

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA –
COEBB
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

MATHEUS FELIPE CELESTINO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
DETERMINAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2019

MATHEUS FELIPE CELESTINO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
DETERMINAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção do título de “Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia” pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Toledo.

Orientador: Prof. Dr. Renato Eising.

TOLEDO

2019

MATHEUS FELIPE CELESTINO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
DETERMINAÇÃO DA SUA ATIVIDADE BACTERICIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no dia 12/12/2019 como requisito à obtenção do título de bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo, à seguinte comissão examinadora:

Prof. Dr. Cleverson Busso

Membro

UTFPR – Toledo

Prof. Dr. Fabiano Bisinella Scheufele

Membro

UTFPR – Toledo

Prof. Dr. Renato Eising

Orientador

UTFPR – Toledo

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado, guiado e guardado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus maiores exemplos, meus pais, Márcio e Juliana, pelo amor incondicional, pelos incentivos, pela educação que me deram e por todo apoio.

Às minhas irmãs, Mariana e Manuela, por toda ajuda, carinho e brincadeiras ao longo desses anos e a toda minha família que sempre esteve comigo nos bons e maus momentos. Obrigado por toda confiança depositada, por todo amparo e amor que sempre tiveram por mim.

A todos os professores que passaram pela minha vida. Professor(a), a sua profissão é a única que torna todas as outras possíveis.

A todo colegiado de EBB, em especial ao meu orientador Prof, Dr. Renato Eising pelos anos de ensino e por toda paciência comigo.

Aos meus amigos que de alguma forma contribuíram para esse momento. Vocês são muito importantes para mim.

RESUMO

Uma das principais questões da sociedade moderna atualmente é a busca por novas formas de combate às bactérias patogênicas responsáveis por uma vasta gama de enfermidades. Essas bactérias são altamente mutáveis e a cada dia se tornam mais resistentes aos antibióticos, que, por sua vez, estão cada vez mais limitados e com difícil e demorado desenvolvimento. Neste trabalho, sabendo da existência das propriedades antimicrobianas da prata, buscou-se sintetizar, caracterizar e avaliar os efeitos das nanopartículas de prata (Ag-NPs) em cultivos bacterianos visando aplicações principalmente em filmes/blendas poliméricas e superfícies. A síntese das Ag-NPs foi realizada através do método químico de redução utilizando nitrato de prata (AgNO_3) como sal precursor, boroidreto de sódio (NaBH_4) como sal redutor e carboximetilcelulose (CMC) como agente estabilizante. Para determinar as concentrações ideais de cada reagente utilizou-se o planejamento fatorial e a superfície de resposta obtida após a espectrometria UV-Vis de cada amostra. Utilizou-se também a espectrometria UV-Vis e microscopia de transmissão eletrônica (TEM) para se caracterizar as Ag-NPs sintetizadas no ponto ótimo (CMC: 0,07% (m/v); NaBH_4 : $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; e AgNO_3 : $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) obtendo-se varreduras da banda plasmon de superfície (BPS), dispersão e diâmetro das Ag-NPs – $2,01 \pm 0,54 \text{ nm}$. Nos testes microbiológicos realizou-se a difusão em placa para determinar elementos qualitativos (comprovação e eficácia do efeito antimicrobiano) e a microdiluição em placa e o *spot test* para elementos quantitativos (determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) respectivamente). As concentrações obtidas foram: *Clostridium perfringens*: CIM = $0,0149 \mu\text{g mL}^{-1}$, CBM = $0,0149 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Staphylococcus aureus*: CIM = $0,0299 \mu\text{g mL}^{-1}$, CBM = $0,0299 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Escherichia coli*: CIM = $0,0149 \mu\text{g mL}^{-1}$, CBM = $0,0299 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Pseudomonas aeruginosa*: CIM = $0,0299 \mu\text{g mL}^{-1}$, CBM = $0,0299 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados demonstraram os efeitos das Ag-NPs contra bactérias com diferentes complexos macromoleculares na parede celular verificando-se um elevado potencial de aplicação e trabalhos futuros, pois as Ag-NPs não somente foram capazes de inibir/eliminar a *C. perfringens*, *E. coli*, e *S. aureus* em concentrações similares às da ampicilina (um antibiótico comumente utilizado no controle microbiológico), mas como também foram eficazes contra a *P. aeruginosa* – uma bactéria ampicilina resistente.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata; Síntese *Top-down*; Efeito antimicrobiano; Concentração Inibitória Mínima; Concentração Bactericida Mínima.

ABSTRACT

One of modern society's main issues is the search for new ways to combat pathogenic bacteria responsible for a range of diseases. These bacteria are highly mutable and increasingly resistant to antibiotics, that are increasingly limited and difficult and slow to develop. In this work, knowing the existence of silver's antimicrobial properties, searched to synthesize, characterize and evaluate the effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) on bacterial cultures aiming at applications mainly on polymeric films / blends and surfaces. The synthesis of Ag-NPs was performed using the chemical reduction method using silver nitrate (AgNO_3) as precursor salt, sodium borohydride (NaBH_4) as reducing salt and carboxymethylcellulose (CMC) as stabilizing agent. To determine the optimal concentrations of each reagent, were used the factorial design and response surface obtained after UV-vis spectroscopy of each sample. UV-Vis spectrometry and electron transmission microscopy (TEM) were used to characterize Ag-NPs optimally synthesized (CMC: 0,07% (m/v); NaBH_4 : $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; e AgNO_3 : $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) by obtaining surface plasmon band (BPS) scans, dispersion and Ag-NPs's diameter - $2.01 \pm 0.54 \text{ nm}$. In microbiological tests, diffusion plaque test was used to determine qualitative elements (evidence of antibacterial effect and effectiveness) and microdilution plaque and spot test for quantitative elements (determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) respectively). The concentrations obtained were: *Clostridium perfringens*: MIC = $0.0149 \mu\text{g mL}^{-1}$, MBC = $0.0149 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Staphylococcus aureus*: MIC = $0.0299 \mu\text{g mL}^{-1}$, MBC = $0.0299 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Escherichia coli*: MIC = $0.0149 \mu\text{g mL}^{-1}$, MBC = $0.0299 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Pseudomonas aeruginosa*: MIC = $0.0299 \mu\text{g mL}^{-1}$, MBC = $0.0299 \mu\text{g mL}^{-1}$. These results demonstrated the effects of Ag-NPs against the effects with different macromolecular complexes on the cell wall, with a high potential for application and future work, as Ag-NPs were not only able to inhibit / remove *C. perfringens*, *E. coli*, and *S. aureus* in similars ampicillin's concentracions (an antibiotic commonly used without microbiological control), but were also used against *P. aeruginosa* - an ampicillin resistant bacterium

Keywords: Silver nanoparticles; Top-down synthesis; Antimicrobial effect; Minimum Inhibitory Concentration; Minimum Bactericidal Concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A Taça Lycurgus iluminada por fora (esquerda; verde) e por dentro (direita; vermelha).....	16
Figura 2. Tigela de lustre policromado com esmaltes nanotecnológicos.....	17
Figura 3. Esquerda: roseta do transepto norte. Centro: Roseta da fachada ocidental. Direita: roseta do transepto sul	18
Figura 4. Técnicas de síntese de nanopartículas através do método físico.	24
Figura 5. Técnicas de síntese de nanopartículas através do método químico.	25
Figura 6. A convergência das técnicas “top-down” e “bottom-up” no processo de síntese de NPs.....	26
Figura 7. Representação dos métodos de estabilização utilizados para NPs (a) método eletrostático, (b) método estérico e (c) método eletroestérico.	27
Figura 8. Oscilação plasmon em decorrência de uma excitação eletromagnética.....	28
Figura 9. Quadro de classificação dos toxiotipos de <i>Clostridium perfringens</i>	31
Figura 10. Disposição das bactérias e controles realizados no teste de microdiluição em placa.....	41
Figura 11. Parâmetros medidos nas varreduras UV-Vis das amostras de Ag-NPs sintetizadas conforme o planejamento fatorial (Apêndice 1)	42
Figura 12. Superfície de resposta obtida em função das concentrações de NaBH ₄ e CMC utilizadas no planejamento fatorial para determinação das condições ideais para síntese de Ag-NPs.	44
Figura 13. Varredura UV-Vis da amostra de Ag-NPs otimizada sintetizada - 0,07% (m/v) CMC; 3,5 x 10 ⁻⁴ AgNO ₃ ; 6,0 x 10 ⁻³ NaBH ₄	45
Figura 14. Caracterização do formato e tamanhos das nanopartículas de prata (Ag-NPs) a partir da observação do deslocamento da banda plasmon de superfície (BPS) em relação ao comprimento de onda absorvido onde a absorbância é máxima (A _{máx}).	46
Figura 15. Micrografia MET da amostra de Ag-NPs sintetizadas no ponto estacionário - 0,07% (m/v) CMC; 3,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de AgNO ₃ ; 6,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de NaBH ₄	47
Figura 16. Histograma de distribuição de tamanhos da amostra de Ag-NPs sintetizadas no ponto estacionário - 0,07% (m/v) CMC; 3,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de AgNO ₃ ; 6,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de NaBH ₄	47
Figura 17. Teste de difusão para <i>Clostridium perfringens</i> (A), <i>Staphylococcus aureus</i> (B), <i>Escherichia coli</i> (C) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (D) e respectivas diluições das Ag-NPs em porcentagem.....	49

Figura 18. Microdiluição em placa para determinação da CIM para <i>Escherichia coli</i> (em triplicata nas linhas A, B e C) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (em triplicata nas linhas D, E e F).....	50
Figura 19. Microdiluição em placa para determinação da CIM para <i>Clostridium perfringens</i> (em triplicata nas linhas A, B e C) e <i>Staphylococcus aureus</i> (em triplicata nas linhas D, E e F).....	51
Figura 20. <i>Spot test</i> para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para <i>Clostridium perfringens</i> (A), <i>Staphylococcus aureus</i> (B), <i>Escherichia coli</i> (C) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (D).	53
Figura 21. Varreduras UV-Vis das amostras de Ag-NPs sintetizadas conforme o planejamento fatorial. Amostra (a): 0,0775% de CMC e $7,625 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ ; (b): 0,028% de CMC e $7,625 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ ; (c): 0,028% de CMC e $2,875 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ ; (d): 0,0775% de CMC e $2,875 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ . (e): 0,055% de CMC e 10×10^{-3} mol/L de NaBH ₄ . (f): 0,055% de CMC e $0,5 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ . (g): 0,1% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ . (h): 0,01% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ . (i) 0,055% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ . (j) 0,055% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ . (k) 0,055% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄ . (l) 0,055% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH ₄	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variedade e especificações de aplicações da nanociência e nanotecnologia de acordo com o setor empregado.	19
Tabela 2. Níveis e concentrações finais dos fatores CMC, NaBH ₄ e AgNO ₃ do design experimental do sistema.	36
Tabela 3. Concentrações individuais dos reagentes em cada um dos 12 experimentos.	36
Tabela 4. Medidas dos halos formados a partir do teste de susceptibilidade de acordo com a respectiva diluição/ concentração de Ag ⁰	48
Tabela 5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanopartículas de prata (Ag-NPs) e ampicilina para <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Tabela 6. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanopartículas de prata (Ag-NPs) em porcentagem e µg/mL para <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ag⁺ – Íons de prata
- Ag-NPs – Nanopartículas de Prata
- Ag – Prata
- AgNO₃ – Nitrato de Prata
- APS – Sociedade Americana de Física
- Au-NPs – Nanopartículas de ouro
- Au – Ouro
- C. perfringens* – *Clostridium perfringens*
- Ca²⁺ – Íons de cálcio
- CBM – Concentração Bactericida Mínima
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CMC – Carboximetilcelulose
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CPI – Inventário de Produtos de Consumo de Nanotecnologia
- E. coli* – *Escherichia coli*
- Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FioCruz – Fundação Oswaldo Cruz
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade industrial
- LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)
- M-NPs – nanopartículas metálicas
- MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia
- NaBH₄ – Boroidreto de Sódio
- Ni – Níquel
- NPs – Nanopartículas
- P.A. – Pureza analítica
- P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*
- PEM – Projeto sobre Nanotecnologias Emergentes
- S. aureus* – *Staphylococcus aureus*
- SisNano – Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia
- BPS – Banda plasmon de superfície
- UFC – Unidades Formadoras de Colônias
- Xe – Xenônio
- Zn²⁺ – Íons de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA.....	16
2.2 NANOTECNOLOGIA NO BRASIL	21
2.3 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	22
2.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA: SÍNTESE.....	23
2.5 NANOPARTÍCULAS DE PRATA: CARACTERIZAÇÃO	28
2.6 NANOTOXICIDADE CONTRA MICRO-ORGANISMOS.....	29
2.7 TESTES PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO	30
3. JUSTIFICATIVAS	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 GERAL	34
4.2 ESPECÍFICOS.....	34
5. MATERIAIS	35
5.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	35
5.2 LINHAGENS BACTERIANAS.....	35
5.3 TESTES ANTIBACTERIANOS.....	35
6. METODOLOGIA	36
6.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	36
6.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA OTIMIZADAS	38
6.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA OTIMIZADAS	38
6.3.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS	38
6.2.1 MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÔNICA	38
6.3 INÓCULOS BACTERIANOS	39
6.4 TESTE DE DIFUSÃO EM PLACA.....	39

6.5	TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA.....	40
	<i>SPOT TEST</i>	41
7	RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
7.1	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	42
7.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA OTIMIZADAS	45
7.3	TESTE DE DIFUSÃO EM PLACA.....	48
7.4	TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA.....	50
7.5	<i>SPOT TEST</i>	52
	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE 1	63

1. INTRODUÇÃO

Definida como a manipulação e aplicação de objetos e materiais que tenham ao menos uma de suas dimensões na ordem de um bilionésimo de metro, 10^{-9} , a nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar capaz de atravessar todas as fronteiras do conhecimento da física, biologia, química, engenharia e demais áreas (RAI, 2013).

Atualmente, juntamente com a tecnologia da informação, é o campo que mais tem contribuído para o desenvolvimento do conhecimento científico (BATISTA et al., 2010) fato resultante da descoberta de propriedades intrínsecas magnéticas, ópticas, eletrônicas, químicas e mecânicas que surgem com a manipulação de materiais em nanoescala, ou nanopartículas (NPs).

Essas propriedades permitem o desenvolvimento de novas técnicas e objetos e aplicação das nanopartículas em diversos setores: fabricação de dispositivos eletrônicos, aditivos alimentares, cosméticos, fármacos, tecidos, imagem em diagnósticos, dentre outros (BATISTA et al., 2010).

Para documentar a comercialização e a distribuição de produtos nano-habilitados no mercado comercial, o “Centro Internacional de Pesquisadores Woodrow Wilson” e o “Projeto sobre Nanotecnologias Emergentes” (PEN) criaram o Inventário de Produtos de Consumo de Nanotecnologia (CPI) em 2005. A lista que em 2005 contava com 54 itens (VANCE et al., 2015), atualmente, 2019, existem 1833 catalogados, destacando-se os produtos que utilizam a prata como nanomaterial que correspondem a 25% do total (ESTADOS UNIDOS, 2019).

A pesquisa e aplicação das nanopartículas de prata (Ag-NPs) em muito se devem às diferenças importantes de comportamento, propriedades e reatividade das partículas em escala nanométrica e as partículas macroscópicas, denominadas *bulk* (BALLOTTIN, 2014; FURLANETTO, 2014).

Em virtude das notáveis características as Ag-NPs possuem uma vasta gama de possibilidades de aplicações, mas os setores que mais se beneficiam das propriedades das Ag-NPs são os relacionados à saúde e higiene devido ao seu caráter antimicrobiano. Esse material é capaz de combater diversos micro-organismos patogênicos e por isso vem sendo incorporado em diferentes produtos na área médico-hospitalar como roupas, recipientes, aparelhos de ar condicionado, cateteres e até próteses (ALMEIDA et al., 2015).

Neste contexto, o presente trabalho propõe sintetizar Ag-NPs através do método químico de redução de um sal metálico tomando um polímero como estabilizante. Após a síntese,

caracterizar as NPs e avaliar a respectiva atividade antimicrobiana podendo assim relacionar as variáveis de síntese e o efeito antimicrobiano obtido visando aplicação como um método alternativo ao combate de micro-organismos patogênicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

O prefixo “nano” (do grego “anão”) é utilizado para expressar a bilionésima parte de um todo, ou seja, da ordem de 10^{-9} . Ao se aplicar esse prefixo a concepção de ciência e tecnologia ganham novas perspectivas podendo-se explicar da seguinte forma:

Os termos nanociências e nanotecnologias se referem, respectivamente, ao estudo e às aplicações tecnológicas de objetos e dispositivos que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas menores que, ou da ordem de, algumas dezenas de nanômetros. Nano (do grego “anão”) é um prefixo usado nas ciências para designar uma parte em um bilhão e, assim, um nanômetro (1nm) corresponde a um bilionésimo de um metro [...] “Nano”, portanto, é uma medida e não um objeto. (LÊDO, 2006, p. 1)

Os estudos e aplicações da nanotecnologia podem ser divididas em duas fases: pré-moderna e moderna. Na era pré-moderna os materiais nanoestruturados baseavam-se na compreensão empírica dos artesãos que em muitos casos utilizavam altas temperaturas para proceder com a produção de materiais com tal propriedade. Um dos sistemas nanoestruturados mais antigos é a *Taça de Lycurdus*, datada do século IV d.C. e que se encontra presente no acervo do *British Museum* (Londres). Essa taça é um exemplo de um tipo especial de vidro, conhecido como vidro dicróico, que muda de cor conforme sua composição e a incidência da luz no material. Neste caso a análise do vidro revelou a presença de nanocristais metálicos de prata (Ag) e ouro (Au) com uma relação molar de 14:1, que confere propriedades ópticas incomuns apresentadas na Figura 1. (ESTADOS UNIDOS, 2016; LOPES, 2017)

Figura 1. A Taça Lycurgus iluminada por fora (esquerda; verde) e por dentro (direita; vermelha).



Fonte: ESTADOS UNIDOS, 2016.

Outros exemplos da nanotecnologia pré-moderna são os esmaltes cerâmicos e os vitrais. Os esmaltes, constituídos principalmente de prata e cobre, foram utilizados entre os séculos IX e XVII no mundo islâmico para conferir brilho às cerâmicas – Figura 2. (ESTADOS UNIDOS, 2016)

Figura 2. Tigela de lustre policromado com esmaltes nanotecnológicos.

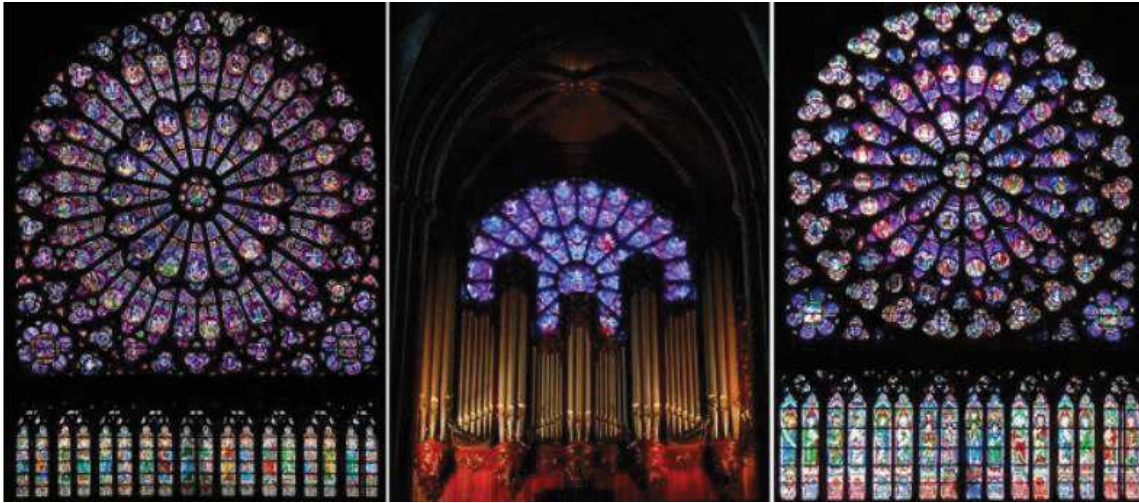


Fonte: ESTADOS UNIDOS, 2016.

Já os vitrais, tão famosos nas catedrais europeias construídas a partir do século XV, possuem em sua composição NPs que não somente atuavam como purificadores fotocatalíticos do ar (processo oxidativo avançado capaz de degradar poluentes a partir da formação de radicais de hidroxila, oxigênio (O_2) e peróxido de oxigênio (H_2O_2) por meio do uso de cargas positivas e negativas originados a partir da excitação do catalisador pela luz. Esses radicais são responsáveis por desinfetar e desodorizar correntes de ar com baixas concentrações de poluentes (LACEY e SCHIRMER, 2008)), mas também conferiam cores vibrantes através da relação entre tamanho e a forma das NPs de cloreto de ouro e outros óxidos e cloretos metálicos. (ESTADOS UNIDOS, 2016)

Uma das maiores obras primas da nanotecnologia pré-moderna são os vitrais das três rosetas encontradas nas fachadas oeste, norte e sul da Catedral de Notre Dame em Paris – Figura 3.

Figura 3. Esquerda: roseta do transepto norte. Centro: Roseta da fachada ocidental. Direita: roseta do transepto sul



Fonte: IMAGINARIO, 2019.

A nanotecnologia moderna inicia-se em 1959 na conferência anual da Sociedade Americana de Física (APS), onde o físico norte-americano Richard Feynman estabeleceu as bases conceituais da nanotecnologia. Feynman, em sua palestra intitulada “*There's plenty of room at the bottom*”, em tradução livre, “Há muito espaço lá embaixo”, contou sobre um promissor ramo da ciência e tecnologia: a manipulação e controle de partículas em dimensões atômicas (FEYNMAN, 1959).

Para Feynman, o homem não precisaria mais aceitar apenas os materiais que a natureza fornece como os únicos e possíveis no universo, desde que as leis da natureza não sejam violadas. Além disso, a ideia de que manipular átomos e consequentemente produzir novos materiais, é apenas questão de conhecimento e disponibilidade de tecnologia para tornar realidade (CADIOLI e SALLA, 2006).

A apesar do conceito de nanotecnologia ter sido apresentado ao mundo anos antes, o prefixo “nano” e os principais experimentos, resultados e descobertas relacionadas à nanotecnologia surgiram apenas a partir da década de 80.

O termo “nano” foi cunhado em 1974 através do professor Norio Tanigushi da Universidade de Ciências de Tóquio para dar significado às máquinas que tivessem níveis de tolerância inferiores a um micron (1000 nm). O primeiro marco ocorreu em 1981 com o trabalho de Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, criadores do microscópio eletrônico de tunelamento (*Scanning Tunneling Microscope*), mas só em 1989 ocorreu a primeira manipulação atômica, onde Eigler e Schweizer, membros da IBM, assim como Gerd Binnig e Heinrich Rohrer,

escreveram o logotipo da empresa com átomos de xenônio (Xe) sobre uma superfície de níquel (Ni) a uma temperatura de 4K (INPI, 2010).

A partir desses trabalhos a nanotecnologia desenvolveu em muitos campos científicos como a publicação do livro “*Engines of Creation*” de Eric Drexler em 1986 e construção de uma rede de transistores usando nanotubos em 2001. (ALVES, 2004)

Mais recentemente a nanotecnologia difundiu por muitos campos e hoje já é encontrada em diversos segmentos, mesmo que em muitas das vezes passam despercebidos por nós – Tabela 1.

Tabela 1. Variedade e especificações de aplicações da nanociência e nanotecnologia de acordo com o setor empregado.

ÁREA	APLICAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Eletrônica	Padrões eletrônicos em escala nano; transistores de elétrons simples; computadores quânticos; memória não volátil; <i>Quantum dots</i> ;	Dispositivos/sistemas que conseguem explorar a escala nano para melhorar funcionalidade seja em termos de tamanho, velocidade e praticidade
Energia	Nanofotocatalisadores; Nanomateriais de carbono.	Dispositivos/sistemas utilizados para a produção e armazenamento de H ₂ . Nanomateriais de carbono também melhoram a eficácia das baterias de lítio e supercapacitores.
Meio ambiente	Catalisadores automotivos; sensores de poluição; tratamento de efluentes.	A elevada razão massa/superfície e as propriedades das nanopartículas podem favorecer mudanças significativas a favor do meio ambiente.

continuação

ÁREA	APLICAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Automóveis	Peças e carrocerias; Pinturas e Vidros	Nanotubos mais resistentes a impactos mecânicos; Pinturas e vidros autolimpantes e anti-reflexo.
Agricultura e alimentação	Embalagens; Fungicidas; Fertilizantes.	Algumas nanopartículas têm propriedades eficazes contra micro-organismos que causam prejuízo à lavoura ou degradam os alimentos.
Têxtil	Tecidos	Obtenção de tecidos mais fáceis de limpar, com maior resistência e capazes de remover os germes durante as lavagens.
Cosméticos	Crems anti-rugas; Protetor solar; Tinturas para cabelos; Hidratantes; Esmaltes.	Já no mercado, nanopartículas de TiO_2 + Mn e ZnO são utilizadas como filtros UV. Já mencionado, nanopartículas podem proporcionar uma coloração única seja para objetos, mas também para unhas e cabelos

Fonte: GODALE e SHARON, 2019

2.2 NANOTECNOLOGIA NO BRASIL

No Brasil, as pesquisas começaram mais tarde, quando a partir de 2001 na Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, a nanotecnologia passou a ser devidamente observada como uma tendência ganhando visibilidade nacional. Neste ano o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) lançou suas redes de nanociência e nanotecnologia e o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) iniciou o financiamento de um Instituto do Milênio de Nanociências e só então o Brasil começou a vislumbrar os ganhos que a nanotecnologia traria (SILVA, 2004).

A partir de 2005 investimentos privados suplementaram os investimentos governamentais para fortalecer os centros de pesquisa existentes, como o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade industrial (INMETRO), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Isso favoreceu em 2012 a criação do Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia (SisNano), que integra os laboratórios promovendo pesquisa, desenvolvimento e inovação no ramo (MARCONE, 2015).

Hoje, o que há de mais moderno e que projetará o Brasil a um novo patamar principalmente nas áreas de energia, agricultura e saúde é o projeto Sírius, a nova fonte de luz síncrotron brasileira. De acordo com o LNLS a luz, ou radiação, síncrotron é um tipo de radiação eletromagnética de alto fluxo e alto brilho que se estende por uma faixa ampla do espectro eletromagnético desde a luz infravermelha, passando pela radiação ultravioleta e chegando aos raios X. Ela é produzida quando partículas carregadas, aceleradas a velocidades próximas à velocidade da luz, têm sua trajetória desviada por campos magnéticos (LNLS, 2019).

Na área da saúde a luz síncrotron é fundamental para a identificação de estruturas proteicas e unidades intracelulares complexas. A Linha de luz IR1 de Nanoespectroscopia no Infravermelho pode ser utilizada no desenvolvimento de novas drogas e sensores biológicos baseados em nanopartículas e a linha de luz SAXS1 de Espalhamento de Raios X a baixos ângulos permite a investigação da matéria em escala de nanômetros a centenas de nanômetros com aplicações em biologia estrutural para, por exemplo, cosmética, farmacêutica e medicina (LNLS, 2019).

2.3 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Na química as metodologias de otimização de processos são usualmente baseadas em procedimentos univariados, pois a obtenção e interpretação dos resultados são simplificados. Apesar disso, as interações entre as variáveis não são detectadas o que consequentemente ocasiona um falso valor de máximo, ou seja, uma condição na qual a combinação das variáveis não é a que provê a melhor resposta analítica (MARTENDAL, 2007).

Quando se emprega procedimentos multivariados é possível verificar a significância preliminar das variáveis sobre a resposta no sistema em estudo. Neste procedimento, os efeitos principais e de interação das variáveis no intervalo estudado são estimados. Outra vantagem é que o número de experimentos é consideravelmente reduzido, uma vez que somente dois níveis de cada variável são avaliados (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995; MARTENDAL, 2007).

O planejamento fatorial é uma das técnicas mais empregadas no sistema multivariado e é usado para estimar os efeitos principais e os efeitos das interações entre as variáveis em estudo sobre uma resposta analítica. Nesse método cada variável analisada é denominada de fator e pode variar em dois níveis ou mais. Os níveis costumam ser denotados pelos sinais de (+), para superior e de (-), para inferior. Pontos centrais, nos quais todas as variáveis assumem valores médios, devem ser incluídos para evitar o risco da perda da relação não linear no meio do planejamento e para determinar o intervalo de confiança pelas repetições submetidas. A significância de cada variável e suas interações é determinada através da diferença das respostas analíticas médias no nível superior e inferior (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995; MARTENDAL, 2007.)

Outra ferramenta muito utilizada é a superfície de resposta. Essa ferramenta é uma junção de técnicas estatísticas utilizadas para analisar onde a resposta de interesse é influenciada pelas variáveis com o intuito de otimizar a resposta. A superfície de resposta é dada através da escolha de um “*design*” experimental adequado.

Utilizando as metodologias de planejamento fatorial e superfície de resposta é possível determinar as condições e concentrações ideais de cada reagente envolvido no processo da síntese química das Ag-NPs.

2.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA: SÍNTESE

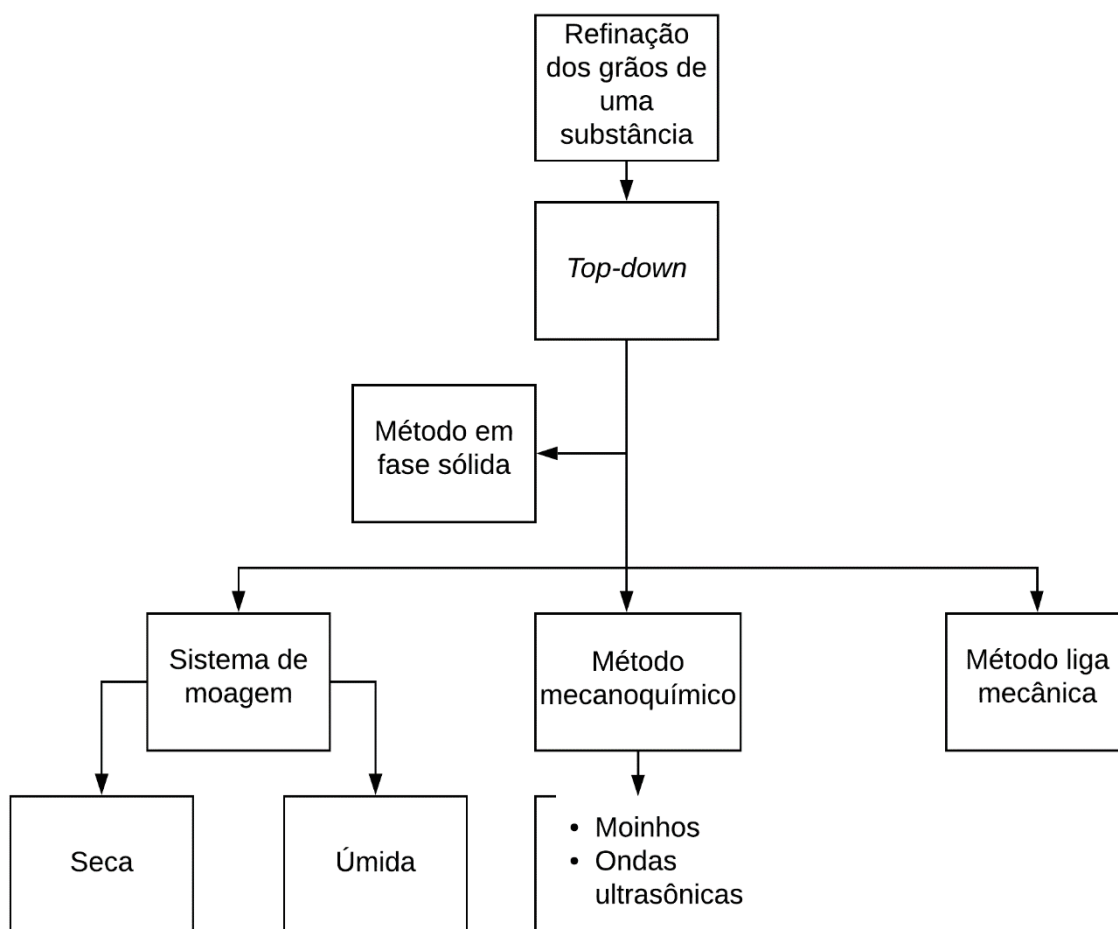
As nanopartículas metálicas de metais nobres (M-NPs), mais especificamente as Ag-NPs, têm atraído grande interesse dos pesquisadores devido às diferentes propriedades eletrônicas, óticas, mecânicas, magnéticas e químicas que essas apresentam em relação às partículas macroscópicas, denominadas *bulk* (KAUCZ, 2017; BALLOTTIN, 2014; FURLANETTO, 2014).

Essas propriedades da escala nanométrica são resultados das diversas formas e tamanhos que as Ag-NPs podem adquirir conforme o processo de síntese. Os métodos de síntese são variados, alguns mais complexos e outros mais simples e podem ser divididas em: físico, químico e biológico.

O processo de síntese biológica é representante do conceito de síntese verde, pois utiliza agentes redutores com baixa ou nula toxicidade como enzimas, proteínas, aminoácidos, flavonoides, compostos heterocíclicos e compostos hidrossolúveis (SILVA, 2014). Essas moléculas são capazes de reduzir íons de Ag^+ à NPs em apenas uma etapa e se aderem facilmente à superfície das Ag-NPs, garantindo estabilidade e proteção sem o uso de outras substâncias. Além disso, geram alto rendimento e baixo custo de produção, por isso esse método é cada vez mais estudado e aplicado (BENEDITO, SILVA e SANTOS, 2017).

O método físico é conhecido como “*Top-down*”, em uma tradução livre, “de cima para baixo”. A ideia desse método consiste em fragmentar o aglomerado metálico em partículas cada vez menores até o tamanho nano. Apesar de oferecer confiabilidade e complexidade, uma desvantagem deste método é que as M-NPs são geradas sem revestimento, tendo uma alta energia superficial, levando à agregação imediata na forma de pó policristalino, termodinamicamente favorecido pela formação de ligações metal-metal (ROYAL SOCIETY e ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; SHIPWAY e WILNER, 2001). As principais técnicas utilizadas nesse método estão representados na Figura 4.

Figura 4. Técnicas de síntese de nanopartículas através do método físico.



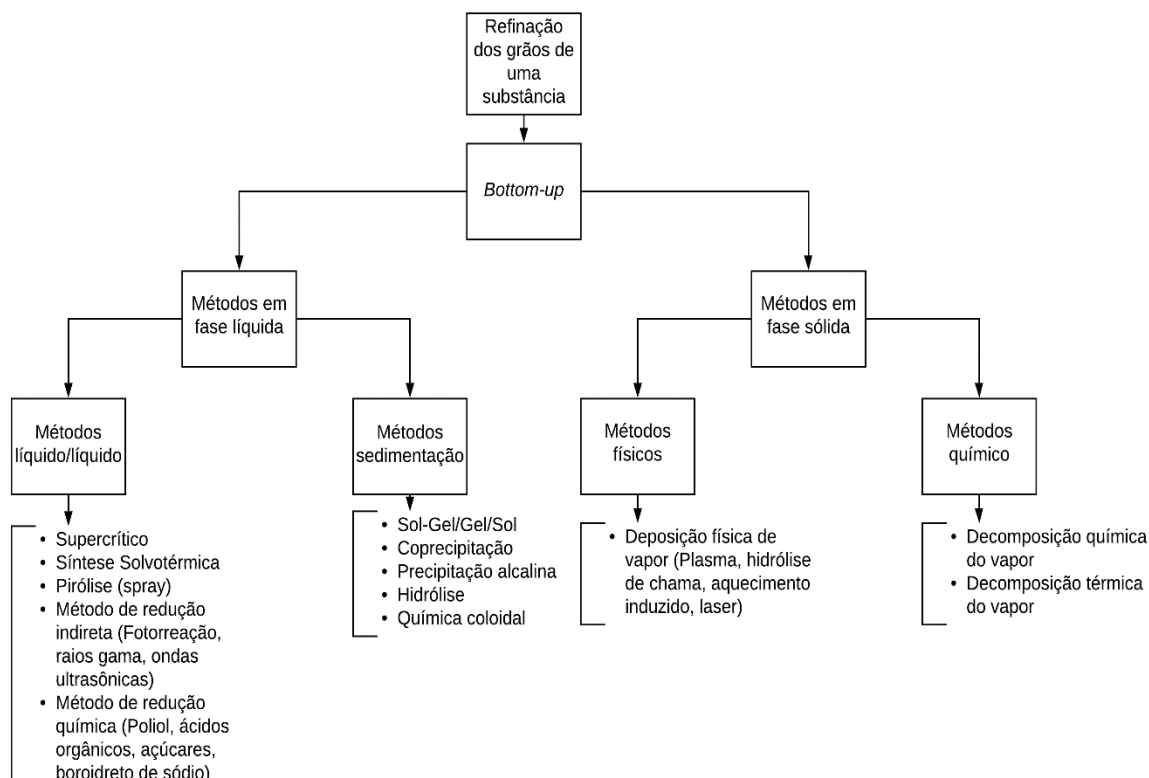
Fonte: LOPES, 2017.

O método químico, conhecido por “*Bottom-up*”, em uma tradução livre “de baixo para cima” é o método mais antigo e mais utilizado até os dias de hoje. A grande variedade de abordagens para atingir esse objetivo de síntese de NPs pode ser dividida em três categorias: síntese química, montagem automática e montagem posicional. A síntese química é um método que consiste na redução de um sal metálico na presença de um estabilizante.. A montagem automática é uma técnica de produção em que os átomos se arranjam nas estruturas desejadas da escala nano através de interações químicas ou físicas normalmente com a presença de um fator externo (campo elétrico, campo magnético, etc). A montagem posicional envolve a construção de estruturas manipulando-se átomo por átomo ou molécula por molécula (ROYAL SOCIETY e ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

O primeiro a fazer uso da redução química de um sal metálico em água foi Faraday em 1857, porém somente um século depois Turkevich descreveu o procedimento padrão para

síntetizar e estabilizar coloides de nanopartículas de ouro (Au-NPs) utilizando citrato. Anos depois, 1982, Lee e Meisel adaptaram esta metodologia para a síntese de Ag-NPs (LEE e MEISEL, 1982). Desde então se desenvolveram diversas outras técnicas de síntese, representadas na Figura 5.

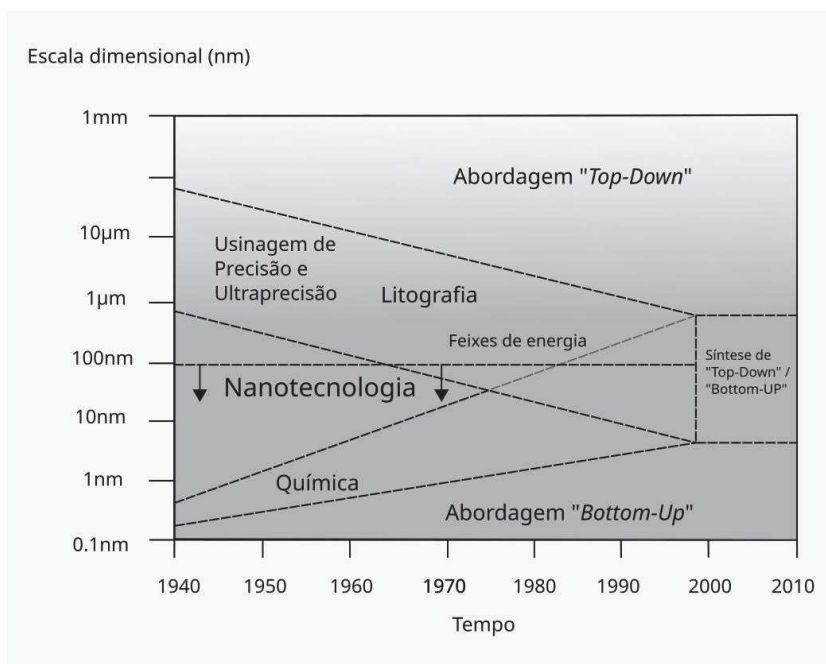
Figura 5. Técnicas de síntese de nanopartículas através do método químico.



Fonte: LOPES, 2017

O desenvolvimento de novas técnicas e equipamentos dentro das metodologias de “*top-down*” e “*bottom-up*” permitiram cada vez mais o controle das estruturas ocasionando uma convergência entre ambas as metodologias que possibilitou a criação de novos métodos de síntese híbridos – Figura 6.

Figura 6. A convergência das técnicas “top-down” e “bottom-up” no processo de síntese de NPs.



Fonte: Adaptado de WHATMORE, 2001

Em comum aos métodos de síntese apresentados está a necessidade de obter NPs estáveis. A estabilidade garante a reprodutibilidade e validação da metodologia bem como o potencial de aplicação. Após a síntese propriamente dita, os agentes estabilizantes detêm o papel de evitar a aglomeração das Ag-NPs a fim de evitar a formação de precipitado, mas também desempenham uma função crítica quanto ao tamanho, distribuição, morfologia e biocompatibilidade das mesmas (SOARES, 2014)

A estabilidade pode ocorrer de três diferentes formas: eletroestática, estérica e eletroestérica. O tipo de estabilização depende dos reagentes e do sistema utilizados.

A estabilização eletroestática é produto da interação entre a camada dupla eletrônica que cerca as NPs na interface. A camada de superfície, positiva ou negativa, forma um potencial elétrico que acumula íons de cargas opostas à interface (contra-íons), que por sua vez atraem íons carregados iguais a interface (co-íons) formando uma segunda camada de íons livres, desta forma, sendo chamada de dupla camada difusa (GARCIA, 2011).

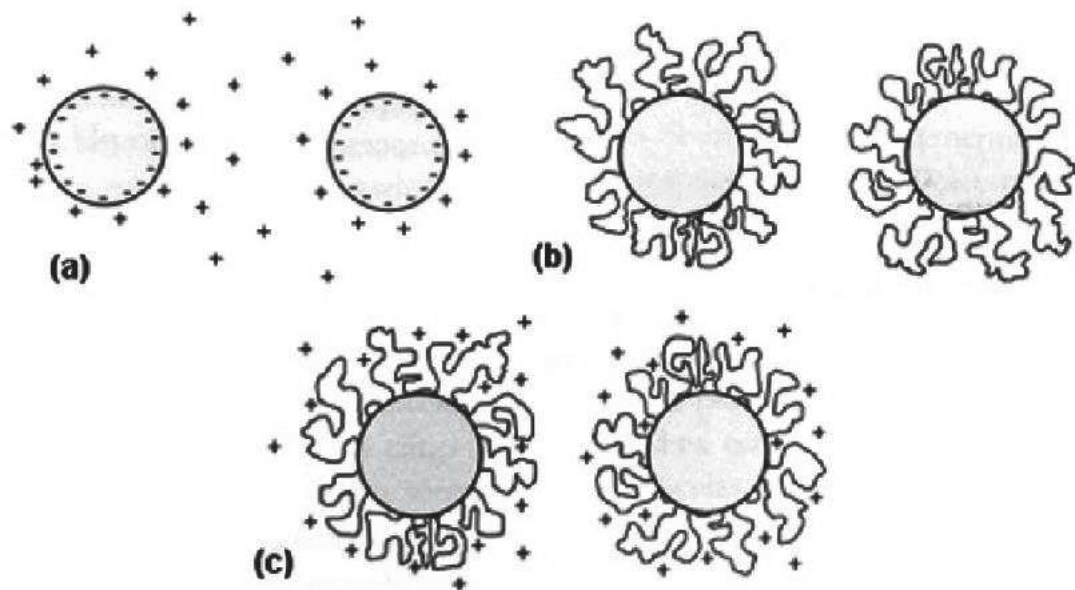
A estabilização estérica ocorre conforme as moléculas poliméricas se adsorvem sobre a superfície das NPs em sítios com que possuam afinidade. Essa capa protetora deve possuir espessura de modo a impedir que as forças de Van Der Waals entre as NPs não atuem (CERRUTTI, 2005).

A estabilização eletroestérica, como o próprio nome sugere, é uma mistura das outras duas formas. Esse tipo de estabilização só é possível graças à atuação das forças atrativas de

van der Waals e da força repulsiva das duplas camadas elétricas. A estabilização eletrostática, geralmente é obtida pelo uso de polieletrólitos ou surfactantes iônicos (GUIMARÃES, 2008).

A Figura 7 exemplifica os três métodos de estabilização sendo os sinais de adição e subtração representam respectivamente partículas carregadas positivamente e negativamente e a linhas sem traçado regular representam as barreiras estéricas.

Figura 7. Representação dos métodos de estabilização utilizados para NPs (a) método eletrostático, (b) método estérico e (c) método eletroestérico.

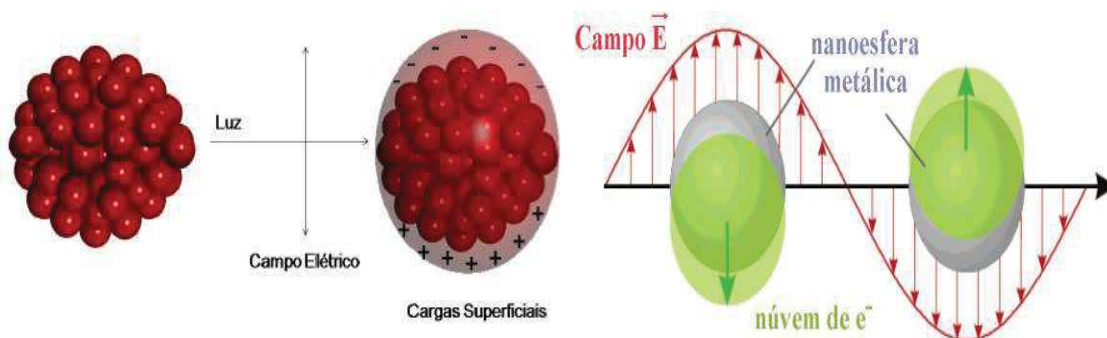


Fonte: CASTRO. e PANDOLFELLI, 2009.

2.5 NANOPARTÍCULAS DE PRATA: CARACTERIZAÇÃO

A elevada área superficial das M-NPs possibilita um maior número de átomos na superfície, menor coordenação e maior energia. Essa alteração da área superficial possibilita que a presença de um campo eletromagnético, até mesmo a luz visível, cause a excitação dos elétrons – Figura 8.

Figura 8. Oscilação plasmon em decorrência de uma excitação eletromagnética.



Fonte: KAUCZ, 2017.

Os elétrons respondem com uma oscilação coletiva que gera regiões com absorção bem definida, denominada banda plasmon de superfície (BPS), que está relacionada com a forma e tamanho das M-NPs (ELIAS, 2014; FURLANETTO, 2014).

Quando a nuvem de elétrons é deslocada em relação aos núcleos, uma força de restauração resulta na atração de Coulomb entre elétrons e núcleos que resulta na oscilação da nuvem de elétrons em relação ao quadro nuclear, gerando condições de ressonância em que a oscilação dos elétrons livres está em fase com a radiação eletromagnética (SPR – Surface Plasmon Ressonance) (KAUCZ, 2017)

As diferenças das NPs podem ser identificadas pela espectrofotometria com base no deslocamento e amplitude da BPS. Dependendo das características que as NPs apresentam são destinadas às aplicações onde seu potencial será melhor explorado.

Outra caracterização extremamente importante é a microscopia eletrônica de transmissão – TEM. A TEM fornece informações sobre a distribuição e sobre os diâmetros das NPs sendo assim possível gerar um histograma de dispersão dos tamanhos e obter os respectivos desvios padrão.

Existem outras caracterizações que podem ser empregadas como o espalhamento dinâmico de luz (DLS) e a absorção atômica. A DLS utiliza a espectrometria de correlação de fótons para medir o diâmetro hidrodinâmico médio das NPs. Utilizando o espectrofotômetro de

absorção atômica com emprego de chama é possível determinar a concentração de prata nas soluções coloidais (FERNANDES, 2014)

2.6 NANOTOXICIDADE CONTRA MICRO-ORGANISMOS

As propriedades antimicrobianas da prata já eram conhecidas há algum tempo, entretanto, o mecanismo de ação não foi totalmente elucidado e ainda é tema de debate.

As Ag-NPs mostraram-se eficazes na inibição da cadeia respiratória celular e também na retirada de cátions Ca^{2+} e Zn^{2+} por efeito de substituição, essenciais para a vitalidade das células bacterianas (GARCIA, 2011).

Outro mecanismo de ação bactericida está relacionado com a capacidade das Ag-NPs de invadir as células microbianas e interagir com ligações dissulfeto dos conteúdos de glicoproteicos/ proteicos afetando negativamente proteínas associadas à replicação do DNA e transcrição do RNA (LARA et al, 2011). Tal mecanismo só ocorre porque a prata possui alta afinidade com o enxofre, que está presente em muitas proteínas, e com o fósforo, presente no DNA e RNA (MORONES et al, 2005; SHARMA, YNGARD e LIN, 2008).

O modo de ação mais aceito atualmente é a capacidade que as Ag-NPs têm de ser internalizadas e liberar íons Ag^+ , responsáveis pela morte celular.

As NPs de Ag podem liberar íons Ag^+ , quando são expostas à água e oxigênio, situação encontrada no meio biológico. A toxicidade das NPs de Ag está relacionada com a sua área superficial, uma maior área superficial pode promover uma maior liberação de íons Ag^+ , os quais estão relacionados à toxicidade e ação antimicrobiana das nanopartículas. Discute-se que parte considerável da toxicidade de NPs de Ag se deva à formação de íons Ag^+ no meio biológico. Assume-se que NPs de Ag podem ser internalizadas, e no interior das células liberar íons Ag^+ causando estresse oxidativo, o qual pode promover a morte celular (DURÁN et al., 2019).

O estresse oxidativo está relacionado com a produção de radicais livres e suas respectivas funções, em proporções adequadas: possibilitar a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. A instalação de um estresse oxidativo promove a oxidação de biomoléculas essenciais ocasionando a perda das respectivas funções e/ou desequilíbrio homeostático afetando diretamente células e tecidos (BARBOSA et al., 2010).

2.7 TESTES PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO

Existem diversas técnicas passíveis de serem utilizadas para avaliar o efeito bactericida de compostos e soluções. As mais comuns e inicialmente utilizadas são as técnicas de difusão em placa e microdiluição em série.

O método de difusão em ágar é utilizado para testar patógenos comuns de crescimento rápido e certas bactérias fastidiosas. Este método é baseado na presença ou ausência de um halo de inibição, considerando o tamanho do halo. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas (CIM) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (CLSI, 2015).

O método da microdiluição seriada consiste no preparo de vários ensaios com diversas concentrações dos antimicrobianos para determinar a CIM e a concentração bactericida mínima (CBM) de modo controlado para garantir a reprodutibilidade (CLSI, 2012). A CIM é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo. A CBM é a concentração do agente antimicrobiano capaz de eliminar 99% dos micro-organismos, portanto é uma concentração bactericida (CLSI, 1999). A CBM é dada através de um teste subsequente ao método da microdiluição: o *spot test*. Esse teste consiste em verificar a CBM através da observação da presença de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) quando aplica-se parte da mistura de micro-organismos e agentes antibacterianos em um meio de cultivo sólido.

Em ambos testes mencionados é comum a utilização de bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas. Dentre as Gram positivas encontram-se a *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus*. Dentre as Gram negativas estão a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa*.

A *C. perfringens* é um bacilo Gram positivo, formador de esporo oval-subterminal, apresenta cápsula, é imóvel, tem intensa atividade metabólica em alimentos e mesmo sendo classificada como anaeróbia a *C. perfringens* pode sobreviver e crescer na presença de oxigênio, assim como outras bactérias do gênero (ALMEIDA, 2010). Essa bactéria é mesófila, ou seja, sua maior taxa de crescimento ocorre em temperaturas entre 37°C e 45°C, além disso, necessita de um meio com pH neutro para maior desenvolvimento. Pode ser cultivada em diferentes meios, apresentando formas, coloração e distribuição de colônias em cada um (em ágar sangue, UFC's formam colônias arredondadas, umbilicadas e brilhantes).

A *C. perfringens* é transmitida através da ingestão de alimentos contaminados. A maioria dos surtos está associado ao preparo inadequado de carnes. Um quadro de cólicas abdominais, acompanhadas de diarreia e náusea são comuns, mas vômitos e febres geralmente não fazem parte dos sintomas. Existem 5 tipos diferentes tipos de bactérias, classificadas de A a E de acordo com a toxina produzida.

Figura 9. Quadro de classificação dos toxiotipos de *Clostridium perfringens*.

Tipo	Alfa	Beta	Beta-2	Épsilon	Iota	Enterotoxina
A	+		+			+
B	+	+		+		+
C	+	+	+			+
D	+			+		+
E	+				+	+

Fonte: (ALMEIDA, 2010)

Um quadro mais sério pode ser causado pela ingestão de cepas do tipo C que provocam a enterite necrotizante ou doença de Pigbel (dor abdominal aguda, diarreia sanguinolenta, vômitos, choque e peritonite), com 40% de letalidade (BRASIL, 2011)

A bactéria *S. aureus* são do tipo cocos, Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou, mais comumente, agrupados irregularmente devido à sua divisão celular (CASSETTARI, STRABELLI e MEDEIROS, 2005; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH = 7, à temperatura ótima de 37 °C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes e a pigmentação das colônias varia de acordo com o tempo de incubação e pode variar desde o acinzentado até o amarelo-ouro (SANTOS et al, 2007).

A *Staphylococcus aureus* causa muitos tipos de infecção, desde furúnculos até septicemias (sepsis), endocardites (infecções no coração) e abscessos – dependendo do lugar onde se encontra. Uma septicemia causada pela bactéria é uma doença grave, assim como a pneumonia que tem alta mortalidade (PASTERNAK, 2017).

A *E. coli* é um bastonete curto, Gram-negativo, não esporulado, sendo a maioria é móvel, devido a existência de flagelos peritríqueos (flagelos distribuídos por toda a célula) (BARNES, VAILLANCOURT e GROSS, 2003; OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005). É uma bactéria mesófila e que necessita de pH neutro.

Em meios de nutrientes sólidos as UFCs apresentam tanto aspecto rugoso quanto liso, no entanto podem existir colônias intermediárias e mucóides. Colônias rugosas têm aspecto grosseiro e contornos irregulares, já as colônias lisas são convexas, brilhantes e com bordas regulares (BERCHIERI JUNIOR e MACARI, 2009).

Grande parte das *E.coli* são comensais e, não apresentam qualquer gene de virulência (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002). No entanto, atualmente já se reconhecem diversas patologias entéricas e extra-intestinais causadas por alguns sorotipos de *E. coli* (BERCHIERI JUNIOR e MACARI, 2009; SAIDENBERG, 2008). Os efeitos negativos desses sorotipos em humanos como diarreia e vômito se deve principalmente a ingestão de alimentos contaminados.

A *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram negativa, aeróbia estrita cuja mobilidade se deve através de um flagelo polar monotríqueo (FERREIRA, 2005). Forma colônias redondas e lisas de coloração esverdeada produzindo às vezes odor adocicado. Assim como as outras bactérias mencionadas essa também é mesófila e necessita de pH neutro.

As doenças causadas por este agente compreendem uma faixa que vão desde infecções superficiais a septicemia, sejam ela agudas ocasionadas pela produção toxinas ou crônicas ocasionadas pelo biofilme da bactéria. Infecções por este microrganismo estão associadas ao contato com água ou soluções contaminadas (FERREIRA, 2005).

3. JUSTIFICATIVAS

Já existe certa gama de trabalhos que trazem diferentes metodologias de síntese das Ag-NPs e que trazem no decorrer do texto informações sobre as propriedades antibacterianas das Ag-NPs, porém em muitos casos esse efeito não é avaliado. Assim, nota-se que é um tema que pode ser enriquecido com novas pesquisas e novas abordagens de métodos, reagentes e micro-organismos que poderiam ser testados e avaliados incentivando a utilização de Ag-NPs em mais processos.

A utilização de Ag-NPs em situações que requerem esterilidade ou manutenção do crescimento microbiológico sob controle é uma alternativa viável e segura para as empresas e consumidores, pois auxiliam no combate de possíveis agentes patológicos e aumentam a vida útil dos materiais em que estão inseridas.

Essas propriedades antimicrobianas das Ag-NPs podem beneficiar principalmente o setor hospitalar, que sofre diariamente com patologias causadas por micro-organismos. A presença desse material em equipamentos hospitalares pode significar a diminuição dos casos de infecções e complicações ocasionadas por micro-organismos, inclusive àquelas provocadas por indivíduos resistentes aos antibióticos em uso.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Os objetivos gerais foram sintetizar Ag-NPs utilizando o nitrato de prata como sal metálico precursor, o borohidreto de sódio (NaBH_4) como sal redutor e a carboximetilcelulose (CMC) como material polimérico estabilizante e avaliar a toxicidade microbiológica dessas nanopartículas contra bactérias patogênicas.

4.2 ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar as Ag-NPs utilizando a análise multivariada para determinar a melhor condição de síntese.
- Constatar o efeito antimicrobiano das Ag-NPs para bactérias de interesse clínico com complexos típicos diferentes (Gram positivo e Gram negativo) utilizando o método de difusão em placa
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) para bactérias de interesse clínico com complexos típicos diferentes (Gram positivo e Gram negativo) utilizando a microdiluição em série.

5. MATERIAIS

Os experimentos foram realizados nas instalações laboratoriais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Os reagentes utilizados são de pureza analítica (P. A.) e demais materiais utilizados foram previamente limpos e esterilizados.

5.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para a síntese das Ag-NPs a CMC (Sigma-Aldrich, 99%, Mw 700000), o NaBH₄ (Sigma-Aldrich, 98%) e AgNO₃ (Proquímios, 99%) foram utilizados como recebidos, sem purificações adicionais.

Utilizou-se água ultrapura e degaseificada por meio de aquecimento em todas as soluções. Todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com ácido nítrico concentrado e rinsadas abundantemente com água ultrapura para eliminar qualquer impureza residual.

5.2 LINHAGENS BACTERIANAS

As linhagens bacterianas utilizadas neste experimento foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Clostridium perfringens* (ATCC 3624) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Todas as cepas foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ.

5.3 TESTES ANTIBACTERIANOS

Nos testes foram utilizados caldo Mueller Hinton (Kasvi, P. A.) e ágar bacteriológico (Alphatec, P. A.). Os reagentes foram dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Utilizou-se placas de Petri e placas de microdiluição descartáveis para minimizar os riscos de contaminação.

6. METODOLOGIA

6.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A otimização das variáveis (concentrações de CMC e NaBH₄) na síntese das Ag-NPs foi realizada utilizando o “*design*” experimental modelo de superfície de resposta com planejamento fatorial de dois níveis com quatro pontos centrais e quatro pontos axiais totalizando 12 experimentos. Como a CMC é um polímero viscoso derivado da celulose as soluções necessitam ficar sob agitação moderada por 24 horas antes de serem utilizadas e o boroidreto de sódio deve ser solubilizado em água gelada para evitar a formação de bolhas. As concentrações de AgNO₃ foram constantes.

Os valores correspondendo a cada um dos níveis, além do ponto central para cada fator, estão listados na tabela 2, enquanto que na tabela 3 estão listados todos os experimentos realizados na otimização.

Tabela 2. Níveis e concentrações finais dos fatores CMC, NaBH₄ e AgNO₃ do *design* experimental do sistema.

Solução	Concentração de CMC (%)	Concentração de NaBH ₄ (mol/L)	Concentração de AgNO ₃ (mol/L)
+2	0,1	10x10 ⁻³	0,35x10 ⁻³
+1	0,0775	7,625x10 ⁻³	
0	0,055	5,25x10 ⁻³	
-1	0,028	2,875x10 ⁻³	
-2	0,01	0,5x10 ⁻³	

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 3. Concentrações individuais dos reagentes em cada um dos 12 experimentos.

Amostra	Solução de CMC	Solução de NaBH ₄
A	+1	+1
B	-1	+1
C	-1	-1
D	+1	-1
E	0	+2
F	0	-2
G	+2	0

continuação

Amostra	Solução de CMC	Solução de NaBH ₄
H	-2	0
I	0	0
J	0	0
K	0	0
L	0	0

Fonte: Autor, 2019

Para preparar cada uma dessas amostras utilizou-se 1,8 mL de CMC (90%), 0,1 mL de AgNO₃ (10%) e 0,1 mL de NaBH₄ (10%), que foram colocadas e armazenadas em tubos eppendorfs por duas horas, período de tempo necessário para se completar o processo de síntese.

Para gerar o gráfico da superfície de resposta utilizou-se a resposta analítica (ψ) estimada a partir da Equação 1. Os parâmetros da equação foram medidos via varredura das amostras no espectrofotômetro de absorção UV-Vis (ThermoScientific modelo Genesys 10-S) na região entre 300-800 nm em uma cubeta de quartzo com 1 cm de aresta. A superfície de resposta foi gerada através do *software* STATISTICA.

$$\psi = \frac{A_{m\acute{a}x}}{\lambda_{m\acute{a}x} FWHH} \quad \text{Equação 1}$$

Em que,

ψ : resposta analítica;

$A_{m\acute{a}x}$: absorbância máxima

$\lambda_{m\acute{a}x}$: comprimento de onda de máxima absorbância

FWHH: é a largura da banda à meia altura (FWHH do inglês: “*full width at half-height*”).

Nesta equação a melhor resposta gerada é quando $A_{m\acute{a}x}$ está maximizado e os valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ e o FWHH minimizados, indicando a formação de Ag-NPs pequenas e dispersidade baixa.

6.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA OTIMIZADAS

Após a determinação das concentrações ideais dos reagentes envolvidos na síntese através da superfície de resposta sintetizou-se 200 mL das Ag-NPs nessas condições lembrando de homogeneizar por 24 horas a solução de CMC e utilizar água gelada para a solução de NaBH₄. Após o processo de síntese estar completo, colocou-se as dispersões em tubos *Falcon* contendo 25 mL. As amostras foram liofilizadas e armazenadas em um dessecador para evitar o acúmulo de umidade até quando fossem utilizadas. Para manusear as Ag-NPs ressuspendeu-se as dispersões em 2mL de água ultrapura degaseificada.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA OTIMIZADAS

6.3.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

As Ag-NPs otimizadas passaram por uma nova varredura para verificar se os parâmetros como $A_{\text{máx}}$ e $\lambda_{\text{máx}}$ permaneceram iguais. Os espectros foram obtidos a partir de um espectrofotômetro de absorção UV-Vis (ThermoScientific modelo Genesys 10-S) na região entre 300-800 nm em uma cubeta de quartzo com 1 cm de aresta.

6.2.1 MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÔNICA

As imagens das Ag-NPs otimizadas foram obtidas em um MET JEM – 1011TEM 100kV. A amostra foi preparada depositando-se uma gota da dispersão de Ag-NPs em um gride de cobre de 200-mesh com filme de carbono. O excesso de solução foi removido com a ajuda de um papel filtro para evitar a agregação de partículas no gride. A partir dessas imagens quantificou-se as Ag-NP sintetizadas e mediu-se o diâmetro de pelo menos 150 Ag-NPs através do *software ImageJ*. Os diâmetros foram utilizados para montar um histograma de distribuição e calcular o diâmetro médio das Ag-NPs.

6.3 INÓCULOS BACTERIANOS

Preparou-se os inóculos selecionando-se uma UFC isolada em ágar Mueller-Hinton de cada uma das bactérias avaliadas e transferindo-as para tubos *Falcon* separados contendo 20 mL de caldo Mueller-Hinton estéril. As bactérias se desenvolveram por 6 horas em um *shaker* sob temperatura de 35°C e rotação de 150 rpm. Em seguida, mediu-se a absorbância do cultivo a 625 nm utilizando o espectrofotômetro e ajustou-se o cultivo de forma com que a turbidez do meio se encontrasse comparável a solução padrão McFarland-0,5 resultando em aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC mL⁻¹.

6.4 TESTE DE DIFUSÃO EM PLACA

O teste de difusão foi realizado em triplicata adaptando-se a norma de padronização M2-A12 - “*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*” do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”

Com o objetivo de fornecer resultados qualitativos a respeito da presença de halos de inibição de crescimento bacteriano inicialmente preparou-se ágar Mueller-Hinton conforme as instruções do fabricante. Esse ágar foi esterilizado e distribuído ainda quente e líquido em placas de Petri formando uma camada fina de ágar. Após o meio estar solidificado e com o auxílio de ponteiros para micropipetas 100-1000 µL distribuiu-se o restante do ágar líquido nas placas de Petri formando poços uniformes no ágar para testar diferentes concentrações de Ag-NPs e facilitar a possível difusão do agente antimicrobiano. Após solidificadas, as placas contendo o meio sólido passaram 24 horas em uma estufa com temperatura controlada para retirar toda umidade residual existente e provar a esterilidade do meio.

Estriou-se os inóculos bacterianos nas placas contendo o meio sólido com um *swab* de algodão tomando cuidado para evitar com que o inóculo caísse diretamente nos poços. Em seguida preencheu-se os poços com 100 µL da solução de Ag-NPs (concentração inicial de Ag⁰ = 0,4719 µg mL⁻¹) diluídas em diferentes porcentagens – 0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100%. Realizado esse procedimento, as placas permaneceram por 24 horas em uma estufa BOD à 35°C. Passado esse período de tempo, retirou-se as placas e avaliou-se os resultados.

6.5 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA

O teste de microdiluição em placa foi realizado seguindo a norma de padronização M7-A9 - “*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*” do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”.

A placa utilizada continha 96 poços identificados com linhas (A-H) e colunas (1-12). O teste foi realizado em triplicata para cada uma das bactérias avaliadas sendo em uma placa para a *E. coli* e *P. aeruginosa* (Gram negativas) e em outra para a *C. perfringens* e *S. aureus* (Gram positivas). As linhas “G” e “H” foram utilizadas para realizar o controle.

Inicialmente adicionou-se 100 µL de caldo Mueller-Hinton estéril em todos os poços e 100 µL de Ag-NPs (concentração inicial de $Ag^0 = 0,4719 \mu\text{g mL}^{-1}$) nos poços das linhas “A-F” da coluna “1”. Homogeneizou-se a mistura e transferiu-se 100 µL da mesma para o poço da coluna seguinte e assim sucessivamente até o décimo segundo poço.

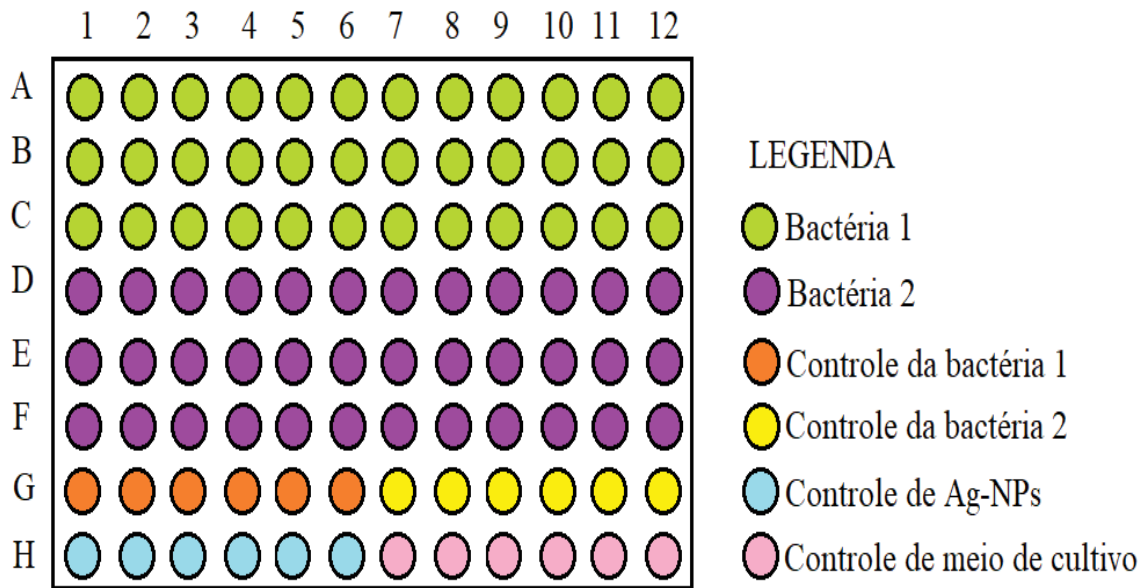
Previamente a adicionar as bactérias realizou-se uma diluição do inóculo ajustado. Em uma canaleta estéril 100 µL de bactérias, ajustadas previamente em escala de turbidez McFarland-0,5, foram colocados em 10 mL de caldo Mueller-Hinton obtendo-se uma concentração de 1×10^6 UFC mL⁻¹. Após a diluição acrescentou-se 20 µL das bactérias nos poços determinados.

Na linha “G” foram realizados os controles bacterianos. Nas seis primeiras colunas foram colocados 20 µL de uma bactéria e nos seis últimas 20 µL da outra bactéria.

Na linha “H” foram realizados os controles das Ag-NPs e do meio de cultivo. Nas seis primeiras colunas foram adicionados 50 µL de Ag-NPs e nas seis últimas mais 100 µL de caldo Mueller-Hinton.

A placa foi incubada em uma estufa por 24 horas a 35°C. Passado esse período de tempo retirou-se a placa e avaliou-se os resultados. Para facilitar a visualização dos mesmos adicionou-se 20 µL de resazurina, um corante que indica o crescimento bacteriano. Esse composto funciona como substrato cromogênico de enzimas desidrogenases, age como indicador de oxirredução, e é reduzido (pelo ganho de hidrogênio) por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular (RIBEIRO et al., 2004). Quando não existe o metabolismo celular a coloração da resazurina permanece azul, mas quando existe o metabolismo celular a resazurina sofre redução para resorufina que possui a coloração rósea. A Figura 10 ilustra a disposição do experimento.

Figura 10. Disposição das bactérias e controles realizados no teste de microdiluição em placa.



Fonte: Autor, 2019.

SPOT TEST

O *spot test* é um teste subsequente da microdiluição em placa utilizado para determinar a CBM através da observação da presença de UFC.

Para realizar esse teste foram preparadas quatro placas de Petri estéreis contendo ágar Mueller-Hinton preparado conforme a instrução do fabricante. Antes de adicionar a resazurina nos poços da placa do teste de microdiluição retirou-se 5 μL de cada um dos poços das linhas contendo as bactérias em triplicata e dos controles utilizados e aplicou-se uniformemente sobre o ágar. Em seguida, incubou-se as placas de Petri por 24 horas a 35°C. Passado o tempo, retirou-se as placas da incubadora e avaliou-se os resultados.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

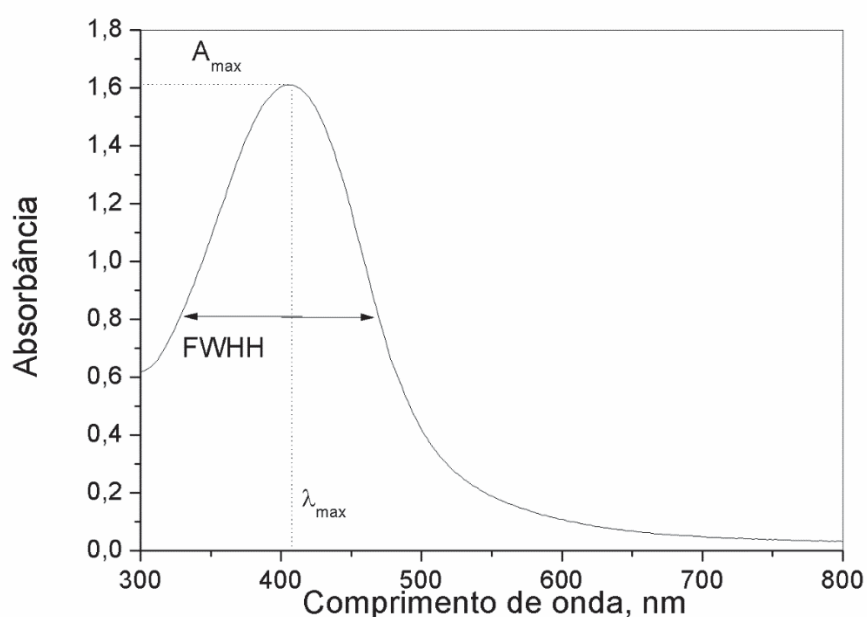
A apresentação dos resultados e argumentações serão divididas e ordenadas conforme os experimentos foram realizados: inicialmente discorrendo sobre a otimização, síntese e caracterização das Ag-NPs e posteriormente sobre os testes utilizados para avaliar as propriedades antimicrobianas e aspectos notáveis e relevantes sobre o tema.

7.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Apesar dos diversos trabalhos envolvendo a síntese química de Ag-NPs por meio da redução de um sal metálico na presença de um estabilizante não se sabe exatamente como as variáveis do sistema se comportam e influenciam no produto final. A otimização multivariada é utilizada para esclarecer esse sinergismo e estimar as melhores condições do processo através da superfície de resposta utilizando as respostas analíticas obtidas.

Para determinação dos parâmetros A_{\max} , λ_{\max} e FWHH e conseqüentemente das respostas analíticas através da Equação 1 realizou-se as varreduras UV-Vis das 12 amostras de Ag-NPs sintetizadas conforme a Figura 11 (Apêndice 1).

Figura 11. Parâmetros medidos nas varreduras UV-Vis das amostras de Ag-NPs sintetizadas conforme o planejamento fatorial (Apêndice 1)



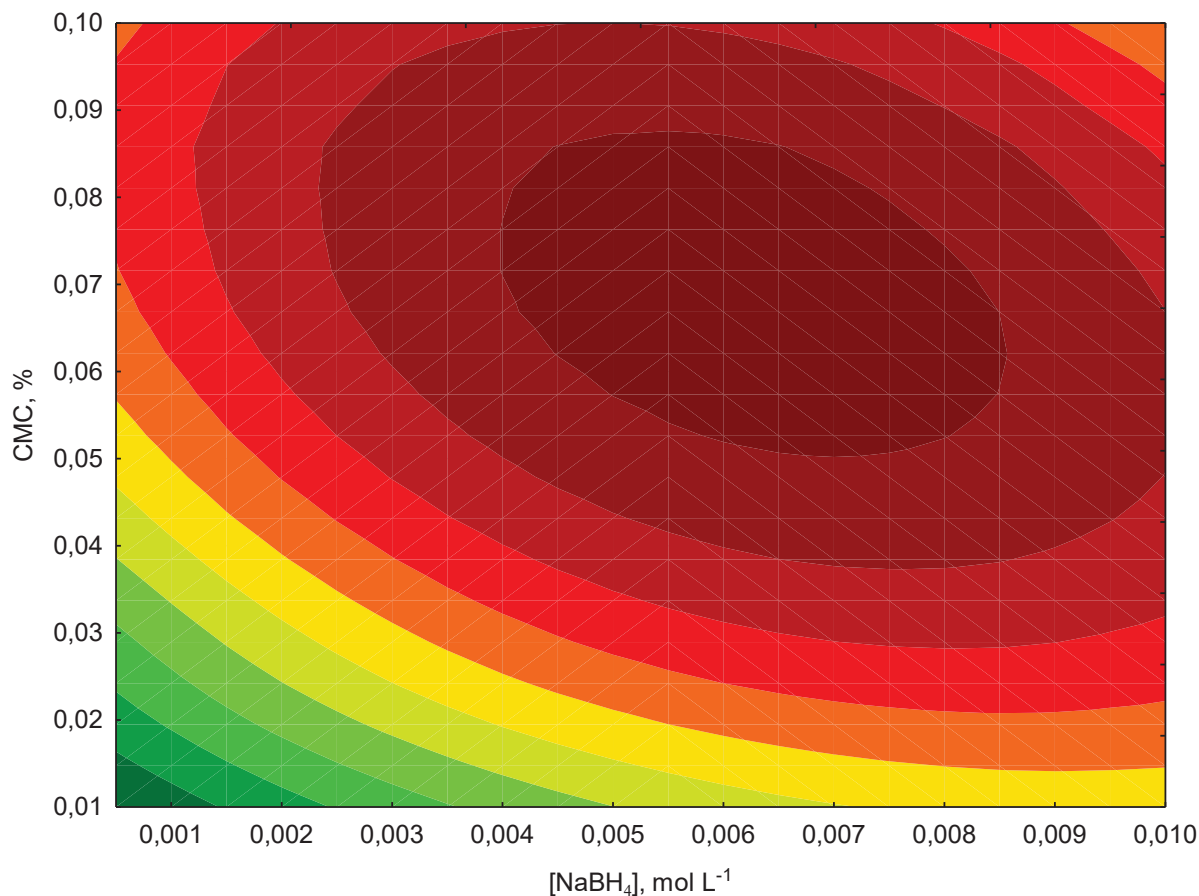
A absorvância máxima ($A_{\text{máx}}$) reflete proporcionalmente o rendimento de AgNPs formadas. O comprimento de onda de máxima absorvância ($\lambda_{\text{máx}}$) reflete o tamanho das AgNPs, pois quanto maiores as Ag-NPs maiores serão os comprimentos de onda absorvidos e conseqüentemente maiores são as Ag-NPs. A largura da banda à meia altura (FWHH - do inglês: “*full width at half-height*”) reflete a dispersidade no tamanho das Ag-NPs, ou seja, a variação de tamanhos diferentes existentes entre as Ag-NPs.

Duas amostras (F e G) destoaram nos padrões quando comparadas às outras amostras apresentando valores de $A_{\text{máx}}$ menores e FWHH maiores, o que representa menor rendimento e maior dispersidade de tamanho respectivamente. Essas amostras são referentes aos dois pontos axiais relacionados com a concentração de CMC o que demonstra a importância significativa do uso de estabilizantes em concentrações próximas às concentrações centrais com o intuito de não perder a relação linear com o meio do planejamento. Essa significância pode ser comprovada com a utilização de outras ferramentas estatísticas como o gráfico de Pareto e ANOVA.

Nota-se em todas amostras o comportamento unimodal e gaussiano das leituras. O comportamento unimodal indica que não há a agregação das Ag-NPs e conseqüentemente a absorção de luz em outros comprimentos de onda. A distribuição gaussiana é simétrica em relação a sua média podendo-se observar poucos pontos fora do desvio padrão.

Os parâmetros indicados nas varreduras serviram para obter as respostas analíticas e gerar a superfície de resposta (Figura 12) a partir da qual foi possível determinar o ponto estacionário das concentrações de CMC e NaBH_4 .

Figura 12. Superfície de resposta obtida em função das concentrações de NaBH₄ e CMC utilizadas no planejamento fatorial para determinação das condições ideais para síntese de Ag-NPs.

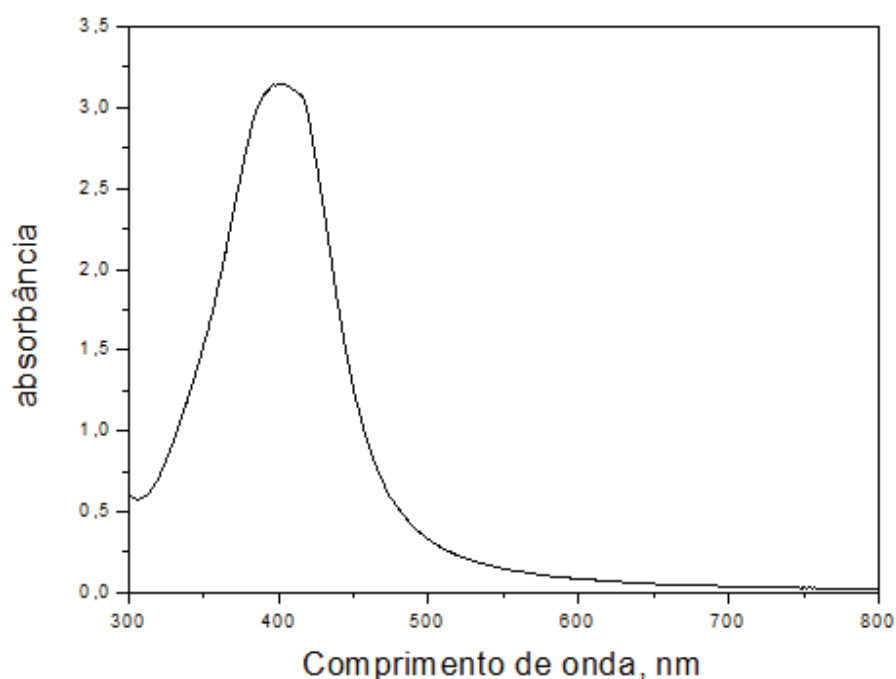


A superfície de resposta apresenta uma região estacionária bem definida com concentrações de CMC e NaBH₄ a partir de 0,055% e 0,004 mol L⁻¹ respectivamente. As áreas referentes às respostas analíticas dos pontos axiais ficaram distantes do ideal. O ponto central das concentrações, valores médios das concentrações de CMC e NaBH₄, ficou no limite da região estacionária, por isso selecionou-se o ponto medial dessa área, denominado ponto estacionário, admitindo-se que este representa as concentrações ideais. O ponto estacionário possui as seguintes concentrações: 0,07% (m/v) de CMC, 3,5 x 10⁻⁴ de AgNO₃ e 6,0 x 10⁻³ de NaBH₄.

7.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA OTIMIZADAS

A síntese das Ag-NPs pelo método químico é um procedimento que permite mais uniformidade e reprodutibilidade quando comparado com os outros métodos, conforme demonstrado pela caracterização das Ag-NPs. A varredura UV-Vis (Figura 13) e a micrografia MET (Figura 15) da amostra otimizada (0,07% (m/v) de CMC; $3,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AgNO₃; $6,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NaBH₄) forneceram informações sobre a forma, tamanho e dispersão das nanopartículas formadas.

Figura 13. Varredura UV-Vis da amostra de Ag-NPs otimizada sintetizada - 0,07% (m/v) CMC; $3,5 \times 10^{-4}$ AgNO₃; $6,0 \times 10^{-3}$ NaBH₄.



Fonte: Autor, 2019.

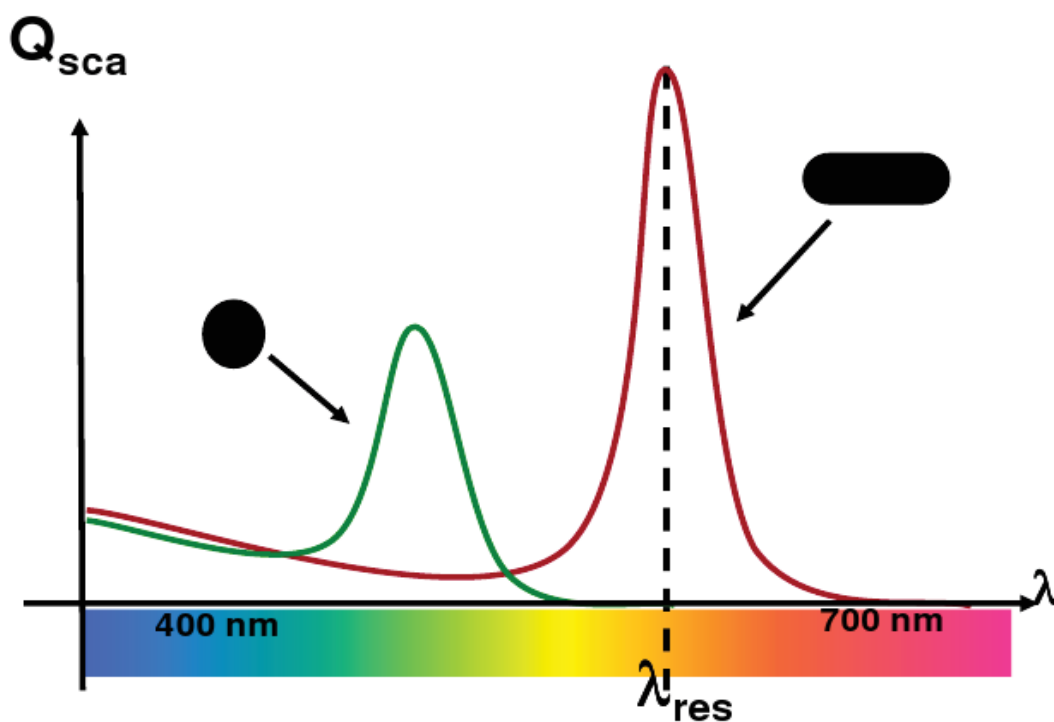
Observando a varredura nota-se uma banda única e elevada em um valor de comprimento de onda próximo a 390 nm no valor de absorção máxima semelhante aos resultados de ALMEIDA et al., 2015 e FERNANDES, 2014. Essa banda é a BPS, característica de metais nobres como a prata. A ausência de outras bandas, característica denominada como unimodal, é explicada pela não agregação das Ag-NPs, sugerindo uniformidade e absorção da luz pelas Ag-NPs no mesmo comprimento de onda.

Os elevados valores de absorbância máxima ($A_{m\acute{a}x}$) e os baixos valores da largura da banda a meia altura (FWHM) da Figura 13 confirmam a efetividade do planejamento fatorial e

design utilizado e a seleção correta do ponto estacionário representando as condições ideais de síntese.

Outro aspecto notável surge ao avaliar a posição da banda BPS pressupondo-se que as Ag-NPs são de formato esférico. Quando a banda BPS se encontra em um valor de comprimento de onda próximo a 390 nm comumente as Ag-NPs são esféricas e o deslocamento da banda BPS para outros comprimentos de onda significa que as Ag-NPs possuem formatos diferentes conforme indicado na Figura 14.

Figura 14. Caracterização do formato e tamanhos das nanopartículas de prata (Ag-NPs) a partir da observação do deslocamento da banda plasmon de superfície (BPS) em relação ao comprimento de onda absorvido onde a absorvância é máxima ($A_{\text{máx}}$).



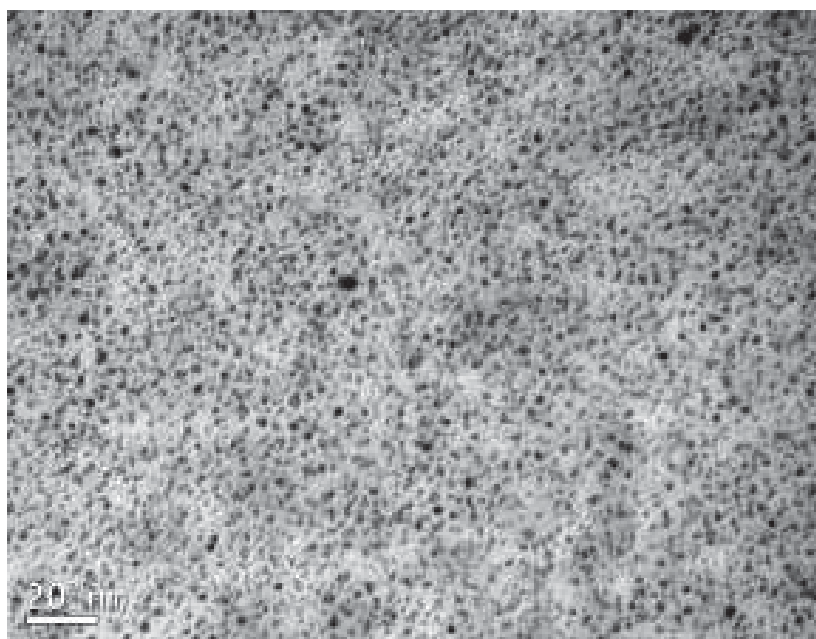
Fonte: SCHUBERT.

A micrografia do MET (Figura 15) revelou que as Ag-NPs são, aproximadamente, esféricas o que confirmou o pressuposto observado no UV-Vis. A imagem possibilitou também a medição do diâmetro médio das Ag-NPs utilizando o *software ImageJ*. Através do histograma de distribuição de tamanho (Figura 16), o diâmetro médio das Ag-NPs foi estimado em $2,01 \pm 0,54$ nm.

GARCIA (2011) relatou que os diâmetros médios de Ag-NPs sintetizadas utilizando CMC e NaBH_4 e cuja banda BPS se encontra próxima aos 400 nm variam entre 5 – 10 nm, mas em seu trabalho encontrou o diâmetro médio de 14 nm. A diferença entre os valores obtidos

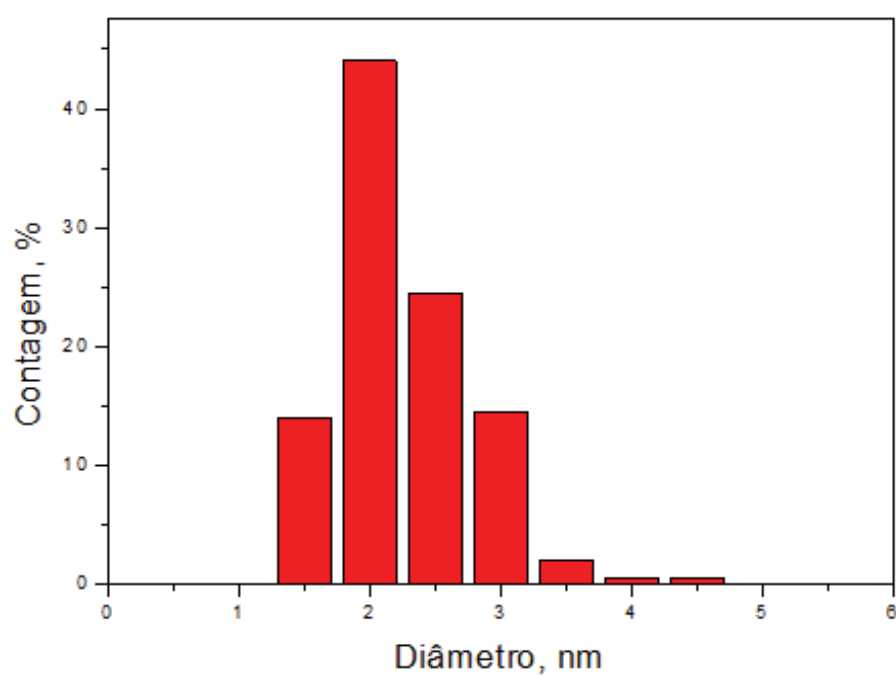
está relacionada com as concentrações dos reagentes utilizados e com a metodologia empregada ao passo que em seu trabalho a adição do NaBH_4 foi realizada por gotejamento, enquanto que nesse trabalho foi realizada a adição total do reagente ao mesmo tempo.

Figura 15. Micrografia MET da amostra de Ag-NPs sintetizadas no ponto estacionário - 0,07% (m/v) CMC; $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 ; $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NaBH_4 .



Fonte: Autor, 2019.

Figura 16. Histograma de distribuição de tamanhos da amostra de Ag-NPs sintetizadas no ponto estacionário - 0,07% (m/v) CMC; $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 ; $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NaBH_4



Fonte: Autor, 2019

7.3 TESTE DE DIFUSÃO EM PLACA

O teste de difusão em placa foi utilizado para verificar a formação de halos de inibição e observar o efeito das concentrações de Ag-NPs no processo de inibição das bactérias avaliadas.

Inicialmente utilizou-se discos de papel impregnados com as Ag-NPs, mas não houve a formação de halos. As possibilidades para o ocorrido foram a interação entre as cargas da CMC e do papel que impossibilitaram a difusão do agente antimicrobiano no ágar e o volume de nanopartículas colocado.

A utilização de poços possibilitou a difusão das Ag-NPs no meio sem restrições aparentes com volume e concentração de prata conhecidos, porém a dificuldade em conceber os poços e a não padronização da quantidade de ágar nas placas foram problemas que apareceram. O primeiro ponto é a questão de praticidade, pois é um processo demorado e trabalhoso. O segundo, e mais importante, é que como as placas continham volumes diferentes de ágar a difusão não foi homogênea em todas as placas testadas o que pode ter interferido minimamente nos diâmetros dos halos formados.

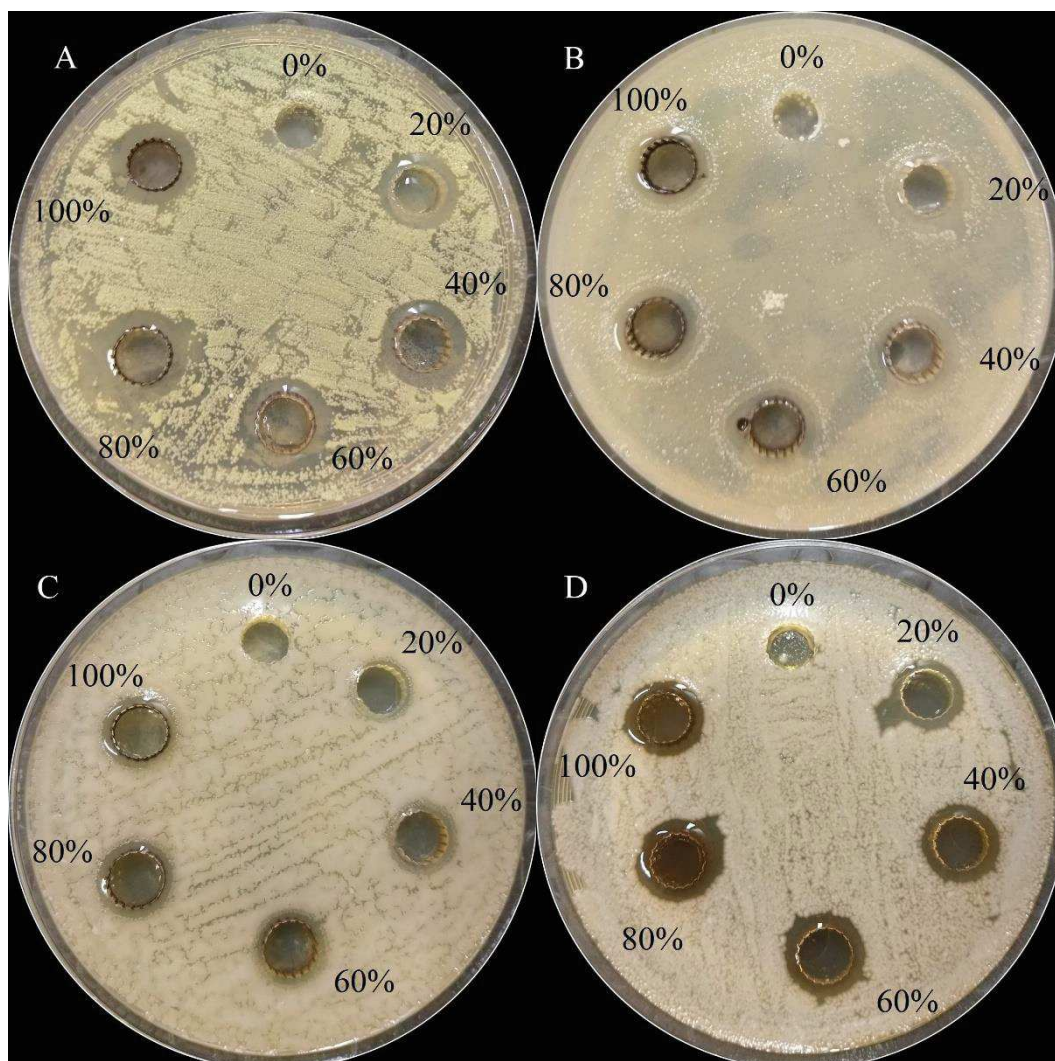
A partir das médias dos diâmetros dos halos formados e das respectivas concentrações (Tabela 4) levantou-se hipóteses para os resultados obtidos tendo em vista a não elucidação dos efeitos antimicrobianos das Ag-NPs. A Figura 17 apresenta uma das triplicatas do teste de difusão em placa realizado.

Tabela 4. Medidas dos halos formados a partir do teste de susceptibilidade de acordo com a respectiva diluição/concentração de Ag⁰.

Diluição – Porcentagem de Ag-NPs presente (%)	Concentração de Ag ⁰ (µg/ mL)	Valores médio das medidas dos diâmetros dos halos de inibição (cm)			
		<i>C. perfringens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	0	0	0	0	0
20	0,0943	1,4	1,5 ± 0,1	1,1	1,3 ± 0,1
40	0,1887	1,5 ± 0,1	1,5	1,1	1,4
60	0,2831	1,5	1,5	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1
80	0,3775	1,5	1,5	1,2	1,5
100	0,4719	1,6	1,6	1,2	1,5

Fonte: Autor, 2019.

Figura 17. Teste de difusão para *Clostridium perfringens* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Escherichia coli* (C) e *Pseudomonas aeruginosa* (D) e respectivas diluições das Ag-NPs em porcentagem.



Fonte: Autor, 2019.

Comparando-se os valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos para a *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* com os diâmetros obtidos por FERNANDES (2014) nota-se que para a bactéria Gram positiva os resultados foram similares, entretanto para as Gram negativas os resultados obtidos nesse trabalho foram inferiores. SANTANA, GOMES e MARCONE (2015) também utilizaram o método da disco-difusão, mas obtiveram halos com diâmetros menores para todas as bactérias avaliadas nesse trabalho. A diferença entre os resultados se deve às diferenças entre as NPs sintetizadas e a diferença entre as metodologias utilizadas para difundir o agente antimicrobiano.

Destaca-se no teste de difusão a capacidade das Ag-NPs em inibir o crescimento da *P. aeruginosa*, uma bactéria resistente a diversos antibióticos existentes no mercado e um dos

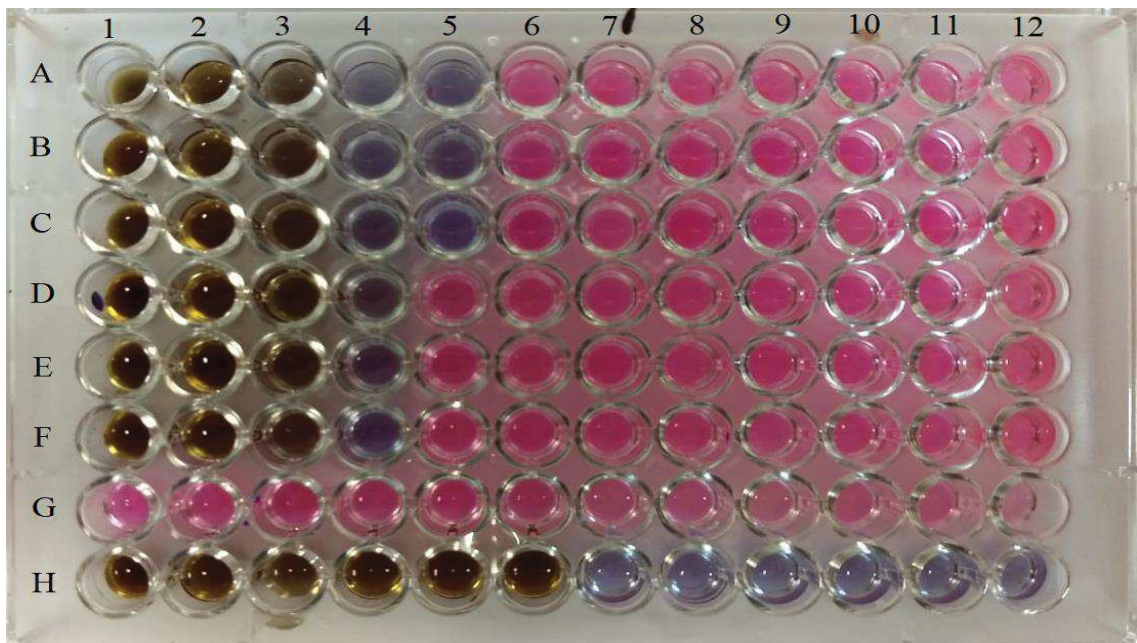
patógenos mais preocupantes para a saúde humana e questões hospitalares, pois, além de ser responsável por infecções e outras doenças, ela também produz biofilmes que entopem diversos equipamentos prejudicando seu funcionamento.

7.4 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA

Utilizou-se a microdiluição em placa para quantificar quais seriam as CIM, ou seja, as concentrações capazes de inibir o crescimento bacteriano. Notou-se grande uniformidade entre as triplicatas fazendo com que a CIM ficasse bem definida para todas as bactérias. Os resultados foram confirmados tanto pela formação do precipitado celular quanto pelo corante resazurina que permaneceu azul na ausência do metabolismo celular e oxidou-se em resorufina de coloração rósea.

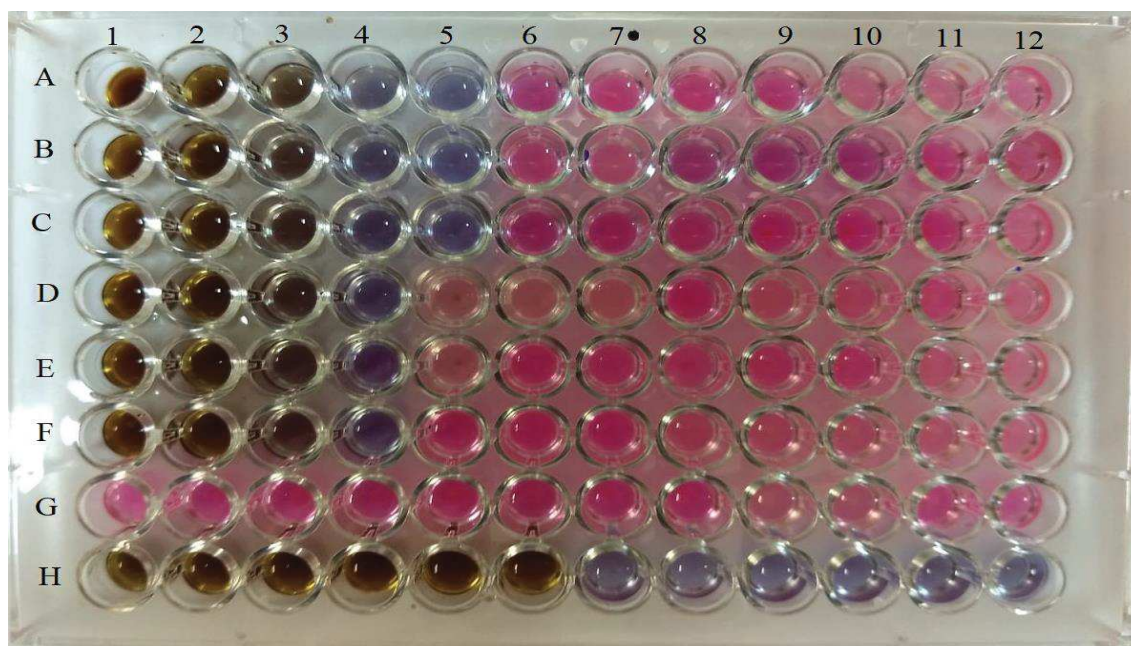
Os testes de microdiluição estão demonstrados nas Figuras 18 e 19. Onde percebe-se a cor rosa indica que houve o crescimento bacteriano e onde existe a coloração azul não houve. Os poços com a coloração amadeirada possuem tal cor devido a elevada concentração de Ag-NPs. A CIM é entendida como a última concentração onde a coloração dos poços ficou visivelmente azul.

Figura 18. Microdiluição em placa para determinação da CIM para *Escherichia coli* (em triplicata nas linhas A, B e C) e *Pseudomonas aeruginosa* (em triplicata nas linhas D, E e F).



Fonte: Autor, 2019.

Figura 19. Microdiluição em placa para determinação da CIM para *Clostridium perfringens* (em triplicata nas linhas A, B e C) e *Staphylococcus aureus* (em triplicata nas linhas D, E e F).



Fonte: Autor, 2019.

As CIM estão indicadas na Tabela 5, onde também se encontram dados comparativos com as CIM da ampicilina, um antibiótico comumente utilizado no controle bacteriológico.

Tabela 5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanopartículas de prata (Ag-NPs) e ampicilina para *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactérias	CIM de Ag ⁰ (% v/v)	CIM de Ag ⁰ (µg/mL)	CIM de ampicilina (µg/mL)
<i>C. perfringens</i> (ATCC 3624)	3,125	0,0149	Não realizado
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	6,25	0,0299	0,097
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	3,125	0,0149	1,56
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	6,25	0,0299	Resistente

Fonte: Autor, 2019.

Os resultados mostraram que as Ag-NPs possuem ação antibacteriana nas concentrações mínimas encontrada contra todas as cepas testadas, sendo a *C perfringens* e *E. coli* as que

apresentaram maior sensibilidade com uma CIM de $0,0149\mu\text{g/mL}$. FERNANDES (2014) encontrou valores de CIM iguais para *P. aeruginosa* e valores maiores para a *S. aureus* e *E. coli*, mas utilizando Ag-NPs e cepas bacterianas diferentes das testadas nesse trabalho. Não foram encontrados trabalhos que utilizassem Ag-NPs como agente antibacteriano contra *C. perfringens*.

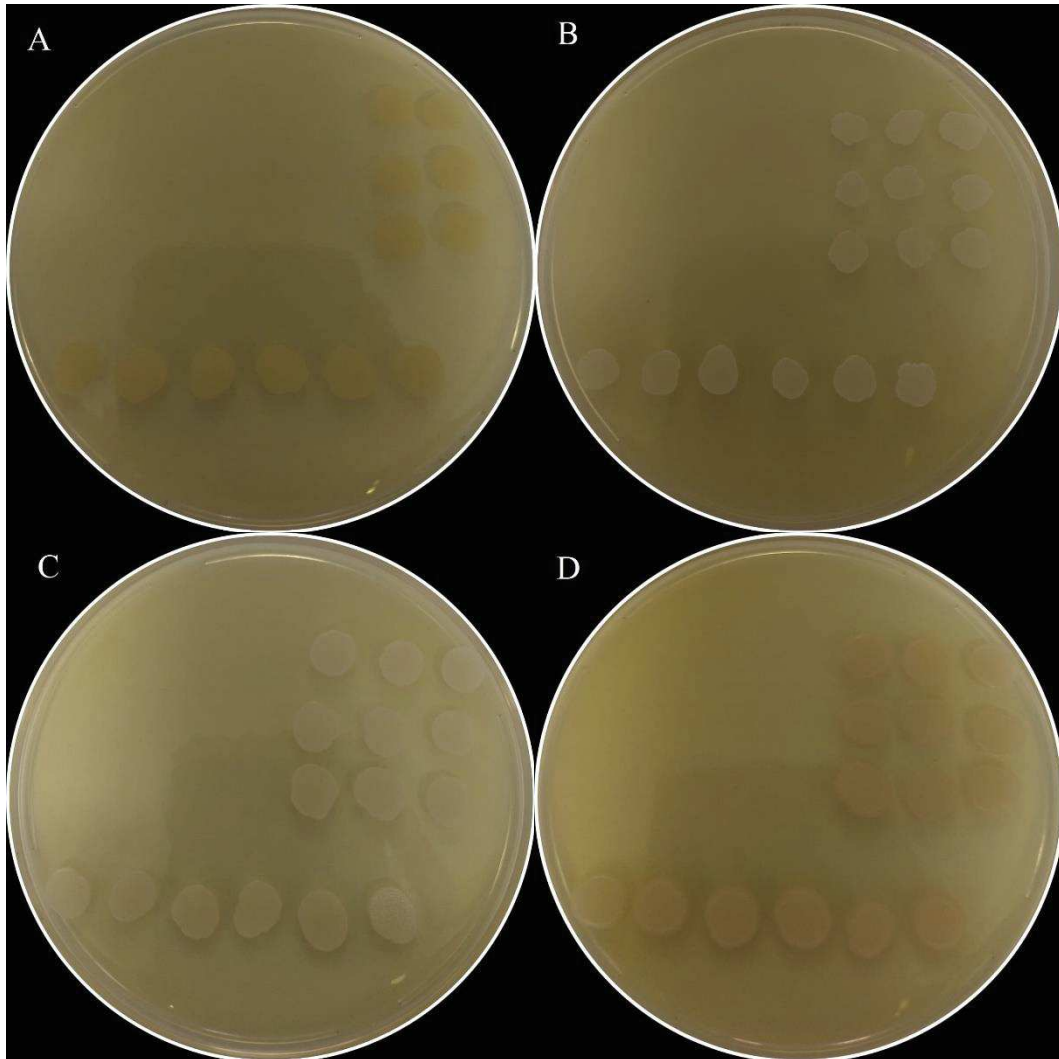
Quando se compara esses valores de CIM das Ag-NPs com os de ampicilina nota-se que esses são menores, a exceção a *C. perfringens* que não foi avaliada. Esses resultados são de grande valia uma vez que as bactérias têm se desenvolvido cada vez mais e adquirindo resistência contra os antibióticos mais comuns sendo necessário o desenvolvimento de antibióticos novos e mais fortes como é o caso da *P. aeruginosa* avaliada nesse trabalho.

7.5 SPOT TEST

O *spot test* foi utilizado para identificar a CBM (concentração bactericida mínima) dos agentes antimicrobianos. Esse teste é subsequente à microdiluição em série, pois retira-se uma pequena quantidade das diluições para realizar o teste e identificar a CBM. Normalmente a CBM possui valores de concentrações maiores que a CIM, pois é necessário maiores concentrações de agente para matar os micro-organismos do que aquelas capazes de inibir o crescimento bacteriano.

O teste (Figura 20) apresentou resultados importantes (Tabela 6) nos quais se pode observar que as Ag-NPs foram capazes de eliminar completamente as bactérias quando em concentrações mais elevadas.

Figura 20. *Spot test* para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para *Clostridium perfringens* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Escherichia coli* (C) e *Pseudomonas aeruginosa* (D).



Fonte: Autor, 2019.

Nota 1: As três primeiras linhas são amostras retiradas das placas de microdiluição contendo Ag-NPs, meio de cultivo e bactérias. A última linha representa o controle bacteriano.

Tabela 6. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanopartículas de prata (Ag-NPs) em porcentagem e $\mu\text{g/mL}$ para *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactérias	CBM de Ag^0 (%)	CBM de Ag^0 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. perfringens</i>	3,125	0,0149
<i>S. aureus</i>	6,25	0,0299
<i>E. coli</i>	6,25	0,0299
<i>P. aeruginosa</i>	6,25	0,0299

Fonte: Autor, 2019.

Os valores obtidos demonstraram que as Ag-NPs são eficazes no combate às bactérias avaliadas, pois foram capazes de eliminar as bactérias avaliadas em baixas concentrações quando comparadas as CBM encontradas por FERNANDES (2014).

Os valores de CBM são similares aos da CIM sendo maior apenas para a *E. coli*. Comumente os valores de CBM são maiores que os da CIM, pois a concentração para eliminar as bactérias normalmente é maior que a concentração para inibir o crescimento o que torna o resultado plausível. Valores idênticos de CBM e CIM podem ocorrer, mas para atestar sobre os resultados verificados no experimento observou-se a presença de precipitado celular nas placas de microdiluição antes de adicionar a resazurina. Nas outras três bactérias restantes não houveram as deposições de células no fundo dos poços indicados pela CBM e CIM, resultado também atestado pela coloração da resazurina, e que validam os testes realizados.

Não se identificou contaminação e/ou outros pontos de crescimento bacteriano originados de possíveis respingos na hora da pipetagem o que indica que o procedimento foi realizado corretamente.

CONCLUSÃO

Neste trabalho comprovou-se as propriedades antibacterianas das Ag-NPs descritas pela literatura e a partir dos resultados obtidos foi possível inferir os seguintes entendimentos:

- A otimização das variáveis através da escolha do “*design*” experimental modelo de superfície de resposta com planejamento fatorial de dois níveis se mostrou um método rápido e eficiente para determinar a melhor condição de síntese das Ag-NPs.
- O processo de síntese através do método químico possibilita a reprodutibilidade e alinhamento das características das Ag-NPs. A padronização do elemento de estudo proporciona uma economia de tempo e recursos em experimentos ao determinar as condições de preparo ideais cabendo ainda a utilização de novas condições dependendo do objetivo do estudo.
- A caracterização das Ag-NPs trouxe informações importantes e se fez essencial para especificar as suas particularidades. O formato e a não agregação das Ag-NPs pode ser identificado observando a banda BPS no espectrofotômetro. A micrografia do TEM corroborou pressuposto na espectrometria e forneceu os diâmetros e dispersão das Ag-NPs. Ainda que tragam informações relevantes, outros testes como DLS e absorção atômica podem complementar a caracterização das Ag-NPs.
- A difusão é um teste qualitativo podendo apenas inferir se existe ou não o efeito antimicrobiano, mas sem nenhuma informação sobre concentração. Os resultados desse teste são mais evidentes quando a difusão dos agentes inibidores no meio ocorre sem interferências.
- Através da determinação da CIM e da CBM conclui-se que as Ag-NPs possuem efeitos significativos sobre as atividades bacterianas mesmo quando comparados a antibióticos.

De maneira geral, verifica-se um elevado potencial de aplicação das Ag-NPs no combate às bactérias ao passo que estas se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos utilizados e o desenvolvimento dos mesmos é trabalhoso e demorado. Além disso, comprovou-se que as Ag-NPs são eficazes tanto para bactérias Gram negativas quanto para Gram positivas, o que aumenta sua gama de utilização.

Estudos futuros poderão ser realizados visando purificação e aplicação das Ag-NPs em filmes/blendas poliméricas e superfícies, uma vez que ranhuras podem ser de difícil acesso para limpeza. Além disso, pesquisas envolvendo o efeito antimicrobiano contra outros microorganismos patogênicos, como alguns fungos, representam novas oportunidades de estudo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. O. de. **Clonagem e expressão do gene da toxina beta de Clostridium perfringens tipo B e sua aplicação na imunização de animais**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-8GLQEZ/1/marcelle.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2019.

ALMEIDA, J. C. B. et al. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata. In: ENEMP - CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, 37., 2015, São Carlos - Sp. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. São Carlos: Blucher, 2015. v. 2, p. 2040 - 2048. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/enemp2015/TC-699.pdf>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**. Vol. 9, Nº 18. 2004. Disponível em: <http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/138/132>. Acesso em 06 nov. 2019.

BALLOTTIN, D. P. M. **Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecido antimicrobianos**. 2014. 235 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2014. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/248431/1/Ballottin_DanielaPottMarinho_D.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2019.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 nov. 2019

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. **Colibacillosis in: saif w. M. Diseases of poultry**. 11ª edição. Iowa, p. 138-144, 2003.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, S.; BRUNS, R.E.B. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas-SP: Editora Unicamp, 1995. 278p

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Nanociência e nanotecnologia como temáticas para discussão de ciência, tecnologia, sociedade e ambiente. **Ciênc. educ.** (Bauru), Bauru, v. 16, n. 2, p. 479-490, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-73132010000200014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 nov. 2019.

BENEDITO, A. DE S.; SILVA, F.F.; SANTOS, I. V. de S. Nanopartículas de prata: aplicações e impacto ambiental. **Revista Oswaldo Cruz**, São Paulo - SP, ano 4, nº. 16. outubro - dezembro. 2017. Disponível em: <http://revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Edicao_16_BENEDITO_Aline_de_Souza.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2019.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p.455-469. 2009. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=440462&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22MACARI,%20M.%22&qFacets=autoria:%22MACARI,%20M.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 23 out. 2019.

BRASIL. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” – Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. ***Clostridium perfringens*/intoxicação alimentar**. 2011 Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/bacterias/2011_6cperfring_revisado.pdf>. Acesso em: 24 out 2019.

CADIOLI, L.P. e SALLA, L.D. **Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia**. 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/277043046_Nanotecnologia_um_estudo_sobre_seu_historico_definicao_e_principais_aplicacoes_dest_a_inovadora_tecnologia>. Acesso em 06 nov. 2019.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ?. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.

CASTRO, A. e PANDOLFELLI, V. Revisão: conceitos de dispersão e empacotamento de partículas para a produção de concretos especiais aplicados na construção civil. **Cerâmica**. Vol 55. 2009. P 18-32. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/250982629_Revisao_conceitos_de_dispersao_e_empacotamento_de_particulas_para_a_producao_de_concretos_especiais_aplicados_na_construcao_civil/citation/download>. Acesso em: 14 out 2019.

CERRUTTI, B. M. **Estabilização de suspensões aquosas de alumina pela adição de taninos e quitosana quaternizada**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75131/tde-18052007-144050/en.php>>. Acesso em: 12 out. 2019.

CHERNAKI-LEFFER, A.M. et al. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.4, n.3, p. 243-247, 2002.

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents*; Approved Guideline. NCCLS document M26-A, 1999.

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard—Ninth Edition. NCCLS document M7-A9, Vol. 32, N°. 2, 2012.

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; Approved Standard —Twelfth Edition. NCCLS documento M2-A12, Vol. 35 N°. 1, 2015.

DURAN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 206-213, fev. 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422019000200206&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 nov. 2019.

ELIAS, W. C.; EISING, R.; SILVA, T. R.; ALBUQUERQUE, B. L. *Screening the formation of silver nanoparticles using a new reaction kinetics multivariate analysis and assessing their catalytic activity in the reduction of nitroaromatic compounds*. **J. Phys. Chem. C** 2014, 118, 12962–12971.

ESTADOS UNIDOS. NANO.GOV. **NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE**. Disponível em: <http://www.nano.gov/timeline>. Acesso em: 06 nov. 2019.

ESTADOS UNIDOS. *Woodrow Wilson International Center for Scholars e Project on Emerging Nanotechnology* (org.). **Nanotechnology consumer product inventory**. 2019. Disponível em: <<https://www.wilsoncenter.org/publication-series/project-emerging-nanotechnologies>>. Acesso em: 02 dez. 2019.

FERNANDES, P. E. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. 2014. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2014. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/510/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

FERREIRA, L. L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 114p. 2005.

FEYNMAN, R. P. **“There's Plenty of Room at the Bottom”**. Encontro Anual da Sociedade Americana de Física, Caltech, California, 1959.

FURLANETTO, M. C. S. **Desenvolvimento de filmes de carboximetilcelulose com nanopartículas de prata e avaliação de sua atividade antimicrobiana e toxicidade**. 2014. 147 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos- UFSCAR. São Carlos, 2014. Disponível em: < <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6315>>. Acesso em: 06 nov. 2019.

GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Ciência Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2011. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266890/1/Garcia_MarcusViniciusDias_M.pdf>. Acesso em: 14 out. 2019.

GODALE, C. H. e SHARON, M. **Contemporary History of Nanotechnology. History of Nanotechnology**. Cap. 8, p.213–269. 2019. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119460534.ch8>>. Acesso em: 03 out 2019.

GUIMARÃES, K. L. **Singularidades associadas ao mecanismo de estabilização eletroestérica e seus efeitos sobre o comportamento reológico de suspensões concentradas.** 2008. 141 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Materiais, Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo - Sp, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3133/tde-29012009-135414/en.php>>. Acesso em: 21 out. 2019.

IMAGINARIO, A. **Catedral de Notre-Dame (Paris).** 2019. Disponível em: <<https://www.culturagenial.com/catedral-notre-dame-paris/>>. Acesso em: 09 set. 2019.

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial. SANTOS, P. R. e NUNES, J. S. **Cenário mundial do patenteamento em nanobiotecnologia. Rio de Janeiro - RJ.** 2010. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/informacao/arquivos/nanobiotecnologia_estudo_verso_final.pdf>. Acesso em: 03 set. 2019.

KAUCZ, A. P. **Síntese e caracterização de nanopartículas metálicas e nanotubos de carbono ancorados em superfície de sílica com potencial utilização em sensores baseados em fibras ópticas.** 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2017. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/48529/R%20-%20D%20-%20ANA%20PAULA%20KAUCZ%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 06 nov. 2019.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico Microbiológico.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 11, parte 1.

LACEY, M. E. Q.; SCHIRMER, W. N. O uso da fotocatalise para a desinfecção e desodorização do ar interno. **Ambiência Guarapuava**, Guarapuava - PR, v. 4, n. 2, p.309-325, 05 mar. 2008. Disponível em: <<https://revistas.unicentro.br/index.php/ambiencia/article/view/171/214>>. Acesso em: 15 dez. 2019.

LARA, H. H. et al. *Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds.* **J Nanobiotechnology.** v. 9, agosto, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21812950>. Acesso em 22 out 2019.

LEE, P.C.; MEISEL, D. *Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols.* **The Journal of Physical Chemistry** 86 (17), 3391-3395. 1982. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/j100214a025>>. Acesso em: 04 out. 2019

LNLS - LABORATÓRIO NACIONAL DE LUZ SÍNCROTON. (Org.). **Luz síncrotron.** CAMPINAS – SP. Disponível em: <<https://www.lnls.cnpm.br/o-lnls/o-que-e-luz-sincrotron/>>. Acesso em: 03 set. 2019.

LOPES, J. R. **Síntese de nanopartículas de prata (NpsAg) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina.** 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/322079/1/Lopes_JosiasRogerio_M.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2019.

MARCONE, G. P. de S. Nanotecnologia e nanociência: aspectos gerais, aplicações e perspectivas no contexto do Brasil. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, Vol. 7, nº. 2, 2015. Disponível em: <<https://revistascientificas.ifrj.edu.br/revista/index.php/revistapct/article/view/588/377>>. Acesso em: 06 nov. 2019.

MARTENDAL, E. **Aplicação de planejamento fatorial fracionário e boxbehnen para otimização de extração com microgota para determinação de tricloroanisol e tribromoanisol de amostras de vinho por cromatografia a gás**. 2007. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2007. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/90327/271261.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 25 out. 2018.

MORONES, J. R. et al. *The bacterial effect of silver nanoparticles*. **J Nanotechnology**. v. 16, agosto. P. 2346 – 2353. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818017>. Acesso em: 22 out 2019.

OLIVEIRA, W.F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **RPCV** (2004) 99 (552) 211-214.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1ª ed. Porto Alegre: editora Artmed 512p, 2005.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 44-48 Jul, 2013. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252013000300014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 nov. 2019.

RIBEIRO, M. O. et al. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de Mycobacterium tuberculosis à isoniazida e rifampicina. **J. bras. pneumol.**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 365-370, ago. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132004000400011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 dez. 2019.

ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. Londres. Disponível em: <https://royalsociety.org/~media/Royal_Society_Content/policy/publications/2004/9693.pdf>. Acesso em 06 nov. 2019.

SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de Escherichia coli isoladas em psitacídeos com diferentes manifestações clínicas**. 2008. 76 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

SANTANA, M.C.; GOMES, D.R.L.; MARCONE, G. P. de S. Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.7, n. 1, 2015.

SANTOS, A. L. dos et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, dezembro, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442007000600005&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 23 out. 2019.

SCHUBERT, O. **Optical properties of plasmonic nano-particles**. Disponível em: <www.os-cs.de>. Acesso: 09 de outubro de 2018.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. *Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities*. **Adv Colloid Interface Sci**. Vol. 154, setembro, 2008. P 83 – 96. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945421>. Acesso em 22 out 2019.

SHIPWAY, A. N.; WILLNER, I. *Nanoparticles as structural and functional units in surface-confined architectures*. **Chemical Communications**, [s.l.], n. 20, p.2035-2045, 1 out. 2001. Royal Society of Chemistry (RSC). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12240156>>. Acesso em: 06 nov. 2019.

SILVA, C. G. da. Nanotecnologia: o desafio nacional. In: **Parcerias Estratégicas**, n. 18, p. 5-8, 2004. Disponível em: <<http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/131/125>>. Acesso em 06 nov. 2019.

SILVA, L. P. **Nanopartículas verdes: Plantas do cerrado são usadas na produção de nanossistemas para controle de patógenos e pragas da agricultura, entre outras aplicações**. Pesquisa Pesquisa FAPESP, São Paulo (SP), edição 223, 70-73p, setembro 2014. Disponível em: < http://revistapesquisa.fapesp.br/wpcontent/uploads/2014/09/070-073_Nanoverde_223.pdf?7ba38f>. Acesso em: 06 nov. 2019.

SOARES, T. S. C. **Efeito de nanopartículas de prata em neutrófilos humanos**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Controle de Qualidade, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto - Portugal, 2014.

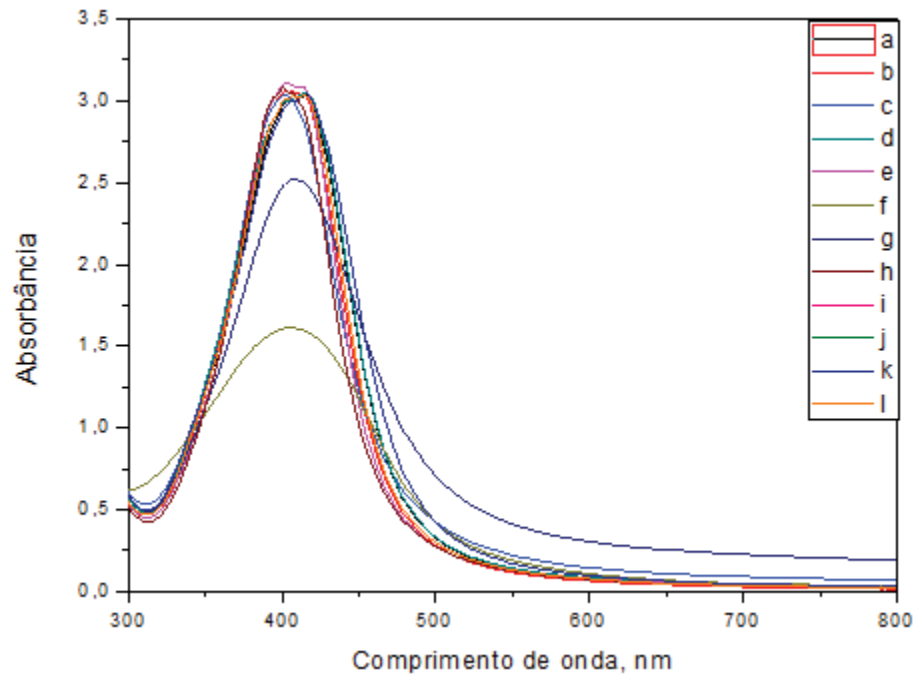
TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **MICROBIOLOGIA**. *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005.

VANCE, M. E. et al. *Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, 6, 1769-1780. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26425429>>. Acesso em 06 nov. 2019.

WHATMORE, R. W. *Nanotechnology: big prospects for small engineering*. **Revista Ingenia** n° 9. agosto, 2001. p. 28-34. Disponível em: < <https://www.ingenia.org.uk/getattachment/Ingenia/Issue-9/Nanotechnology-big-prospects-for-small-engineering/Whatmore.pdf>>. Acesso em: 03 out 2019.

APÊNDICE 1

Figura 21. Varreduras UV-Vis das amostras de Ag-NPs sintetizadas conforme o planejamento fatorial. Amostra (a): 0,0775% de CMC e $7,625 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 ; (b): 0,028% de CMC e $7,625 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 ; (c): 0,028% de CMC e $2,875 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 ; (d): 0,0775% de CMC e $2,875 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 . (e): 0,055% de CMC e 10×10^{-3} mol/L de NaBH_4 . (f): 0,055% de CMC e $0,5 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 . (g): 0,1% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 . (h): 0,01% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 . (i) 0,055% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 . (j) 0,055% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 . (k) 0,055% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 . (l) 0,055% de CMC e $5,25 \times 10^{-3}$ mol/L de NaBH_4 .



Fonte: Autor, 2019