15224. *J. Mater. Sci. Technol.*, 24(2), pp.192–196.
- Mafune, F. et al., 2000. Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(39), pp.9111–9117.
- Magnusson, M.H. et al., 1999. Size-selected gold nanoparticles by aerosol technology. *Nanostructured Materials*, 12(1), pp.45–48.
- Malik, M.A., O'Brien, P. & Revaprasadu, N., 2002. A simple route to the synthesis of core/shell nanoparticles of chalcogenides. *Chemistry of Materials*, 14(5),

pp.2004–2010.

- Mallick, K., Witcomb, M.J. & Scurrall, M.S., 2004. Polymer stabilized silver nanoparticles: A photochemical synthesis route. *Journal of Materials Science*, 39(14), pp.4459–4463. Available at: <http://link.springer.com/10.1023/B:JMISC.0000034138.80116.50>.
- Martins, M.A. et al., 2007. Biofunctionalized ferromagnetic CoPt<sub>3</sub>/polymer nanocomposites. *Nanotechnology*, 18(21).
- Martins, M.A. & Trindade, T., 2012. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. *Quimica Nova*, 35(7), pp.1434–1446.
- Marutani, E. et al., 2004. Surface-initiated atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate on magnetite nanoparticles. *Polymer*, 45(7), pp.2231–2235. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386104001235>.
- Marzán, L.L. & Philipse, A.P., 1994. Synthesis of platinum nanoparticles in aqueous host dispersions of inorganic (imogolite) rods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 90(1), pp.95–109.
- Mcdonnell, G. & Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), pp.147–179.
- Melo, M.A. et al., 2012. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Quimica Nova*, 35(9), pp.1872–1878.
- Morones, J.R. et al., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), pp.2346–2353. Available at: <http://stacks.iop.org/0957-4484/16/i=10/a=059?key=crossref.e77be5b8bed6ecad694ec81776ef56fe>.
- Mulfinger, L. et al., 2007a. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84(2), pp.322–325. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/ed084p322%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1021/ed084p322%5Cnhttp://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p322>.
- Mulfinger, L. et al., 2007b. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84(2), pp.322–325.
- Murdock, R.C. et al., 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences*, 101(2), pp.239–253.
- Murray, C.B., Norris, D.J. & Bawendi, M.G., 1993. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites.

- Journal of the American Chemical Society*, 115(19), pp.8706–8715.
- NETO, E.A.B., RIBEIRO, C. & ZUCOLOTTO, V., 2008. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. *Comunicado Técnico Embrapa Instrumentação*, 99, pp.1–4. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR2008131734>.
- Noginov, M.A. et al., 2007. The effect of gain and absorption on surface plasmons in metal nanoparticles. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 86(3), pp.455–460.
- Nouailhat, A., 2010. *An introduction to nanoscience and nanotechnology*,
- Ohno, K. et al., 2005. Synthesis of monodisperse silica particles coated with well-defined, high-density polymer brushes by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Macromolecules*, 38(6), pp.2137–2142.
- Panáček, a et al., 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, 30(31), pp.6333–6340. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19698988>.
- Park, J. et al., 2007. Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(25), pp.4630–4660.
- Park, J. et al., 2004. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Materials*, 3(12), pp.891–895.
- PERALTA-ZAMORA, P., MORAIS, J.L. DE & NAGATA, N., 2005. Por que otimização multivariada? *Engenharia Sanitaria Ambiental*, 10(2), pp.106–110.
- PEREIRA FILHO, E.R., 2015. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. *EdUFSCar*, p.88p.
- Peres, M. et al., 2005. A green-emitting CdSe/poly(butyl acrylate) nanocomposite. *Nanotechnology*, 16(9), pp.1969–1973.
- Perrault, S.D. & Chan, W.C.W., 2009. Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), pp.17042–17043.
- Pleus, R.C., 2011. Guidance on physicochemical characterization for manufacture nano-objects submitted for toxicological testing. In *Proceedings of the IEEE Conference on Nanotechnology*. pp. 20–21.
- Pluym, T.C. et al., 1993. Solid silver particle production by spray pyrolysis. *Journal of Aerosol Science*, 24(3), pp.383–392.
- Sastry, M., Mayya, K.S. & Bandyopadhyay, K., 1997. pH Dependent changes in the optical properties of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles. *Colloids*

- and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 127(1–3), pp.221–228.
- Schierholz, J.M., Beuth, J. & Pulverer, G., 1999. Silver coating of medical devices for catheter-associated infections? [3]. *American Journal of Medicine*, 107(1), pp.101–102.
- Schmidt-Ott, A., 1988. New approaches to in situ characterization of ultrafine agglomerates. *Journal of Aerosol Science*, 19(5).
- Selvan, S.T. et al., 2007. Synthesis of silica-coated semiconductor and magnetic quantum dots and their use in the imaging of live cells. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(14), pp.2448–2452.
- Seo, W.S. et al., 2003. Preparation and optical properties of highly crystalline, colloidal, and size-controlled indium oxide nanoparticles. *Advanced Materials*, 15(10), pp.795–797. Available at:  
[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/adma.200304568/asset/795\\_ftp.pdf?v=1&t=gqdrzoz&s=75e81d2a19513c5ae8494a4ad0ede06e91362930](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/adma.200304568/asset/795_ftp.pdf?v=1&t=gqdrzoz&s=75e81d2a19513c5ae8494a4ad0ede06e91362930).
- Sergeev, G.B. et al., 1999. Cryosynthesis and properties of metal-organic nanomaterials. *Nanostructured Materials*, 12(5), pp.1113–1116.
- Shameli, K. et al., 2010. Synthesis of silver/montmorillonite nanocomposites using  $\gamma$ -irradiation. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), pp.1067–1077.
- Shevchenko, E. V et al., 2002. Colloidal Synthesis and Self-Assembly of CoPt<sub>3</sub> Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(38), pp.11480–11485.
- Sifontes, Á.B. et al., 2010. Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes. *Química Nova*, 33(6), pp.1266–1269.
- Sill, K. & Emrick, T., 2004. Nitroxide-Mediated Radical Polymerization from CdSe Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 16(7), pp.1240–1243. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1021/cm035077b%5Cnhttp://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/cm035077b>.
- Skaff, H. & Emrick, T., 2004. Reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization from unprotected cadmium selenide nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(40), pp.5383–5386.
- Soon, G.K. et al., 2007. Kinetics of monodisperse iron oxide nanocrystal formation by “heating-up” process. *Journal of the American Chemical Society*, 129(41), pp.12571–12584.
- Sriram, M.I. et al., 2010. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton’s

- lymphoma ascites tumor model. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), pp.753–762.
- Staquicini, F.I. et al., 2011. Systemic combinatorial peptide selection yields a non-canonical iron-mimicry mechanism for targeting tumors in a mouse model of human glioblastoma. *Journal of Clinical Investigation*, 121(1), pp.161–173.
- Sun, S. & Zeng, H., 2002. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, (31), pp.8204–8205. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja026501x>.
- Talapin, D. V. et al., 2001. Highly Luminescent Monodisperse CdSe and CdSe/ZnS Nanocrystals Synthesized in a Hexadecylamine-Trioctylphosphine Oxide-Trioctylphosphine Mixture. *Nano Letters*, 1(4), pp.207–211.
- Taleb, a, Petit, C. & Pileni, M.P., 1998. Optical properties of self-assembled 2D and 3D superlattices of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem B*, 102(12), pp.2214–2220. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp972807s%5Cnpapers2://publication/uuid/2178563E-6702-4D6F-A4CB-2FBDD2312CBC>.
- Talebi, J., Halladj, R. & Askari, S., 2010. Sonochemical synthesis of silver nanoparticles in Y-zeolite substrate. *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE*, 45(12), pp.3318–3324.
- Tao, A., Sinsermsuksakul, P. & Yang, P., 2006. Polyhedral silver nanocrystals with distinct scattering signatures. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(28), pp.4597–4601.
- Teng, X. & Yang, H., 2004. Effects of surfactants and synthetic conditions on the sizes and self-assembly of monodisperse iron oxide nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 14(4), pp.774–779. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b311610g>.
- Tiarks, F., Landfester, K. & Antonietti, M., 2001. Silica nanoparticles as surfactants and fillers for latexes made by miniemulsion polymerization. *Langmuir*, 17(19), pp.5775–5780.
- Tomaszewska, E. et al., 2013. Detection limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids. *Journal of Nanomaterials*, 2013.
- Tsuji, M. et al., 2005. Microwave-assisted synthesis of metallic nanostructures in solution. *Chemistry - A European Journal*, 11(2), pp.440–452.

- Underwood, S. & Mulvaney, P., 1994. Effect of the Solution Refractive Index on the Color of Gold Colloids. *Langmuir*, 10(10), pp.3427–3430.
- Ung, T., Liz-Marzán, L.M. & Mulvaney, P., 2002. Gold nanoparticle thin films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 202(2–3), pp.119–126.
- Wei, Q.H. et al., 2004. Plasmon resonance of finite one-dimensional Au nanoparticle chains. *Nano Letters*, 4(6), pp.1067–1071.
- Wiley, B. et al., 2005. Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chemistry-a European Journal*, 11(2), pp.454–463.
- Wong, K.K.Y. et al., 2009. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem*, 4(7), pp.1129–1135.
- Wuithschick, M. et al., 2015. Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano*, 9(7), pp.7052–7071.
- Yamamoto, M. & Nakamoto, M., 2003. Novel preparation of monodispersed silver nanoparticles via amine adducts derived from insoluble silver myristate in tertiary alkylamine. *Journal of Materials Chemistry*, 13, p.2064.
- Yu, W.W. et al., 2004. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chemical Communications*, (20), p.2306. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b409601k>.
- Zarbin, A.J.G., 2007. (Nano) materials chemistry. *Quimica Nova*, 30, pp.1469–1479.
- Zhang, Q. et al., 2011. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: Is citrate a “magic” reagent? *Journal of the American Chemical Society*, 133(46), pp.18931–18939.
- Zhu, J.J. et al., 2001. Preparation of silver nanorods by electrochemical methods. *Materials Letters*, 49(2), pp.91–95.
- Zodrow, K. et al., 2009. Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. *Water Research*, 43(3), pp.715–723.