

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**EDUARDO FONSECA MAIA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
ANISOTRÓPICAS PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA**

**CURITIBA**

**2021**

**EDUARDO FONSECA MAIA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
ANISOTRÓPICAS PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA**

**Synthesis and Characterization of Anisotropic Silver Nanoparticles for  
Biological Application**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química, do Departamento de Química e Biologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador(a): Profa. Dra. Marcela Mohallem Oliveira

**CURITIBA**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**EDUARDO FONSECA MAIA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
ANISOTRÓPICAS PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química, do Departamento de Química e Biologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Data de aprovação: 3 de dezembro de 2021

---

Renata Danielle Adati  
Doutora em Química  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Tatiane Brugnari  
Doutora em Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná

---

Marcela Mohallem Oliveira  
Doutora em Química  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**CURITIBA**

**2021**

Dedico este trabalho à minha família, pelos  
momentos de apoio e ao meu padrinho, Francisco Santos,  
que me guia pelo céu.

## AGRADECIMENTOS

Acredito que quando estamos perto de realizar um sonho, ficamos cada vez extremamente extasiados a ponto de emocionarmos com tal feito, porém, não somos unicamente quem deve carregar tal conquista. Foram anos que não foram nem um pouco fácil e que cada vez mais pude descobrir quem sou de verdade, graças a todos que facilitaram tanto este caminho árduo, então, agradecer se faz mais que necessário.

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família, minha mãe Cintia, meu pai Altair e meu irmão Maick e ao restante da família, por todo o suporte possível e em todos os sentidos, sem vocês, eu não teria dado nem meu primeiro passo, nem meu último.

Também gostaria de agradecer ao GQNano pelo acolhimento, por serem meus amigos e colegas, por dividirem esta jornada e pela paciência comigo. Um agradecimento em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcela Mohallem Oliveira por apoiar cada ideia louca que eu tinha e pela maravilhosa orientação como cientista e como ser humano.

Claramente que meus amigos merecem em especial um espaço neste texto. Como apenas uma página é permitida, gostaria de pedir desculpas se o seu nome não estiver aqui, mas você sabe muito bem que me ajudou. Porém, gostaria de dar menção aos meus amigos Alfredo Leithold, Álvaro Marques, Brayan Silva, Brenda Venturi, Carlos Schneider, Caroline Moreira, Frederico Tecchio, Gabrielly Michalsky, Gustavo Machado, Julia Ketzer, Lincoln Gabriel, Lívia Rosangela, Morgana Kuwaki, Rafaela Pinheiro, Ricardo Ali Bark, Sophia Queiroz, William Peddinghaus e Wilson Oliveira por acompanharem bem de perto.

Finalmente, gostaria de agradecer a UTFPR e ao DAQBi pela oportunidade e estrutura para poder cursar a graduação que mais sonhei, assim como ótimos profissionais disponíveis e as demais oportunidades e caminhos que pude trilhar (viva a Universidade Pública!), a Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica e as demais instituições que contribuíram para minha formação.

E eu também gostaria de me agradecer por não ter desistido e ter aguentado muita coisa que aguntei.

Por isto, serei eternamente grato e prometo que não pararei por aqui!

*“Leitor das estrelas, pioneiro que ninguém se lembrará, eu honro sua batalha. Tenha uma boa jornada até o fim. Eu oro por céus limpos no final de sua viagem.”*

*(Merlin, Fate/Grand Order, 2020).*

## RESUMO

Os nanomateriais (NM) fazem parte de uma classe recente de materiais que exploram características diferentes dos mesmos já pertencentes ao cotidiano tecnológico, porém apresentando novas propriedades proporcionadas pelo seu tamanho em escala nanométrica. Dentre todos os NM, as nanopartículas metálicas (NPs) tem tido destaque por apresentarem características ópticas e de interesse biológico alteradas e melhoradas quando comparadas aquelas dos seus sólidos estendidos, o que possibilita diferentes aplicações. O controle das propriedades ópticas dessas NPs é dependente tanto do controle do seu tamanho quanto também do seu formato, podendo assim influenciar em como as propriedades podem ser utilizadas em diferentes tipos de dispositivos. Neste trabalho, teve-se como objetivo a síntese e a caracterização de nanopartículas de Prata anisotrópicas, sintetizadas em solução aquosa, de modo a se estudar a modificação das propriedades da NP de Prata com a modificação do seu formato. A rota escolhida para a síntese das NPs de Prata foi a rota química, onde o íon Prata é agitado com Ácido L-Ascórbico e Solução Estabilizante contendo Citrato de Sódio, Acetato de Sódio e Polietilenoglicol, durante 10 minutos em solução aquosa. Foram feitas modificações nesta rota, como a alteração da ordem de adição e ainda a concentração de reagentes no meio reacional, para avaliar o efeito de cada uma na formação de partículas anisotrópicas. Cada amostra foi caracterizada através da espectroscopia UV-Vis. As NPs resultantes tem aplicação potencial tanto em dispersão aquosa ou ainda depositadas em substrato de sílica. Também foi realizado um levantamento bibliográfico para avaliar a possível aplicação das NPs como agente antimicrobiano e como agente antitumoral, além da relação de sua toxicidade com a sua composição.

**Palavras-chave:** Nanomateriais; Nanotecnologia; Funcionalização em sílica; Absorção plasmon; Aplicações Biológicas;

## ABSTRACT

Nanomaterials (NM) are part of a recent class of materials that explore the different characteristics of them that already belong to everyday technology, but new properties provided by their size on the nanometric scale. Among all NM, metallic nanoparticles (NPs) stand out for presenting altered and improved optical and biological characteristics when compared to those of their extended solids, which allows for different applications. Controlling the optical properties of these NPs is dependent on both their size and shape control, and can thus function as the properties can be used in different types of devices. In this work, the objective was the synthesis and characterization of anisotropic silver nanoparticles, synthesized in solution, in order to study the modification of the properties of Silver NP with a modification of its shape. The route chosen for the synthesis of Silver NPs was the chemical route, where the Silver ion is stirred with L-Ascorbic Acid and a Stabilizing Solution containing Sodium Citrate, Sodium Acetate and Polyethylene Glycol for 10 minutes in an aqueous solution. Modifications were made in this route, such as changing the order of addition and even the concentration of reagents in the reaction medium, to assess the effect of each one on the formation of anisotropic particles. Each sample was characterized using UV-Vis spectroscopy. NPs have potential application both in aqueous dispersion and deposited on silica substrate. A bibliographical survey was also carried out to evaluate a possible application of NPs as an antimicrobial agent and as an antitumor agent, in addition to the relationship of their toxicity and their composition.

**Keywords:** Nanomaterials; Nanotechnology; Silica functionalization; Plasmon absorption; Biological Applications;.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Taça de Lycurgus, século IV d.C.....	14
Figura 2 - Representação da oscilação plasmon para nanopartículas esféricas.....	15
Figura 3 - Níveis de energia em partículas de semicondutores (a) e de metais (b), comparados aos materiais bulk e aos átomos isolados (EF = energia do nível de Fermi).....	16
Figura 4 - Representação da oscilação plasmon para nanopartículas de tipo bastão	17
Figura 5 - Representação da estrutura de uma fibra ótica, apontando cada um de seus componentes.....	18
Figura 6 - Fluxograma de Metodologia para Síntese, Caracterização e Funcionalização de nanopartículas.....	21
Figura 7 - Fluxograma da Metodologia para Lavagem de Lâminas .....	23
Figura 8 - Fluxograma representativo de funcionalização de lâminas.....	24
Figura 9 - (a) Espectros UV-Vis correspondente a cada precursor da rota de síntese realizada; (b) normalização dos resultados obtidos, para efeito de comparação.....	27
Figura 10 - (a) Espectros UV-Vis correspondente a cada rota de síntese após a purificação; (b) normalização dos resultados obtidos, para efeito de comparação.....	29
Figura 11 - (a) Espectros UV-Vis correspondente ao estudo de estabilidade depois de um mês de síntese (a) comprimentos de onda e absorbâncias obtidas (b) normalização dos resultados obtidos, para efeito de comparação.....	31
Figura 12 - Esquema que representa (a) a funcionalização da sílica com o APTES e (b) a deposição das nanopartículas metálicas sobre a sílica.....	33
Figura 13 - Mecanismo e ação da cisplatina.....	38
Fotografia 1 - Fotografia das soluções precursoras de síntese de NPs de prata: (a) rota de síntese base; (b) Citrato 0,05 mol; (c) Citrato 0,005 mol; (d) reprodutibilidade da amostra; (e) alteração na ordem de adição de reagentes; (f) Etileno Glicol; (g) $\text{AgNO}_3$ $5,84 \times 10^{-3}$ ; (h) $\text{AgNO}_3$ $5,84 \times 10^{-5}$	26
Fotografia 2 - Fotografia das dispersões de síntese de NPs de prata: (a) rota de síntese base; (b) Citrato 0,05 mol; (c) Citrato 0,005 mol; (d) reprodutibilidade da amostra; (e) alteração na ordem de adição de reagentes; (f) Etilenoglicol; (g) $\text{AgNO}_3$ $5,84 \times 10^{-3}$ ; (h) $\text{AgNO}_3$ $5,84 \times 10^{-5}$ .....	29
Fotografia 3 - Fotografia das lâminas de sílicas com NPs de para funcionalizada, onde (a) lamina em contato com solução precursora sob agitação magnética, por 10 minutos, (b) contato com solução precursora sem agitação por 10 minutos e (c) contato com solução precursora sem agitação por 1 hora.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da síntese de cada amostra proposta no trabalho.....	22
Tabela 2 - Valores de comprimento de onda, largura à meia altura e área obtidos para os espectros da Figura 9.....	28
Tabela 3 - Valores de comprimento de onda, largura à meia altura e área obtidos para os espectros da figura 10.....	30
Tabela 4 - Valores de comprimento de onda, largura à meia altura e área obtidos para os espectros da figura 11 .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

$\mu$	Micro
Ag <sup>0</sup>	Prata sólida
Ag <sup>+</sup>	Íon de Prata
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Prata
APTES	(3-aminopropil) trietoxisilan
BSA	Albumina de soro bovino
DCF	(2'-7'-diclorofluoresceína)
DCFH-DA	(Diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína)
DRX	Difratometria de raios X
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	(2,2-difenil-1-picril-hidrazil)
e <sup>-</sup>	Elétrons
EG	Etileno Glicol
FTIR	Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HNO <sub>3</sub>	Ácido Nítrico
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água Oxigenada
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
LDH	Lactato Desidrogenase
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
Raman	Espectroscopia Vibracional Raman
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo de difeniltetrazólio)
NaAc	Acetato de Sódio
nm	Nanometro
NM	Nanomateriais
Ntec	Nanotecnologia
NP	Nanopartícula
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
UV-B	Raios Ultravioleta B
UV-Vis	Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Dispositivos ópticos e eletrônicos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Anisotropia.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3</b>	<b>Aplicações - Optoeletrônica.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4</b>	<b>Rota de Síntese de referência.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Redução do Cátion Prata.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Alterações da rota de síntese.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Limpeza das Lâminas de Sílica.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Funcionalização de lâminas de Sílica com APTES.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5</b>	<b>Deposição das Nanopartículas.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6</b>	<b>Caracterização.....</b>	<b>24</b>
<b>3.7</b>	<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Síntese, caracterização e funcionalização.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Revisão bibliográfica.....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a descoberta de novos materiais são de suma importância para a construção do conhecimento na química, a partir da caracterização de novos elementos, que levaram a construção da tabela periódica, assim como a organização dos conhecimentos científicos de maneira geral (Tolentino & Rocha-Filho, 1997; Pilachowski, Sneden, & Wallerstein, 1983). Com a continuidade destes estudos, classificou-se os materiais na divisão que conhecemos hoje (metais, cerâmicas, polímeros, semicondutores e compósitos), porém tal divisão falha ao não considerar os polímeros condutores e os nanomateriais (NM) (Zarbin, 2007).

Devido a tendência da nanotecnologia (Ntec) de compatibilidade de eletrônicos gerais do dia a dia, os NM têm ganhado destaque, visando o aprimoramento do macroscópico para a escala nanométrica, o que contribui intensamente em diversos ramos de diferentes áreas. Os NMs apresentam características diferentes daquelas dos seus sólidos estendidos devido ao seu tamanho, e também à possibilidade diferentes estruturas. (Martins & Trindade, 2012).

Apesar do estudo de nanomateriais ter tido de grande destaque em meados do século XXI, a síntese e utilização de NMs diversos já podiam ser previamente observadas. Devido às suas propriedades de absorção de luz, a aplicação de NPs já era presente para modificações de características visuais, como vitrais das igrejas medievais e até mesmo o famoso caso da Taça de Lycurgus (século IV d. C.) na Figura 1, taça produzida em Roma com material vítreo, que, em função da presença de NPs de Prata e Ouro, sob luz transmitida apresenta coloração vermelha, e sob luz refletida, coloração verde (dicroísmo). (Ferreira & Rangel, 2009; Martins & Trindade, 2012; Zarbin, 2007).

Figura 1 - Taça de Lycurgus, século IV d.C.



Fonte: Adaptado de the British Museum (2007)

Em 1857, o físico e Nobel de física, Michael Faraday, apresentou um estudo sobre como uma radiação eletromagnética interagia com a matéria que encontrasse em seu percurso. O Ouro coloidal foi o foco principal do estudo, onde a interação de determinado tamanho da partícula poderia responder em um valor diferente comprimento de onda, entretanto outros metais de transição e suas respostas frente à exposição da radiação eletromagnética também foram estudados (Faraday, 1857).

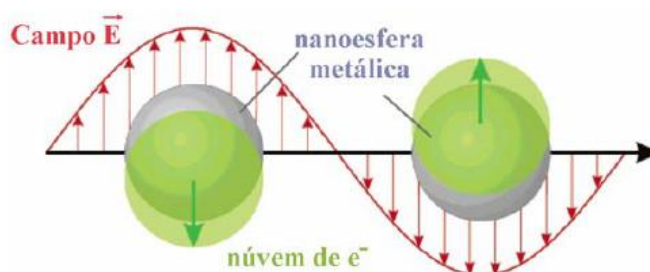
O também Nobel de Física, Richard Feynman, em 1959 apresentou uma palestra intitulada como “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” no “Encontro Anual da Sociedade Americana de Física”, onde sugeriu a possibilidade de controle e manipulação da matéria em escala atômica, assim como questionou a possibilidade de armazenar os 24 volumes da Enciclopédia Britânica na “cabeça de um alfinete” (Zarbin, 2007).

Desde então, a Química de materiais possibilitou a busca por novas propriedades a partir de elementos considerados tradicionais, sugerindo a proposta da utilização e da exploração da escala nanométrica (nm), em função de propriedades de todos os materiais serem dependentes de seu tamanho nessa escala. As NPs metálica, por exemplo, quando abaixo de um determinado tamanho (denominado tamanho crítico) específico para cada metal, passam a exibir absorções que diferem daquelas do seu sólido bulk, absorções estas bem definidas em energias específicas, denominado como bandas *plasmon*. Este efeito ocorre devido a oscilação de elétrons de condução que respondem a uma excitação óptica

frente à aplicação de um campo magnético externo (Oliveira, 2005; Jain, Huang, El-Sayed, & El-Sayed, 2007; Zarbin, 2007).

A figura 2 apresenta um esquema de como ocorre a oscilação *plasmon* exibida por uma nanopartícula, onde o campo elétrico da radiação incidente leva à formação de um dipolo magnético na NP e, em compensação, a NP tenta restaurar as cargas, ocorrendo assim uma ressonância em um comprimento de onda específico, denominado de Ressonância *Plasmon* de Superfície (SPR) (Faraday, 1857; Oliveira, 2005; Rocha, 2008).

**Figura 2 - Representação da oscilação plasmon para nanopartículas esféricas**



**Fonte: Adaptado de Oliveira (2005)**

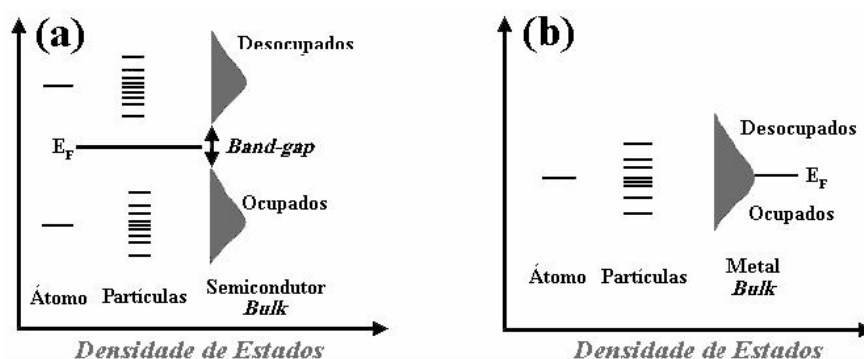
Considerando que as NPs possuem parâmetros de rede dos átomos internos igual aos de um sólido *bulk*, as diferenças nas propriedades eletrônicas e ópticas, podem ser explicadas através de duas características: a primeira é o fato de que a superfície das nanopartículas pode ser diferente do seu interior, e o fato de que defeitos no sólido podem ser considerados como “armadilhas”, aprisionando elétrons ou buracos quando as mesmas absorvem energia; e a segunda é o confinamento quântico de uma nanopartícula, onde o tamanho da nanopartícula está relacionado aos níveis discretos de energia gerados entre sua banda de valência e sua banda de condução, o que lhes confere suas propriedades particulares. Assim, essas novas propriedades das NPs podem ser utilizadas no aprimoramento de diferentes dispositivos. (Heidemann, et al., 2015; Jain et al., 2007; Zarbin, 1997).

## 1.1 Dispositivos ópticos e eletrônicos

Uma das possibilidades de aplicação de NPs é relacionada com o fato das mesmas serem classificadas como semicondutores. Através da teoria de bandas, tem-se que um sólido possui um grande número de unidades formadoras interagindo no seu retículo cristalino, fazendo com que os orbitais de mesma energia do material se desdobrem em pequenos pacotes de energia, formando bandas. A banda de maior energia que apresenta elétrons é comparada com o HOMO e a banda de menor energia desocupada é comparada com o LUMO, tendo a diferença de energia entre as mesmas conhecida como *band gap*. A movimentação de um elétron do HOMO para o LUMO em um semicondutor, causada pela sua excitação, gera uma lacuna com carga positiva, que interage com o elétron de carga negativa, formando a espécie conhecida como éxciton, que pode se deslocar por todo o retículo formador do sólido estendido. (Oliveira, 2005; Zarbin, 1997).

Através do confinamento quântico pode-se explicar a restrição do movimento do éxciton, que fica confinado nas dimensões do material, tendo como consequência a organização das bandas em níveis discretos de energia, aumentando o valor do *band gap* quanto menor for o tamanho da partícula. A figura 3 apresenta um esquema das estruturas de bandas para um semicondutor e um metal, em nível atômico, bulk e na forma de nanopartículas. (Oliveira, 2005; Zarbin, 1997).

Figura 3 - Níveis de energia em partículas de semicondutores (a) e de metais (b), comparados aos materiais bulk e aos átomos isolados ( $E_F$  = energia do nível de Fermi)



Fonte: Adaptado de Oliveira (2005)

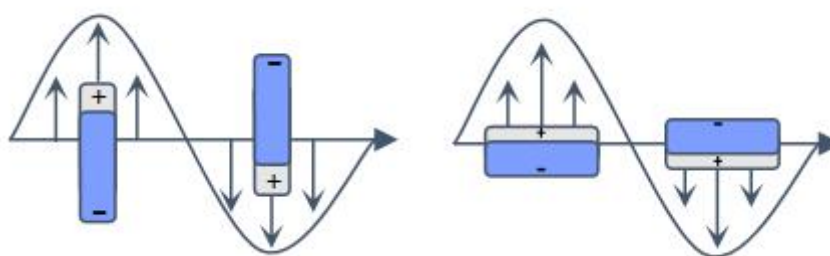


Os fatores que tem relação direta com o SPR das nanopartículas são: o tamanho médio (conforme apresentado no estudo de Faraday), o meio em que as NPs se encontram, a sua composição e o seu formato. Diferentes formatos de nanopartículas podem ser encontrados, sendo que cada um pode apresentar diferentes números de ressonância plasmônica (Faraday, 1857; Oliveira, 2005; Zarbin, 2007).

## 1.2 Anisotropia

Pode-se classificar uma NP a partir da regularidade de sua forma, sendo a partícula que apresenta regularidade nas três dimensões como isotrópica, conforme a figura 3, ou anisotrópica, que apresenta irregularidades em pelo menos uma dimensão, onde pode-se apresentar mais de uma banda *plasmon* devido às diferentes ressonâncias, como as latitudinais e longitudinais presentes em nanobastões, representadas na figura 4 (Faraday, 1857; Oliveira, 2005; Rocha, 2008).

**Figura 4 - Representação da oscilação plasmon para nanopartículas de tipo bastão**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

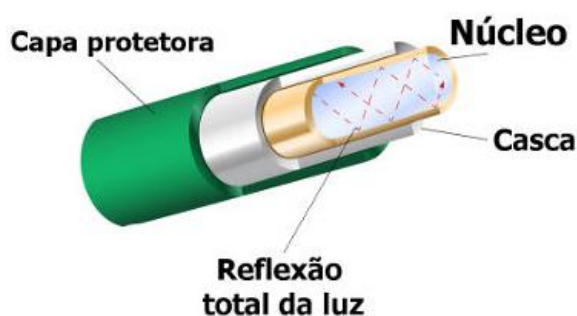
A possibilidade de controle de tamanho e formato das nanopartículas durante a síntese possibilita a obtenção de diferentes propriedades sem que haja alteração na composição química do material. As nanopartículas de determinado material possuem um tamanho denominado de tamanho crítico, onde abaixo deste, suas propriedades tornam-se diferenciadas, sendo que juntamente com o seu formato, resultam em seu grupo de propriedades, o que possibilita diversos tipos de aplicações com o mesmo material (Casanova, 2010; Oliveira, 2005; Zarbin, 2007).

### 1.3 Aplicações - Optoeletrônica

Uma das aplicações onde a SPR pode fazer melhorias interessantes está nos sensores de fibra óptica, que se destacam por serem imunes à interferências eletromagnéticas e pela alta capacidade de processamento, além de suas respostas serem rápidas e com alta sensibilidade e ainda possibilitarem monitoramento em tempo real (Wang & Zhao, 2018; Yanase et al., 2019).

A fibra óptica é um dispositivo de sílica, composta por núcleo, casca e revestimento, sendo a luz conduzida dentro do núcleo por meio da reflexão total interna e devido a esse fato a fibra é isolada de modo a garantir que a luz não seja perdida, como esquematizado na Figura 5.

**Figura 5 - Representação da estrutura de uma fibra óptica, apontando cada um de seus componentes**



**Fonte: Brasil escola (2018)**

A utilização da fibra óptica como um sensor, por exemplo, se dá em função da maneira de interação que uma radiação externa pode ter com a sua superfície, penetrando o seu revestimento e interagindo com o núcleo da fibra, intensificando seu sinal (Wei et al., 2019). A utilização de NPs torna-se importante tendo em vista que o sensoriamento depende do índice de refração do meio, assim como as alterações de sinais tanto por respostas químicas quanto por respostas físicas, e assim as NPs podem trazer tanto o aumento da intensidade do sinal (sensibilidade) quanto de sua seletividade (Wang & Zhao, 2018; Wei et al., 2019).

Também foi observado que NPs anisotrópicas possuem grande perspectivas de aplicação em intensificação de sinais na espectroscopia Raman via efeito SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*), possibilitando, por exemplo, melhorias

na obtenção de imagens Raman, como apresentado no trabalho de Jiang, Wu, Li, Li, & Xu de 2011, Li et al. de 2013 para nanoflores e Liebig et al. de 2019 para nanoestrelas. Outra possibilidade de aplicação de NPs anisotrópicas pode ser relacionada com melhorias de características de dispositivos ópticos. (De Sio et al., 2015.)

#### **1.4 Rota de Síntese de referência**

Yang et al., (2007), apresentaram o estudo sobre o crescimento de diferentes formas anisotrópicas de NPs de Prata através da utilização de PEG, Citrato de Sódio, Acetato de Sódio, Ácido L-Ascórbico em Água e outros estabilizantes, afim de observar as nanoestruturas geradas. No trabalho, a variação na estabilização (sistemas de estabilização de componentes único, duplo e triplo), tendo variação de composição entre Citrato de Sódio, Acetato de Sódio e Poli-Etileno Glicol, gerando mais de três formas de NPs, resultando em nanoestrelas, nanoprismas e NPs isotrópicas, nanoflocos de neve e nanodendrímeros para o sistema único, nanoesferas para o sistema duplo e NPs isotrópicas, nanoflores e nanoespinhos para o sistema triplo.

Assim, a proposta deste trabalho vem de encontro com o estudo da influência das variáveis de síntese, como ordem de adição dos reagentes e concentração das soluções precursoras, na produção de nanopartículas anisotrópicas de prata, possibilitando posteriormente a sua deposição em substrato de sílica para o estudo da sua utilização em diferentes aplicações ópticas e biológicas. Junto à síntese e início das caracterizações das dispersões de NPs obtidas, foi feito um estudo de trabalhos da literatura científica que mostravam possíveis aplicações para os diferentes formatos possíveis de NPs de prata, a fim de vislumbrarmos uma continuidade deste trabalho.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho está focado na síntese e na caracterização de NPs de Prata anisotrópicas em solução aquosa, promovendo a variação de reagentes, de suas concentrações e de sua ordem de adição no meio reacional para avaliação da alteração de formato, de tamanho e da estabilidade da dispersão das nanopartículas formadas, para posterior deposição em substrato de sílica e futura aplicação em biologia.

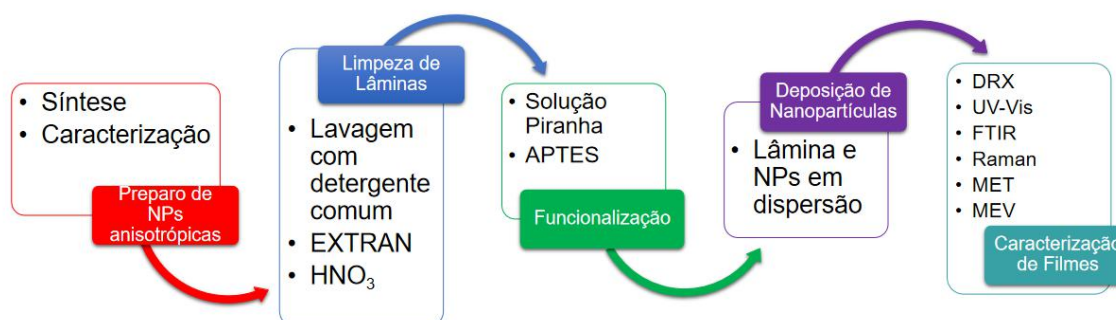
### **2.2 Objetivos específicos**

1. Sintetizar nanopartículas de prata anisotrópicas em solução aquosa, variando as concentrações da solução precursora para verificar seu efeito no material final obtido;
2. Caracterizar previamente as NPs obtidas com auxílio da espectroscopia de absorção no UV-Vis;
3. Funcionalizar lâminas de sílica com 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), para serem utilizadas como substrato para filme das NPs;
4. Depositar as nanopartículas de prata anisotrópicas em substrato de sílica por meio da sua imersão na dispersão das NPs previamente sintetizadas;
5. Obter filmes finos de nanopartículas de prata anisotrópica variando-se a concentração das dispersões utilizadas para deposição;
6. Comparar os filmes obtidos com amostras das diferentes rotas químicas analisadas;
7. Realizar levantamento bibliográfico referente à possibilidade de aplicação das NPs como agente antimicrobiano e antitumoral.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia deste projeto tem início com a síntese de NPs, e em seguida a limpeza, preparação e funcionalização das lâminas de sílica com posterior deposição das nanopartículas metálicas na sua superfície. Todos os procedimentos propostos foram baseados em referências da literatura científica e adaptações já feitas pelo Grupo de Química de Nanomateriais (GQNano) – UTFPR, Campus Ecoville. As etapas deste trabalho estão ilustradas na figura 6 abaixo.

**Figura 6 - Fluxograma de Metodologia para Síntese, Caracterização e Funcionalização de nanopartículas**



Fonte: Autoria própria (2021)

#### 3.1 Redução do Cátion Prata

Para a preparação de nanopartículas anisotrópicas, seguiu-se a metodologia de Yang et al., 2007, realizando alterações (ver item 3.2), onde inicialmente preparou-se uma solução estabilizante contendo 4,55 gramas de Acetato de Sódio P.A. (NaAc), 1,25 gramas de Polietilenoglicol (PEG) em 50 mL de Citrato de Sódio 0,005 mol/L. Após isto, a preparou-se uma mistura de 1 mL de solução estabilizante, junto com 4 mL de Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ )  $5,89 \times 10^{-4}$  mol/L, 4 mL de água deionizada e 1 mL de ácido L-ascórbico 0,79 mol/L, misturadas na exata ordem da descrição, deixando-as em repouso durante 10 minutos, onde a coloração azul pode ser indicativo da formação do precursor (semente) de nanopartículas de prata anisotrópicas. Finalizando a preparação, realizou-se dois ciclos de centrifugação, onde o primeiro corresponde a separação do líquido com as NFs, seguida da

lavagem com Citrato de Sódio 0,005 mol/L, seguindo da sua redispersão em Citrato de Sódio 0,005 mol/L.

Realizou-se a caracterização do sobrenadante do primeiro ciclo de centrifugação e após a dispersão das NPs com auxílio da Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região Ultravioleta-Visível (UV-Vis).

### 3.2 Alterações da rota de síntese

Para verificar o resultado no tamanho, forma, estabilidade das nanopartículas obtidas em cada síntese, propôs-se alterações na solução de agente estabilizante, como a troca de PEG por EG (etilenoglicol), mudanças de concentração tanto do Citrato de Sódio, como do Nitrato de Prata, assim como alterou-se a ordem de adição de reagentes. A tabela abaixo descreve como realizou-se as amostras.

**Tabela 1 - Composição da síntese de cada amostra proposta no trabalho**

Amostra	Composição					Ensaio de reprodutibilidade
	[ ] Ag (mol/L)	[ ] Citrato (mol/L)	PEG	EG	Alteração de ordem de adição	
1	$5,84 \cdot 10^{-4}$	0,0005	Sim	Não	Não	Não
2	$5,84 \cdot 10^{-4}$	0,05	Sim	Não	Não	Não
3	$5,84 \cdot 10^{-4}$	0,005	Sim	Não	Não	Não
4	$5,84 \cdot 10^{-4}$	0,0005	Sim	Não	Não	Sim
5	$5,84 \cdot 10^{-4}$	0,0005	Sim	Não	Sim	Não
6	$5,84 \cdot 10^{-4}$	0,0005	Não	Sim	Não	Não
7	$5,84 \cdot 10^{-3}$	0,0005	Sim	Não	Não	Não
8	$5,84 \cdot 10^{-5}$	0,0005	Sim	Não	Não	Não

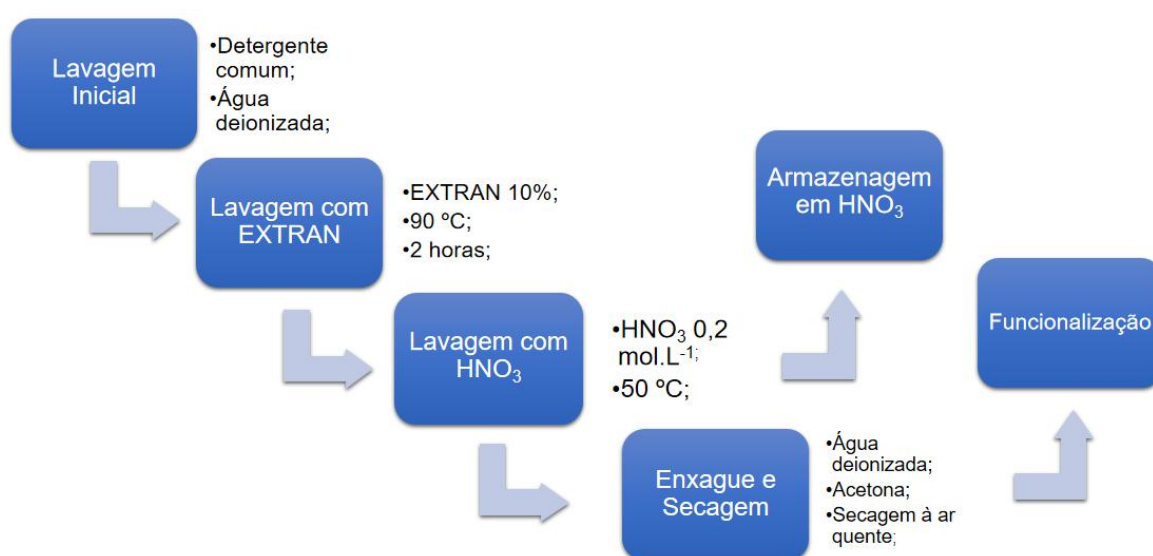
Fonte: Autoria própria (2021)

### 3.3 Limpeza das Lâminas de Sílica

Esta etapa se baseou em Pereira et al, 2016 e Ronconi et al, 2002, onde lâminas de vidro (sílica) foram previamente lavadas com esponja macia e detergente comercial, sendo enxaguadas com água, seguindo então para imersão em solução

de EXTRAN 10% (v/v), onde permaneceram durante 2 horas na temperatura de aproximadamente 90 °C. Após isso, as lâminas foram retiradas, enxaguadas e imersas em HNO<sub>3</sub> 0,2 mol/L durante 3 horas e com temperatura com aproximadamente 50 °C. Antes de sua funcionalização, as lâminas foram lavadas com água deionizada, seguida de acetona e secas com ar quente. A figura 7 ilustra como foram estas etapas.

**Figura 7 - Fluxograma da Metodologia para Lavagem de Lâminas**



Fonte: Autoria própria (2021)

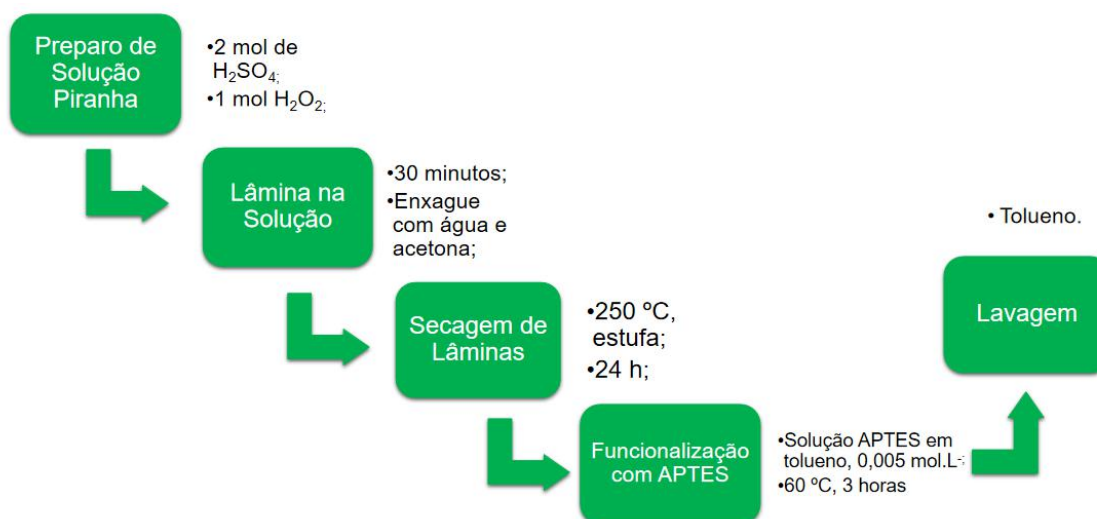
### 3.4 Funcionalização de lâminas de Sílica com APTES

Esta etapa foi baseada em adaptações dos trabalhos de Leff, Brandt, & Heath, 1996; Oldenburg, Averitt, Westcott, & Halas, 1998 e Pereira, 2016, onde as lâminas secas previamente foram mergulhas em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Solução Piranha) 2:1 respectivamente em volume, em um período de 30 minutos. Depois disso, foram enxaguadas com água e acetona, seguida de aquecimento em forno tipo mufla à 250 °C por 24 horas para secagem.

Para a funcionalização da lâmina, utilizou-se o (3-aminopropil) trietoxissilano, ou APTES, como agente funcionalizante, onde as lâminas foram mergulhadas em solução contendo 0,05 mol/L de APTES em tolueno, logo após sua secagem, sob aquecimento de aproximadamente 60 °C por 3 horas. Depois do tempo corrido, as

lâminas foram lavadas com tolueno para retirada do excesso de APTES. O processo é exemplificado no fluxograma a seguir.

**Figura 8 - Fluxograma representativo de funcionalização de lâminas**



Fonte: Autoria própria (2021)

### 3.5 Deposição das Nanopartículas

A deposição de NPs seguiu a metodologia utilizada pelo GQNano, onde se realizou a imersão das lâminas funcionalizadas de duas maneiras:

- Imersão em solução contendo NPs anisotrópicas de Prata sintetizadas, por um período de 1 minuto, 10 minutos e 1 hora sem a etapa de centrifugação;
- Imersão em solução contendo NPs anisotrópicas de Prata sintetizadas por um período de 1 hora com todos os passos da síntese.

### 3.6 Caracterização

Após todas as etapas de deposição, as amostras foram analisadas por espectroscopia UV-Vis em um equipamento Shimadzu UV-2450 *Scinco S-1100* (UTFPR, LAMAQ) para investigar qualitativamente a ocorrência de NPs, juntamente



de seu tamanho médio e distribuição de tamanhos. As medidas foram feitas na dispersão (com branco feito em água) na faixa de 200 nm a 1000 nm (Oliveira, 2005).

Além disso, a fim de compreender sua estabilidade durante o tempo, as amostras foram armazenadas a temperatura ambiente e sem contato com a luz durante um mês e realizou-se a leitura das mesmas no espectrofotômetro novamente para comparação com os resultados anteriores.

Também foram feitos tratamentos matemáticos através do programa *Origin Pro 8.5*, onde realizou-se a função *smooth (analysis, signal processing, smooth)* para eliminar possíveis ruídos apresentados nas medidas, *normalize* (selecionar coluna, botão direito do mouse, *normalize*) para analisar e compactar todos os espectros obtidos, e *deconvolution (analysis, signal processing, deconvolution)* para analisar o máximo de cada banda quando do aparecimento de bandas convoluídas, assim como acesso a informações como largura à meia altura e área de cada sinal após a deconvolução.

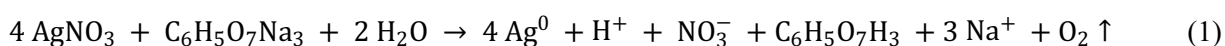
### **3.7 Revisão Bibliográfica**

Foi realizado um levantamento bibliográfico referente à utilização de NPs anisotrópicas de prata como agente antimicrobiano e agente antitumoral, onde optando-se por descrever neste documento um breve resumo de artigos selecionados para futura proposta de utilização das amostras produzidas, após a caracterização extensiva de cada amostra. Foram utilizadas as plataformas *Google Scholar* e *CAPES Periódicos*, utilizando as seguintes palavras-chave: *Silver anisotropic nanoparticles, Biological applications, Antimicrobial agents, Antitumor agents, Nanomaterial, Nanotechnology*. Também utilizou-se filtro de tempo, onde apenas artigos publicados a partir de 2010 apareceriam como resultados de busca. Foram escolhidos três trabalhos para sua descrição neste documento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Síntese, caracterização e funcionalização

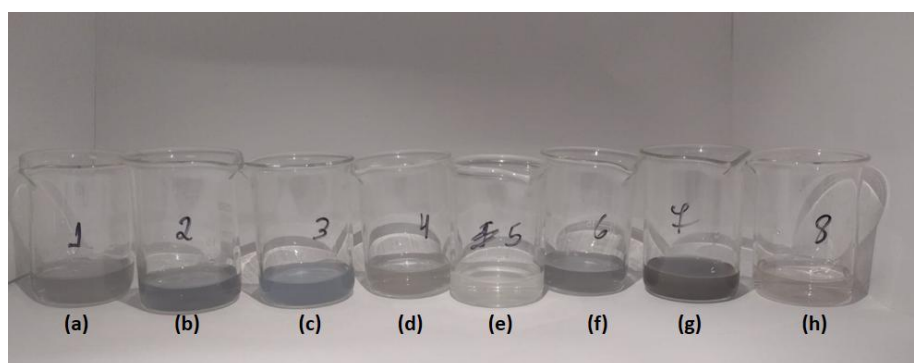
A síntese das NPs de prata anisotrópicas escolhida para este trabalho é feita em duas etapas: na primeira é feita a dispersão de “sementes” esféricas de prata e a segunda, onde as sementes são colocadas numa solução de crescimento, cujos reagentes induzem a um crescimento anisotrópico. A equação que descreve a reação é a seguinte:



Foram feitas variações nas concentrações das soluções e ainda em um componente da solução de crescimento para avaliarmos seu efeito na morfologia final das NPs.

Imediatamente após a mistura das soluções contendo sementes com a de crescimento, pode-se notar a alteração na coloração das soluções precursoras, como visto na fotografia 1, sendo um primeiro indício da obtenção das NPs.

**Fotografia 1 - Fotografia das soluções precursoras de síntese de NPs de prata: (a) rota de síntese base; (b) Citrato 0,05 mol; (c) Citrato 0,005 mol; (d) reprodutibilidade da amostra; (e) alteração na ordem de adição de reagentes; (f) Etileno Glicol; (g)  $\text{AgNO}_3$   $5,84 \times 10^{-3}$ ; (h)  $\text{AgNO}_3$   $5,84 \times 10^{-5}$**

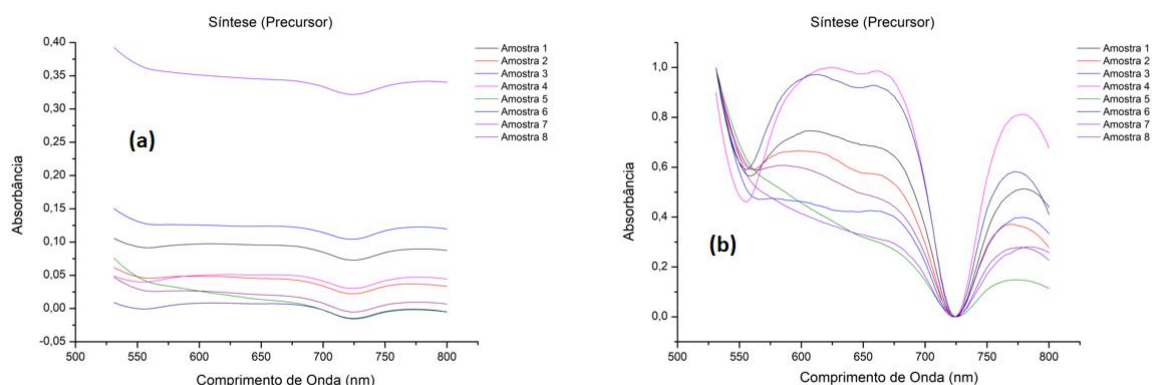


Fonte: Autoria própria (2021)

Pode-se observar que cada uma das reações propostas apresentam coloração diferente, variando do azul-acinzentado, até leve coloração amarelada, geralmente esperada para nanopartículas esféricas de prata. Cada coloração pode significar uma combinação de diferentes energias e números de banda de absorção plasmon.

Após o tempo estipulado, as amostras foram centrifugadas para sua separação do meio reacional e dos seus subprodutos de reação. Para efeito de comparação, foram feitos espectros UV-Vis de cada rota, antes e após esse processo de purificação. Os resultados da espectroscopia UV-Vis estão apresentados nas figuras a seguir (9 a e b).

**Figura 9 - (a) Espectros UV-Vis correspondente a cada precursor da rota de síntese realizada; (b) normalização dos resultados obtidos, para efeito de comparação**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

Através do tratamento de dados, pode-se observar as bandas obtidas, onde notou-se sinais entre 550 e 700 nm resultantes da convolução de mais de uma absorção. Assim, foram feitos tratamentos matemáticos em um programa apropriado, resultado na deconvolução dos sinais, explicitando os valores de energia para cada banda. Os valores estão presentes na tabela 2.

**Tabela 2 - Valores de comprimento de onda, largura à meia altura e área obtidos para os espectros da Figura 9**

	$\lambda$ (nm)	Largura à meia altura (nm)	Área (nm <sup>2</sup> )
<b>Sintese 1</b>	609	207	15
	683	42	0
	779	98	5
<b>Sintese 2</b>	599	255	24
	682	40	0
	775	118	8
<b>Sintese 3</b>	581	272	21
	680	51	1
	778	97	5
<b>Sintese 4</b>	612	120	5
	684	51	1
	778	92	4
<b>Sintese 5</b>	519	283	28
	676	0	1,57E+15
	776	112	6
<b>Sintese 6</b>	609	134	6
	684	49	1
	775	107	6
<b>Sintese 7</b>	783	99	5
	587	272	29
<b>Sintese 8</b>	682	42	0
	777	121	8

**Fonte: Autoria própria (2021)**

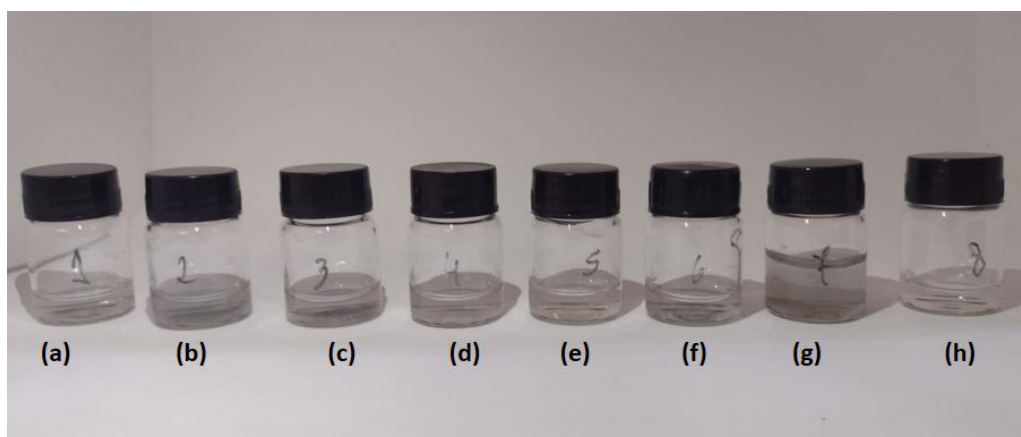
Vale mencionar aqui que a largura à meia altura e a área de banda podem ser, simplificada, relacionadas com a população que resulta na ressonância plasmônica em cada energia específica. Vale ainda mencionar que a presença de 3 bandas nos espectros podem indicar:

- i. Distribuição trimodal de esferas, uma vez que partículas esféricas apresentam apenas uma banda plasmon;
- ii. Anisotropia de crescimento das NPs.

Aqui, em função do uso de soluções de crescimento controlado, acreditamos que as NPs sintetizadas apresentam anisotropia de formas, entretanto, imagens de MET são fundamentais para a comprovação dessa hipótese.

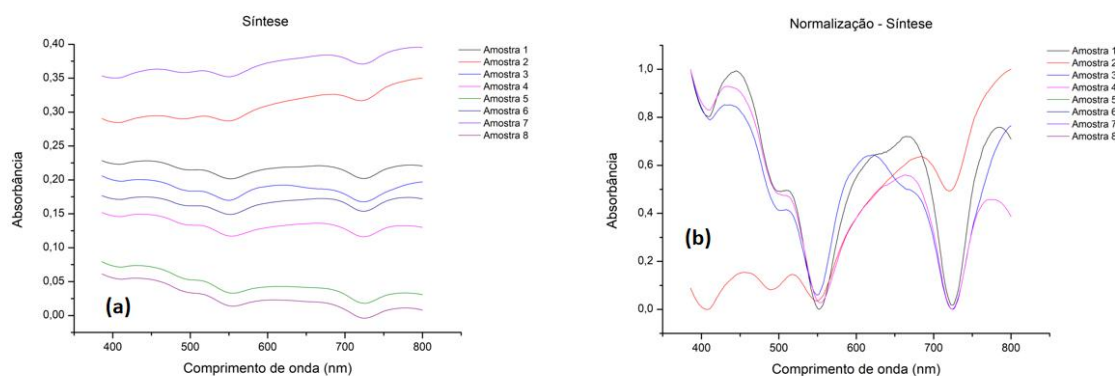
Foram feitos espectros das amostras após purificação e uma imagem das mesmas encontrou-se na fotografia 2, seguida dos espectros de cada uma das purificadas presentes na figura 10.

**Fotografia 2 - Fotografia das dispersões de síntese de NPs de prata: (a) rota de síntese base; (b) Citrato 0,05 mol; (c) Citrato 0,005 mol; (d) reprodutibilidade da amostra; (e) alteração na ordem de adição de reagentes; (f) Etilenoglicol; (g)  $\text{AgNO}_3$   $5,84 \times 10^{-3}$ ; (h)  $\text{AgNO}_3$   $5,84 \times 10^{-5}$**



Fonte: Autoria própria (2021)

**Figura 10 - (a) Espectros UV-Vis correspondente a cada rota de síntese após a purificação; (b) normalização dos resultados obtidos, para efeito de comparação**



Fonte: Autoria própria (2021)

Após a centrifugação, as amostras apresentaram colorações em tons azulados, com pequenos pontos escuros suspensos, podendo ser um indicativo de início de aglomeração.

Os espectros anteriores apresentaram em torno de 5 bandas em cada, onde pode se observar os seguintes máximos presentes na tabela 3, bem como os valores de largura à meia altura e área.

**Tabela 3 - Valores de comprimento de onda, largura à meia altura e área obtidos para os espectros da figura 10**

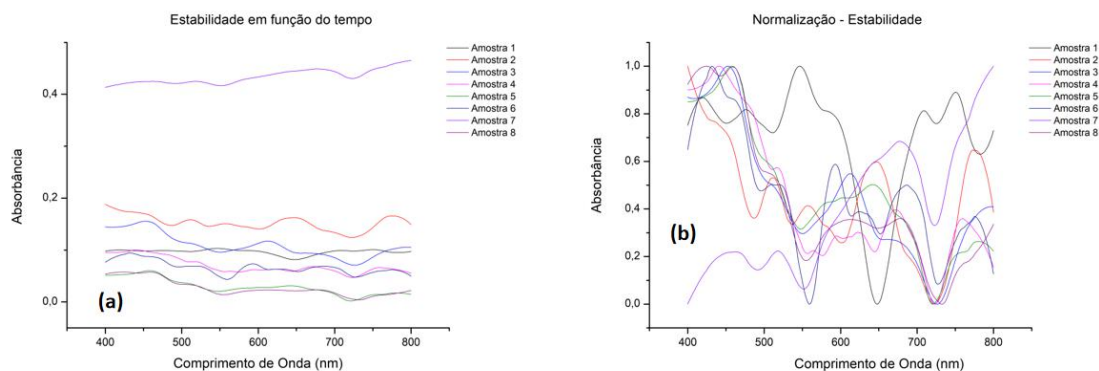
	$\Lambda$ (nm)	Largura à meia altura (nm)	Área (nm <sup>2</sup> )		$\Lambda$ (nm)	Largura à meia altura (nm)	Área (nm <sup>2</sup> )
<b>Sintese 1</b>	441	90	3	<b>Sintese 5</b>	433	112	6
	520	26	1		520	26	1
	609	80	2		615	166	10
	682	61	2		685	42	1
	783	131	11		778	115	7
<b>Sintese 2</b>	455	52	1	<b>Sintese 6</b>	439	94	3
	520	37	1		520	26	1
	593	64	1		606	80	3
	682	115	7		683	68	3
	795	141	14		781	95	5
<b>Sintese 3</b>	435	101	4	<b>Sintese 7</b>	455	56	1
	520	24	1		519	39	1
	608	88	4		598	59	1
	687	62	2		677	92	4
	803	128	9		789	129	10
<b>Sintese 4</b>	437	102	5	<b>Sintese 8</b>	431	114	7
	520	26	1		520	25	1
	618	95	3		609	145	8
	683	57	1		683	45	1
	778	135	12		778	97	5

**Fonte: Autoria própria (2021)**

Nota-se que o aumento do número de bandas visualizadas nos espectros sugerem que a alteração do precursor gerou alteração nos produtos finais, sugerindo que rota proposta resulta em nanopartículas com anisotropia, como esperado para as nanoflores que são um dos focos desse trabalho. Assim, a análise de microscopia torna-se fundamental para comprovar a obtenção das NPs anisotrópicas, como já dito anteriormente.

Com a finalidade de se estudar a estabilidade das NPs frente à passagem do tempo, foram feitos novos espectros de todas as amostras após 1 mês da síntese e os resultados estão presentes na figura 11.

**Figura 11 - (a) Espectros UV-Vis correspondente ao estudo de estabilidade depois de um mês de síntese (a) comprimentos de onda e absorbâncias obtidas (b) normalização dos resultados obtidos, para efeito de comparação**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

Os espectros anteriores apresentaram em torno de 7 bandas em cada, onde pode se observar os seguintes máximos presentes na tabela 4.

**Tabela 4 - Valores de comprimento de onda, largura à meia altura e área obtidos para os espectros da figura 11**

	$\Lambda$ (nm)	Largura à meia altura (nm)	Área (nm <sup>2</sup> )		$\Lambda$ (nm)	Largura à meia altura (nm)	Área (nm <sup>2</sup> )
<b>Sintese 1</b>	582	46	1	<b>Sintese 5</b>	436	183	16
	610	16	1		545	0	1
	639	37	1		597	140	6
	674	22	1		651	38	1
	700	23	1		691	30	1
	746	23	1		746	18	1
	777	35	1		783	63	1
<b>Sintese 2</b>	436	72	4	<b>Sintese 6</b>	431	47	2
	511	24	1		469	21	1
	557	33	1		522	48	2
	586	10	1		591	35	2
	644	57	3		630	29	1
	700	16	1		686	60	3
	777	46	3		755	28	1
<b>Sintese 3</b>	444	168	52	<b>Sintese 7</b>	782	25	1
	501	53	2		454	63	1
	587	124	6		523	37	1
	616	33	1		583	33	0
	685	49	1		628	55	2
	791	92	7		686	59	2
						749	17
<b>Sintese 4</b>	440	79	3	<b>Sintese 8</b>	804	99	6
	486	20	1		421	98	6
	563	17	1		468	27	1
	594	19	1		517	35	1
	623	29	1		613	109	3
	673	54	2		686	40	1
	702	13	1		760	12	1
				791	21	1	

**Fonte: Autoria própria (2021)**

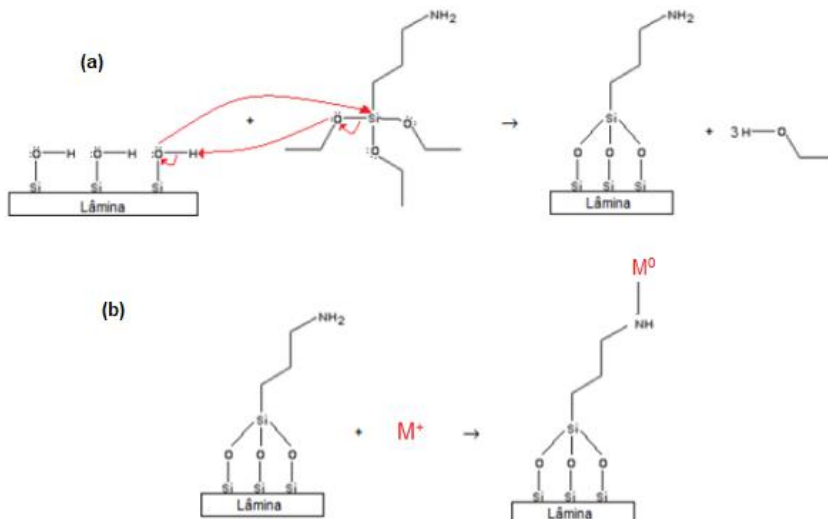
Quando comparados entre si, os espectros feitos com as amostras após um mês da síntese apresentaram o surgimento de 2 ou 3 novas bandas em relação àqueles realizados logo após as sínteses. O surgimento destas bandas indica que as nanopartículas, mesmo após sua suspensão em Citrato de Sódio, podem continuar modificando-se, sofrendo processos de aglomeração e/ou modificação na sua forma.



Finalizada a etapa inicial de síntese e purificação das nanopartículas, passamos para a segunda fase do trabalho que propõe a deposição das nanopartículas anisotrópicas em substrato de sílica, para a obtenção de filmes e futura aplicação, tanto em dispositivos ópticos quanto em substratos para SERS e ainda para aplicações em bactericidas e fungicidas. Para esta deposição, substratos de sílica foram previamente preparados, limpos e funcionalizados com o APTES, que promove a ligação da prata metálica com a superfície da sílica, resultando em um filme mecanicamente estável e apropriado para diversos usos.

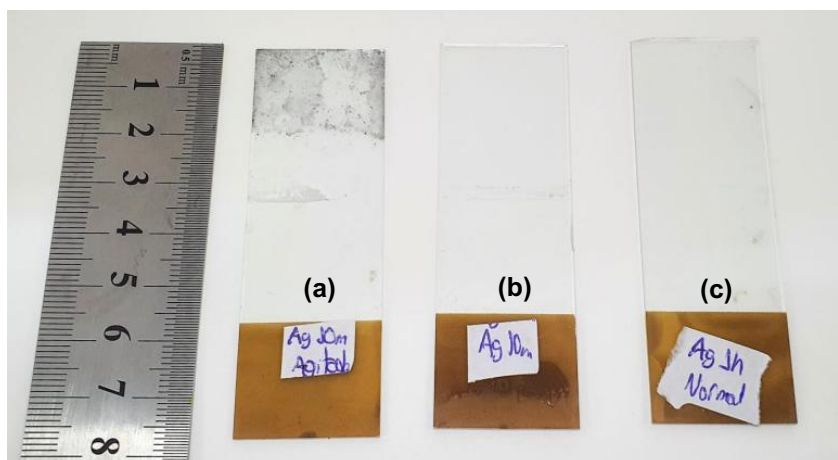
A reação de funcionalização da superfície da sílica está colocada a seguir na figura 11, e as imagens fotográficas das primeiras amostras resultantes da tentativa de obtenção de filmes estão presentes na fotografia 3, onde um filme translúcido e heterogêneo pode ser observado, indicando a necessidade da continuação dos estudos para melhoria na qualidade do filme.

**Figura 12 - Esquema que representa (a) a funcionalização da sílica com o APTES e (b) a deposição das nanopartículas metálicas sobre a sílica**



Fonte: Adaptado de Pereira (2016)

**Fotografia 3 - Fotografia das lâminas de sílicas com NPs de para funcionalizada, onde (a) lamina em contato com solução precursora sob agitação magnética, por 10 minutos, (b) contato com solução precursora sem agitação por 10 minutos e (c) contato com solução precursora sem agitação por 1 hora.**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

Nota-se que na lâmina da fotografia 3 (a), pode se observar uma coloração acinzentada formada sob apenas parte da lâmina, diferente das lâminas da fotografia 3 (b) e (c), onde um pequeno filme translúcido e uniforme pode ser observado, indicando diferentes tipos de deposição sobre a lâmina.

Ao compararmos as amostras obtidas no presente trabalho com a rota proposta no trabalho de Yang e colaboradores, 2007, notamos que a utilização de reagentes químicos como os aqui propostos resulta em amostras diferentes daquelas produzidas em sistemas biosintéticos, onde microorganismos, biomassa, extrato hidroalcolóicos, entre outros, são utilizados como agentes redutores, estabilizantes ou passivantes (estabilizantes) durante o processo de síntese.

## **4.2 Revisão bibliográfica**

Com a evolução da medicina, pode-se encontrar diversas maneiras para o tratamento de doenças, sendo uma delas a pesquisa e utilização de agentes antimicrobianos, que estão relacionados a capacidade de inibição, crescimento e contaminação por microorganismos. Estes agentes são responsáveis pelos tratamentos das infecções em seres humanos há bastante tempo, porém, o uso indiscriminado de alguns destes compostos acabaram se tornando objeto de estudo,

a partir do momento em que muitos microorganismos desenvolveram resistência a certos tipos de medicamentos. (Rempel, 2019; Ghenov, 2014).

Tendo em vista esta problemática, o estudo de novos agentes microbianos tem ganhado destaque, justamente para buscar alternativas para que se possa contornar a resistência aos medicamentos tradicionais. (Sangappa, 2017; Tang, 2013).

No artigo “*Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using silk fibroin: characterization and antimicrobial properties*” publicado por Sangappa et al. na *Materials Research Innovations* em 2017, os autores apresentam uma rota de síntese verde, utilizando-se fibras de seda como estabilizador para a produção e utilização de nanopartículas anisotrópicas de Prata, utilizadas como agente antimicrobiano, testando-as contra alguns microorganismos para sua inibição. Neste trabalho, além das fibras de seda utilizadas como solução estabilização, foi utilizada radiação UV-B para a obtenção das NPs.

Em função do tamanho extremamente reduzido, nanopartículas são termodinamicamente instáveis, tendendo a aglomerarem e conseqüentemente sair do regime nano de tamanhos. Assim, existe a necessidade do uso de métodos de estabilização que podem ser feitos: i) via adição de carga na superfície das NPs, evitando que aglomerem por efeito da repulsão, ou ainda ii) via adição de um agente passivante que se liga quimicamente às NPs, criando uma capa protetora que evita a aglomeração das NPs via efeito estérico. No trabalho de Sangappa, as fibras de seda serviram tanto para estabilização das NPs, quanto para mediar o crescimento anisotrópico das nanopartículas.

As NPs obtidas foram caracterizadas por Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região Ultravioleta-Visível (UV-Vis), Difractometria de Raios X e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), que são também as técnicas de caracterização sugeridas para a continuidade deste trabalho.

Com os resultados de absorção no UV-Vis, observa-se que conforme há um aumento na concentração de prata também ocorre aumento na intensidade das bandas em cada espectro, podendo-se dizer que sua contribuição crescente dos modos de absorção plasmon resulta no deslocamento ao vermelho do máximo de absorção.

Utilizou-se o Microscopia Eletrônica de Transmissão para acompanhar a evolução dos formatos das nanopartículas em função da diferença de concentração das soluções estabilizantes. Pode se observar que em concentrações mais baixas, as reações resultaram em uma quantidade menor de nanopartículas resultantes, além de que, conforme se aumenta a concentração, as amostras resultam em diferenças de formatos .

Também pode-se observar que a radiação UV-B foi de essencial auxílio na redução do íon  $Ag^+$  para  $Ag^0$ , além de ser de suma importância para as diferentes morfologias, tendo em vista que, em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa, a radiação de lâmpadas incandescentes resultou apenas na redução de alguns íons para  $Ag^0$ , além da não obtenção de NPs anisotrópicas (Shivananda, 2016).

Foi realizado o ensaio antibacteriano para avaliar seu potencial de aplicação, através do método de difusão em disco, onde avalia-se a inibição do crescimento de um microorganismo pelo seu repique em uma placa de Petri e, ao centro da mesma, coloca-se um disco infundido com a amostra a ser analisada como antimicrobiano, através da medida do diâmetro de inibição de crescimento, em milímetros.

Utilizou-se 5 diferentes microorganismos e através da análise feita, observou-se que as NPs foram efetivas contra bactérias gram-negativas em concentrações mais baixas quando comparada com as demais, além de serem efetivas também contra um fungo, onde a maior concentração apresentou melhor resultado, porém não pode se observar atividade contra bactérias gram-positivas. Ainda comparado com trabalhos anteriores, os resultados foram mais satisfatórios (Shivananda, 2016; Shivananda, 2016).

Neste caso, a maneira de interação das nanopartículas com as bactérias e fungos foi avaliada como ocorrendo via membrana plasmática. Para bactérias gram-negativas, a membrana tem camada exterior constituída de lipopolissacarídeo e na interior de peptidoglicanos, possuindo entre 7 a 8 nm, além de que ambas as suas estruturas são ligadas covalentemente, justificando sua falta de rigidez e resistência mecânica. Neste caso, as nanopartículas de prata tendem a apresentar maior facilidade para penetrar a membrana, ligando-se ao enxofre nas proteínas ou ao fósforo no DNA. Com esta interação, ocorrem mudanças estruturais que danificam a parede, podendo resultar na morte celular. Em casos de bactérias gram-positivas, as mesmas apresentam camada mais espessa de peptidoglicanos de cerca de 20 a

80 nm, sendo constituída de cadeias reticuladas por peptídeos curtos, reforçando a estrutura do polímero e podendo impedir a entrada das nanopartículas.

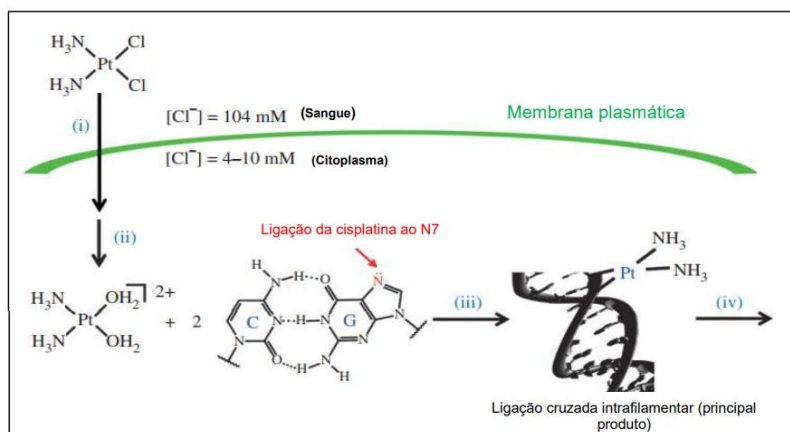
Outro artigo trabalho que mostra a aplicação de NPs anisotrópicas de prata é o “Greensynthesis of anisotropic silver nanoparticles and its potential cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7)” desenvolvido por Gurunathan et. al., na Konkuk University em 2013 e publicado no periódico *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, onde foi mostrada a utilização de nanopartículas de prata como agente antitumoral.

Tumores tem sido considerados um dos maiores temores da sociedade de maneira geral desde sua descoberta, sendo que esta doença está entre as mais letais no mundo todo. Eles são caracterizando-se pelo crescimento celular descontrolado de células geneticamente alteradas, existindo em inúmeros tipos diferentes. (Almeida et al, 2004; Barra, Netto, 2015).

A procura para tratamento desse tipo de doença tem crescido, e uma das maneiras conhecidas para combater os tumores se dá com o uso da quimioterapia, que destaca-se por poder tratar casos de metástase precoce das células cancerígenas. A utilização de fármacos contra tumores teve seu início por volta de 1942, tendo destaque complexos de platina, como a cis-platina. Geralmente este complexo metálico tem sua ação relacionada ao DNA da célula, onde visa-se atingir o mesmo para regular funções pela modulação da expressão gênica ou pela interferência da replicação (Barra, Netto, 2015).

Alguns agentes antitumorais conhecidos são não-específicos, atacando tanto células tumorais, quanto as não-tumorais, causando efeitos colaterais danosos durante o tratamento da doença, apresentando a necessidade de estudos voltados a tratamentos que ataquem especificamente as células tumorais, sem causar desconforto à qualidade de vida do paciente. Neste caso, o tratamento utilizando nanopartículas tem ganhado destaque devido a sua possibilidade de controle de propriedades através da sua síntese, controlando fatores como tamanho, forma, meio reacional e partículas a serem reduzidas, sendo que seu mecanismo de ação geralmente está relacionado a apoptose natural de células, onde as NPs identificam as células tumorais a partir das características específicas depositando-se então nesta células (Oliveira et al, 2012; Lopes, Torres, 2019).

**Figura 13 - Mecanismo e ação da cisplatina**



Fonte: Adaptado de Ferreira (2017)

Como exemplo, tem-se o trabalho de Gurunathan et. al., na *Konkuk University* em 2013, onde nanopartículas de prata foram utilizadas como agente antitumoral. O estudo tem como objetivo sugerir uma síntese verde, com boa relação custo-benefício, rápida ação, ambientalmente amigável e com resultados não-tóxicos a outras células, utilizando a bactéria *Escherichia fergusonii* no meio reacional, para potencial aplicação como agente antitumoral em células de câncer de mama (MCF-7).

Neste estudo, as NPs foram sintetizadas com a adição de biocaldo de *Escherichia fergusonii* junto ao precursor  $\text{AgNO}_3$ . Em particular para este estudo, utilizou-se cepas de *E. fergusonii*, que cresceram aerobicamente em meio Luria-Bertani (LB). Na síntese, centrifugou-se o conteúdo e utilizou-se o sobrenadante, adicionando nitrato de prata, tendo o seu monitoramento por mudança de coloração da solução em relação ao branco (um contendo apenas solução de nitrato de prata e outro contendo apenas o Caldo) e por análise em Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região Ultravioleta-Visível (UV-Vis) para confirmação da banda plasmon.

As NPs foram também caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), para confirmação de forma, tamanho médio, assim como análise de defeitos, juntamente com a análise de tamanho médio e distribuição de tamanhos das NPs (Rocha, 2008).

Em artigos anteriormente publicados pelo mesmo grupo de pesquisa e citados neste estudo, os autores apresentaram um possível mecanismo de formação das

NPs, onde uma enzima de Nitrato Redutase pode ser responsável pela redução dos íons de prata para prata metálica, sendo induzida pelo próprio íon nitrato, através do processo de redução enzimática de metais, anteriormente proposto para produção de nanopartículas de ouro (Kalimuthu et al, 2008). Como resultado de síntese, obteve-se uma dispersão de NPs isotrópicas e anisotrópicas, com máximos das bandas plasmônicas variando entre 420 e 430 nm, com tamanhos no intervalo entre 10 e 50 nm, com formatos esférico, oval, triangular, pentagonal e hexagonal.

Atualmente já se conhece a utilização de diversos agentes antitumorais, porém alguns apresentam desvantagem e até mesmo baixa eficácia nesta aplicação, explicando a necessidade de encontrar meios mais seguros e baratos para este tipo de uso.

O mecanismo que pode ser responsável pela inibição do crescimento microbiano de células tumorais pelas NPs de prata se dá pela ação da citotoxicidade em células em estágio de fagocitose. Os efeitos citotóxicos induzidos à célula podem vir de espécies reativas do Oxigênio (ROS) causando a apoptose celular, em pequenas concentrações e curtos períodos de exposição. A produção do ROS também implica em danos aos DNA da célula, causados pela própria nanopartícula, quando analisado *in vitro*.

Tendo isto em vista, o artigo realiza 4 estudos para analisar a ocorrência de danos nas estruturas das células do câncer de mama: realizou-se o ensaio de viabilidade celular, onde avalia-se a citotoxicidade através da degradação do corante MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo de difeniltetrazólio), pelo metabolismo celular, mais especificamente pelas mitocôndrias. Quanto menos degradado, maior o dano na célula (Marks et al, 1992). Verificou-se também a integridade da membrana celular, mensurado através da presença de atividade de Lactato Desidrogenase (LDH), apresentada no meio caso ocorra a ruptura da membrana da célula, teste toxicológico *in vitro* (medida quantitativa). Determinou-se a presença de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), medido a presença de peróxido através da oxidação do DCFH-DA (Diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína) para DCF (2'-7'-diclorofluoresceína). Além disso, realizou-se o Ensaio de Fragmentação de DNA, onde ocorre a fragmentação e precipitação (em forma de gel) do DNA para análise sob luz ultravioleta, comparando a amostra analisada com a de uma célula sem danos.

A partir dos resultados das 4 análises feitas, pode-se observar que os danos causados pelas NPs aumentam conforme aumenta-se a concentração das mesmas, mostrando que esta via de síntese pode apresentar um potencial uso contra células de MCF-7.

Ainda exemplificando as possíveis aplicações de nanopartículas anisotrópicas de prata, temos o estudo de Mohamed et al., publicado em 2019 pela *Materials Research Express*, edição 6, intitulado como “*Biosynthesis of silver nanoparticles from Hyphaene thebaica fruits and their in vitro pharmacognostic potential*”, onde explorou-se a biosíntese de NPs de Prata a partir do extrato do fruto da *Hyphaene thebaica* para aplicações tanto como agente antimicrobiano, como agente antioxidante e até mesmo agente antitumoral.

Para a síntese foram preparados extratos da Palmeira Doum (*Hyphaene thebaica*) através de seu fruto, que foram lavadas, pulverizadas e maceradas, onde preparou-se uma solução de 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada com 10 g de amostra, que permaneceu sob agitação em temperatura controlada. Após isto, resfriou-se e filtrou-se por três vezes a solução, até obter-se um extrato transparente para a produção das nanopartículas, utilizando como precursor o AgNO<sub>3</sub>.

Através da Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região Ultravioleta-Visível (UV-Vis), pode-se observar que a banda centrada em 411 nm foi característica para NPs de Prata. Foi realizado um estudo em relação ao pH da amostra, onde observou-se que em pH mais ácidos, a estabilidade das NPs é mais baixa em relação ao pH neutro e mais básico.

Nas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão, pode-se confirmar os formatos das NPs sintetizadas, onde observou-se nanohexágonos, nano triangulares-piramidais, nanobastões e nanobotões, confirmando sua natureza anisotrópica. Também pode-se verificar os tamanhos das NPs, que variam de 4,5 a 7 nm.

Foi realizado o ensaio antibacteriano através do método de difusão em disco, onde utilizou-se 5 bactérias. A maioria das bactérias testadas apresentou zona de inibição, sempre apresentando inibição nas maiores concentrações. Já para avaliar a atividade antifúngica, foi realizado o mesmo método. Esse microorganismo apresentou resistência a concentrações mais baixas de NPs, mas foi constatada inibição em concentrações mais altas.



Através da redução do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), pois o mesmo apresenta deslocalização de elétron desemparelhado por toda a molécula, apresentando coloração vermelho escuro, verificou-se a eliminação dos radicais livres, onde preparou-se em metanol e realizou-se a avaliação com concentração 0,0243 mM, e misturou-se 20 µL de amostra em 180 µL de DPPH, deixando reagir por 20 minutos na ausência de luz. Posteriormente observou-se a absorbância a 517 nm e calculou-se a porcentagem de eliminação de radicais livres. Verificou-se a atividade em uma faixa de 400 µg até 25 µg de NPs.

Observou-se que a atividade varia de acordo com a concentração de NPs, onde na concentração de 400 µg teve-se 86,7% e taxa de redução em 99 µg de Ácido Ascórbico por mL, e na concentração de 25 µg obteve-se 43,9% e a taxa de redução em 45 µg por mL. De maneira geral, apresentou-se uma atividade antioxidante considerável.

Foi realizado o ensaio de toxicidade a partir da exposição de *Artemia salina* recém-chocados, onde os mesmos foram expostos às NPs de prata. Assim como em análises anteriores, a taxa de mortalidade de artemia variou conforme variou-se a concentração de NPs, onde na maior concentração, obteve-se a mortalidade total de artemia.

Avaliou-se a inibição da produção da proteína quinase através da cepa de *Streptomyces 85 E*. Este método consiste na verificação da proteína quinase que tem papel fundamental na adição de grupos fosfato a aminoácidos para o metabolismo, divisão celular e até mesmo para apoptose. Quando o fosfato é distribuído de maneira irregular, pode-se resultar no desenvolvimento de um tumor. Também é conhecida por desempenhar um papel importante no desenvolvimento de filamentos de *Streptomyces*, logo, seu crescimento pode ser inibido através da inibição da proteína. As cepas apresentaram zonas de inibição em todas as concentrações avaliadas.

Observando estes artigos, nota-se que a maioria das sínteses utilizando materiais biológicos não apresentam um controle rigoroso de formato, pois através da caracterização nota-se diferentes tipos de formas em misturas. Assim, através da síntese com controle tanto de tamanho, quanto de formato, pode-se obter resultados mais criteriosos, a fim de conhecer o funcionamento de um tipo específico de nanopartícula anisotrópica, assim como seu desempenho de maneira geral.

Cada nanomaterial possui características únicas, tanto físicas, quanto químicas, podendo resultar em reatividade muito diferentes quando comparadas entre si, o que nos obriga a escolher rotas de síntese que possibilitem a obtenção de amostras com controle de suas características finais. Assim como suas demais propriedades, o efeito tóxico causado pelas NPs pode estar relacionado ao meio em que elas se encontram como o preparo de sua suspensão, química da superfície, tamanho, formato, dose e sua liberação (Durán, 2018).

Pode-se observar que a rota proposta pode apresentar resultados promissores, pois a mesma apresenta revestimento utilizando PEG, que é considerável uma ótima maneira de contornar a toxicidade das partículas finais, assim como a utilização do Ácido L-ascórbico como agente redutor pode ser uma ótima alternativa em relação aos demais utilizados. Além disso, a utilização de métodos de separação posteriores à síntese, como a suspensão fracionada, pode resultar em um maior controle nas características apresentadas pelas amostras resultantes (Yang, 2007; Durán, 2018).

## 5 CONCLUSÃO

A síntese de nanopartículas anisotrópicas requer um grande cuidado, tanto no que diz respeito à etapa de controle de formas, quanto no que diz respeito ao estudo de sua estabilidade pós síntese, uma vez que suas aplicações são fortemente dependentes de ambos os efeitos. Neste trabalho demos início à síntese de nanopartículas anisotrópicas de prata, e os resultados iniciais da espectroscopia UV-Vis mostraram-se promissores para o sucesso da rota.

Quando comparada com as demais rotas de sínteses apresentadas em trabalhos de grupos de pesquisa importantes na área, apresentados no levantamento bibliográfico, notam-se que a rota proposta tem grande potencial, com excelente relação de custo-benefício, além de seu solvente utilizado ser água, seu agente redutor ser o ácido L-ascórbico, ser estabilizada com PEG, todos indicados como agente que diminuem a toxicidade das NPs. Seriam necessários testes antimicrobianos para poder avaliar tal efeito, entretanto dados preliminares se mostram promissores.

Vale ressaltar aqui que a primeira preocupação, fundamental em qualquer trabalho, reside na caracterização completa dos sistemas, o que permitiria a proposta de modificações e adaptações necessárias para qualquer aplicação possível de nanosistemas. Assim, a caracterização extensiva das amostras aqui sintetizadas, utilizando-se Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura, Difractometria de raios x, espectroscopias Raman e Infravermelho são fundamentais para a continuidade do trabalho.

Possíveis aplicações biológicas, como bactericidas, fungicidas e agentes antitumorais, tornam o sistema proposto neste trabalho de fundamental importância para o desenvolvimento científico e melhoria na qualidade de vida dos seres humanos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v. 28, p. 118-129, set. 2005.
- BARRA, C. V. *et al.* Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, ago. 2015.
- CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2010.
- FARADAY, M. X. The Bakerian Lecture.—Experimental relations of gold (and other metals) to light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, n. 147, p. 145-181, 1857.
- FERREIRA, H. S. *et al.* Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química nova**, v. 32, p. 1860-1870, ago. 2009.
- FERREIRA, R. S.. **Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina: estudo dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina e do efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em células PC12**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- GHENOV, F. **Avaliação in vitro das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de chá preto (Camellia sinensis) e dos cogumelos Shiitake (Pleurotus ostreatus) e Shimeji (Lentinula edodes)**. 2014. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso) - Departamento de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- GURUNATHAN, S. *et al.* Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles and its potential cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1600-1605, fev. 2013.
- HEIDEMANN, B. R. *et al.* Plasmonic optical fiber sensors: enhanced sensitivity in water-based environments. **Applied optics**, v. 54, n. 27, p. 8192-8197, set. 2015.
- JAIN, P. K. *et al.* Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. **Plasmonics**, v. 2, n. 3, p. 107-118, jul. 2007.
- KALIMUTHU, K. *et al.* Biosynthesis of silver nanocrystals by Bacillus licheniformis. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 1, p. 150-153, mar. 2008.
- LEFF, D. V. *et al.* Synthesis and characterization of hydrophobic, organically-soluble gold nanocrystals functionalized with primary amines. **Langmuir**, v. 12, n. 20, p. 4723-4730, out. 1996.

LOPES, J. C. *et al.* Utilização de nanopartículas no tratamento do câncer: aspectos gerais, mecanismos de ação antineoplásicos e aplicabilidades tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 65, n. 4, fev. 2019.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química nova**, v. 35, p. 1434-1446, jun. 2012.

MOHAMED, H. E. A. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles from *Hyphaene thebaica* fruits and their in vitro pharmacognostic potential. **Materials Research Express**, v. 6, n. 10, p. 1050c9, set. 2019.

OLDENBURG, S. J. *et al.* Nanoengineering of optical resonances. **Chemical Physics Letters**, v. 288, n. 2-4, p. 243-247, jan. 1998.

OLIVEIRA, L. C. *et al.* Aplicações das nanopartículas lipídicas no tratamento de tumores sólidos: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 695-701, mai. 2012.

OLIVEIRA, M. M. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: Síntese, caracterização e propriedades**. 2005. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PEREIRA, A. F. **Deposição de nanopartículas metálicas em sílica visando à produção de sensores ópticos**. 2016. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso) - Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

PEREIRA, J. C. **Crescimento de nanopartículas de ouro em superfície de sílica, com posterior deposição de grupo luminescente para futura aplicação em sensores óticos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Pós Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

REMPEL, C. *et al.* Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 57-82, jul. 2019.

ROCHA, T. C. R. *et al.* **Nanopartículas metálicas anisotrópicas: mecanismos de formação e aplicações ópticas**. 2008. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade de Campinas, Campinas, 2008.

RONCONI, C. M. *et al.* **Obtenção de filmes finos de óxidos semicondutores ternários de banda larga pelo processo de decomposição de precursores metalorgânicos**. 2002. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SANGAPPA, Y. *et al.* Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using silk fibroin: characterization and antimicrobial properties. **Materials Research Innovations**, v. 23, n. 2, p. 79-85, out. 2019.

SHIVANANDA, C. S. *et al.* Biosynthesis of colloidal silver nanoparticles: their characterization and potential antibacterial activity. **Macromol. Res.**, v. 24, p. 684-

690, mai. 2016.

SHIVANANDA, C. S. et al. Biosynthesis of colloidal silver nanoparticles: their characterization and antibacterial activity. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 2, n. 3, p. 035004, abr. 2016.

TANG, B. et al. Colorful and antibacterial silk fiber from anisotropic silver nanoparticles. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 12, p. 4556-4563, mar. 2013.

WANG, Q. et al. A comprehensive review of lossy mode resonance-based fiber optic sensors. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 100, p. 47-60, jul. 2018.

WEI, Y. et al. Optical Fiber Cladding SPR Sensor Based on Core-Shift Welding Technology. **Sensors**, v. 19, n. 5, p. 1202, mar. 2019.

YANG, Z. et al.. Preparation and characterization of different shapes of silver nanostructures in aqueous solution. **The Open Nanoscience Journal**, v. 1, n. 1, 2007.

YANASE, Y. et al. Development of SPR imaging-impedance sensor for multi-parametric living cell analysis. **Sensors**, v. 19, n. 9, p. 2067, mai. 2019.

ZARBIN, A. J. G. et al. **Novos Nanocompósitos Obtidos pelas Interações de Compostos Organometálicos e Polímeros Condutores em Vidros Porosos**. 1997. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

ZARBIN, A. J. G. et al. Química de (nano) materiais. **Química nova**, v. 30, p. 1469-1479, 2007.