

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

BEATRIZ BIANCA SCHULZ RAMIN

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM O PLURÔNICO F-127**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA  
2016

BEATRIZ BIANCA SCHULZ RAMIN

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM O PLURÔNICO F-127**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de licenciada.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Tessaro

Co-orientador: Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro

APUCARANA  
2016

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. André Luiz Tessaro  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana  
Orientador

---

Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana  
Membro

---

Profa. Dra. Graciana Freitas Palioto  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana  
Membro

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

*A minha avó, Orminda de Jesus Leite Ramin (in memoriam), cuja presença está em tudo que faço.*

## AGRADECIMENTOS

Não poderia iniciar esse momento sem agradecer à meus pais, minha madrinha e meus irmãos por terem confiado e acreditado em mim, me apoiando em todos os momentos, pois acredito que o pensamento positivo simboliza a fé, e a fé nos leva longe.

Agradeço aos meus amigos moraram comigo ao decorrer da graduação, em especial: Scoby, Vavo, Gabi e Day, por terem me aturado nos momentos de loucura, principalmente pela paciência e apoio para continuar mesmo quando eu achava que não ia dar certo.

Quero registrar minha gratidão ao meu orientador, Prof. André Luiz Tessaro, por ter me acolhido desde o início da graduação. Sempre tendo paciência para discutir e tirar dúvidas, mesmo nos meus momentos de desespero. Aprendi que independente do resultado se apresentar conforme esperamos, resultado é resultado. Deu certo, professor, conseguimos!

Agradeço ao Prof. Johnny Paulo Monteiro pela orientação, iluminando meu caminho com a parte de nanopartículas de prata e por ter aceitado ser meu co-orientador.

Agradeço ao Prof. Alessandro pelos ensinamentos, sempre me incentivando a estudar, me dando a oportunidade de conhecer sua área e também por ter aceitado ser minha banca.

Agradeço a Profa. Graciana, por ter me orientado com paciência, pois foi preciso, os ensaios microbiológicos recebendo eu e “minhas aventuras” no laboratório.

Agradeço aos meus amigos Douglas e Rosecler pela ajuda na síntese das nanopartículas de prata, onde aprendi que “apressado come cru”.

Agradeço também aos amigos que fiz ao longo da faculdade: Michelle, Tata, Bruno, Fera, Giu, Fer, Elo, Luana, Deiviti, Bruna e Bárbara; e também aos meus amigos externos a universidade, em especial: Camila, Crespa, Arieli e Aline, pelo apoio incondicional e companhia.

Agradeço a minha amiga e companheira, Daphne, por todo apoio e conselhos durante a graduação. Seu companheirismo vai me fazer falta.

Agradeço ao Prof. Block e a Profa. Dani por ter me ajudado com as análises estatísticas.

Agradeço a Ana Pedroso, que esteve comigo desde o início da graduação com a iniciação científica, pelos ensaios de DLS e por sempre me ajudar com as minhas dúvidas.

Por último agradeço as universidades: UEM (Universidade Estadual de Maringá) por ter disponibilizado os laboratórios para análises e a UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) por ter concedido uma ajuda de custo para realizar esse trabalho.

Gratidão à todos que de alguma forma me ajudaram a desenvolver esse trabalho e também me incentivaram ao longo da faculdade.

*A vida é muito curta para ser pequena.*  
(DISRAELI, Benjamin).

## RESUMO

RAMIN, Beatriz B. S. Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas de prata estabilizadas com plurônico o F-127. 2016. 55 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2016.

Com o passar dos anos, a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs), vem atraindo o interesse de vários pesquisadores. Essas AgNPs vem sendo aplicadas como agentes antimicrobianos, porém são muito instáveis. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar as AgNPs pelo método de borohidreto, caracterizá-las e avaliar a estabilidade delas frente a incorporação ao plurônico F-127 para futura aplicação. Após essa etapa, as mesmas foram caracterizadas por espectrofotometria de absorção UV-Vis e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Em seguida, foi avaliado a atividade antimicrobiana das AgNPs na presença da bactéria *Escherichia coli* pelo método antibiograma qualitativo. A condição mais favorável para o armazenamento das AgNPs sintetizadas é na temperatura ambiente/escuro, uma vez que nessa condição constatou-se menor autoagregação e manutenção de suas propriedades. As AgNPs incorporadas ao surfactante polimérico F-127 se mantiveram mais estáveis do que as nanopartículas em solução aquosa. Esse sistema potencializou o efeito bactericida da AgNP frente a *E. coli*.

**Palavras-chave:** Nanopartícula de prata. Plurônico F-127. Estabilidade. Efeito bactericida.



## ABSTRACT

RAMIN, Beatriz B. S. Synthesis, Characterization and study of stability silver nanoparticles stabilized by F-127 Pluronic. 2016. 55 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2016.

Over the years, the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs), has attracted the interest of many researchers. These AgNPs have been applied as antimicrobial agents, however, they are very unstable. In this sense, the goals of this study was to synthesize the AgNPs by borohydride method, characterize them and evaluate the stability after being incorporated in the F-127 Pluronic for future application. After this, they were characterized by UV-Vis absorption and Transmission Electronic Microscopy. Then, the antimicrobial activity of AgNPs was evaluated against *Escherichia coli* by the qualitative susceptibility testing method. The most favorable condition for storage the synthesized AgNPs is at room temperature / dark since this condition yielded the lower self-aggregation and maintenance of its properties. The AgNPs incorporated into the polymeric surfactant F-127 remained more stable than the nanoparticles in aqueous solution. This system potentiates the bactericidal effect of AgNP against *E. coli*.

**Key-words:** Silver nanoparticles. Pluronic F-127. Stability. Bactericidal effect.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem da Taça de Lycurgus.....	19
Figura 2 – Repulsão de nanopartículas de prata com os íons de borohidreto. ....	24
Figura 3 – Interrelação entre variáveis de controle na produção de AgNPs pelo método de redução química da prata.....	26
Figura 4 – Coloide de prata em vários estágios de agregação, (a) amarelo pálido, (B) alaranjado, (C) violeta, e (D) acinzentado, conforme o aumento da agregação.....	26
Figura 5 – Desenho esquematizando a DCE em um líquido em contato com um corpo sólido.....	29
Figura 6 – (a) Tamanho de partícula estabilizado por DCE, (b) Estabilização por forças estéricas. ....	30
Figura 7 – Estrutura molecular do surfactante polimérico plurônico F-127 .....	31
Figura 8 – Representação da atividade antimicrobiana de íons de prata.....	33
Figura 9 – Nanopartículas sintetizadas a partir de volumes diferentes de nitrato de prata para Solução 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente para (a) síntese e (b) após 47 dias de armazenamento. ....	38
Figura 10 – Espectro de UV-Vis das AgNPs com as Soluções 1, 2, 3, 4 e 5 (a) no dia da síntese e (b) 7 dias após. ....	39
Figura 11 – Gel (AgNPs + F-127 20%) armazenado na estufa durante 7 dias e 14 dias após a sua solubilização em geladeira (7 dias), as Soluções 1, 3 e 5, da esquerda para direita. ....	41
Figura 12 – Espectro de absorção UV-Vis para AgNPs de 8 mL geladeira/escuro (G/E) de nitrato de prata, avaliado durante 7 dias após a síntese, mostrando o deslocamento da banda. ....	42
Figura 13 – Os espectros apresentam a intensidade dos picos nas diferentes condições por 7 dias de análises, (a) AgNPs em solução aquosa; nos outros espectros a AgNPs é incorporada com o F-127 à 20% (b) temperatura ambiente/escuro ( $TA \leq 27^{\circ}\text{C}/\text{E}$ ); (c) geladeira/escuro (G/E); (d) estufa à $35,5^{\circ}\text{C}/\text{escuro}$ (Gel/E). ....	43
Figura 14 – Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de prata (a) ampliação de 120.000; (b) 200.000 vezes. ....	45
Figura 15 - Histograma com o tamanho médio das AgNPs. ....	46

Figura 16 – Teste piloto com incorporação do gel no meio de cultura com <i>E. coli</i> ....	47
Figura 17 – Halo de inibição das diferentes amostras: (N) controle; (F) F-127; (A) AgNPs em solução aquosa; e (G) Gel (AgNPs incorporadas com F-127). .....	48
Figura 18 – Médias e desvio padrão do halo de inibição das diferentes amostras presentes com a <i>E. coli</i> . As letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de $p > 0,05$ – Análise de variância ANOVA, teste de Tukey. ....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
cmc	Concentração micelar crítica
DCE	Dupla Camada Elétrica
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
<i>E-coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F-127	Plurônico F-127
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEO	Poli (óxido de etileno)
PPO	Poli (óxido de propileno)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS.....	18
3.1.1 Vantagens do uso da nanotecnologia .....	20
3.1.2 Desvantagens do uso da nanotecnologia.....	21
3.2 NANOPARTÍCULA DE PRATA .....	21
3.2.1 Síntese da nanopartícula de prata (AgNPs).....	23
3.2.2 Redução por borohidreto de sódio.....	25
3.3 PROCESSOS DE ESTABILIZAÇÃO E AGREGAÇÃO DA NANOPARTÍCULA...27	
3.3.1 Surfactantes.....	30
3.4 TESTES ANTIMICROBIANOS .....	32
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
4.1 MATERIAIS.....	34
4.1.1. Solventes e reagentes .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2. Equipamentos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	34
4.2.1 Otimização das condições de síntese.....	34
4.2.2 Teste de estabilidade das nanopartículas de prata .....	35
4.2.3 Estabilização por plurônico F-127.....	35
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	36
4.3.1 Espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis .....	36
4.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	36
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	36
4.4.1 Análise estatística da atividade antimicrobiana .....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>38</b>
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SÍNTESE .....	38
5.2 ENCAPSULAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM PLURÔNICO F-127 .....	41
5.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	45
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AgNPs .....	47
5.3.1 Análise estatística da atividade antimicrobiana .....	47

<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, uma doença transmissível ou infecciosa, se define por qualquer moléstia causada por um agente patogênico, como as bactérias. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o maior desafio contra doenças infecciosas é a resistência a antibióticos.

Dados divulgados em 2011 pela OMS mostram que em países de baixa renda, aproximadamente, quatro em cada dez mortes são de crianças abaixo de 15 anos e duas em cada dez mortes são de idosos acima de 70 anos. Essas mortes predominantemente se dão pelas doenças infecciosas: HIV/AIDS, malária, infecções respiratórias, tuberculose e doenças diarreicas; sendo responsáveis coletivamente por aproximadamente um terço de todas as mortes nesses países.

Com números tão alarmantes de mortes causadas por doenças infecciosas, a busca por novas metodologias de tratamento intensificou-se nos últimos anos. Um exemplo dessa metodologia é a Terapia Fotodinâmica (TFD), modalidade de tratamento não invasiva e sem efeitos tóxicos cumulativos relatados, o que permite sua reaplicação até a obtenção dos resultados desejados. A TFD é baseada na combinação de um fármaco fotossensível e luz visível em comprimento de onda específico na presença de oxigênio (SILVA, 2015).

Desde a antiguidade, os romanos e gregos utilizavam a prata como bactericida e antibiótico. Com o desenvolvimento de partículas em escala nanométrica esse efeito foi potencializado. Um reflexo da eficiência das AgNPs contra doenças infecciosas é a variedade de produtos disponibilizados no mercado com ação antimicrobiana.

Entretanto, as nanopartículas são termodinamicamente instáveis e possuem a tendência natural em autoagregar. Com isso, o maior desafio encontrado é preparar nanomateriais estáveis e monodispersos, tanto em relação à forma quanto ao tamanho das partículas, para que possam ser dispersos, manipulados, depositados sobre substratos, sem perder suas características (CASANOVA, 2010). Para que os materiais nanoestruturados possam ser eficientemente empregados em aplicações biomédicas e tecnológicas precisam ser capazes de se conservar estáveis por longos períodos de tempo, sem que haja modificações estruturais ou perda de suas

propriedades. Desta forma, buscam-se novas metodologias de síntese ou funcionalização orientadas a aumentar a estabilidade química das nanopartículas (TURKEVITCH; STEVENSON; HILLIER, 1951; BROWN; HUTCHISON, 2001).

O presente trabalho tem como intuito sintetizar, caracterizar e analisar detalhadamente a estabilidade das nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando-se para tal o surfactante F-127.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar e acompanhar a estabilidade da nanopartícula para aplicá-la como substância antimicrobiana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as nanopartículas de prata pelo método de borohidreto de sódio;
- Avaliar a estabilidade temporal das AgNPs quanto a sua autoagregação;
- Avaliar a estabilidade das AgNPs frente a presença e ausência de luz;
- Avaliar a estabilidade das AgNPs frente ao surfactante F-127;
- Avaliar a ação antimicrobiana das AgNPs frente a bactéria *Escherichia coli*.

### 3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS

A expressão *nanotecnologia* foi empregada pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi, para nomear uma nova tecnologia que ia além da engenharia e do controle de materiais em microescala. Contudo, o significado da expressão atualmente se aproxima mais da formulação de Eric Drexler, que se refere à metodologia do processo que envolve a manipulação átomo à átomo (DREXLER, 1961). O prefixo “nano” é usado para indicar a grandeza de  $10^{-9}$  ou bilionésimo, relacionando cerca de 100.000 vezes menor do que a espessura de um fio de cabelo humano. O intuito da nanotecnologia é baseado na manipulação de moléculas, átomos e demais partículas com grandeza de ordem nanométrica para a criação de novas estruturas de materiais e, portanto, alcançando novas propriedades (GOGOTSI, 2016).

Grande parte das indústrias se favorece com as inovações da nanotecnologia. As pesquisas entre o meio acadêmico, instituições governamentais e indústria aceleraram com o desenvolvimento de produtos novos. O modelo tradicional de grande escala foi revisto, levando em consideração o elevado custo dos materiais e também o grande impacto ambiental causado para a fabricação desses materiais (SCHMID et al., 1981). Os processos de fabricação tem maior eficiência no uso de energia e são mais límpidos empregando novas fontes renováveis. Com isso, o consumidor se beneficia pela abundância de produtos fundamentados na nanotecnologia, que melhoram a qualidade de vida das pessoas no mundo inteiro.

Identificando essa nova realidade, o Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia da Casa Branca elaborou o “Interagency Working Group on Nanoscience, Engineering and Technology”, em 1998. Segundo Bastos (2006), a partir de 2000 a relevância dada do governo norte-americano sobre a pesquisa na área de nanociências ficou explícita, aprovando um orçamento de 497 milhões de dólares em 2001 para dar prioridade a uma ciência de alta tecnologia. O objetivo então seria unir o governo federal e o setor privado para alavancar o

desenvolvimento da nanoengenharia e nanociência para atingir potenciais benefícios sociais e econômicos (BASTOS, 2006).

Alguns produtos em nanoescala vêm sendo comercializados, como no agronegócio, onde estão sendo fabricadas nanopartículas para liberação controlada de pesticidas, drogas e nutrientes. Destacam-se recentemente a aplicação de nanomateriais para: i) revestimentos (*coatings* e tintas em geral); ii) ferramentas de cortes de alta precisão (nano carbeto de titânio, tantálio ou tungstênio); iii) farmacêutica (transportadores e armazenadores de fármacos), e iv) cerâmicas (área de cerâmica fina). Destacam-se também as aplicações em desenvolvimento das nanopartículas: i) células a combustível; ii) implantes cirúrgicos; iii) roupas com elevada resistência para o uso militar; iv) purificação de água, e v) cerâmicas usináveis (GARCIA, 2011).

Não se sabe com precisão, mas o exemplo considerado mais antigo da utilização de nanomateriais se refere a taça de Lycurgus (4 a. C.) mostrada na Figura 1. Esta taça pode ser vista no Museu Britânico, localizado em Londres, e tem a propriedade de mudar de cor dependendo da luz incidente. Na análise feita sobre esse vidro mostrou que ele contém uma pequena quantidade de nanocristais metálicos (~ 70 nm) envolvendo prata e ouro na proporção de 14:1.



Figura 1 – Imagem da Taça de Lycurgus.  
Fonte: Garcia (2011).

### 3.1.1 Vantagens do uso da nanotecnologia

Dentre as vantagens do uso da nanotecnologia, podemos citar a diminuição dos custos da produção, eliminação dos efeitos de fabricação, utilização melhor dos recursos e diminuição do desperdício de matéria-prima.

A nanotecnologia proporciona uma melhoria na qualidade de fabricação das técnicas de manufaturas. Esta melhora na qualidade se dá pelo fato de que com a nanotecnologia utiliza-se pouca matéria-prima, pois a escala é nanométrica, fabricando então materiais mais compactos. Conseqüentemente, os custos de produção do material são reduzidos, visto que a fabricação consumiria bem menos matéria prima e energia do que em escala macro (BASTOS, 2006). A nanotecnologia poderia ser um meio para combater os problemas ambientais encontrados na nossa sociedade atualmente.

Com o avanço da nanotecnologia, teremos a capacidade de armazenamento aproximadamente ilimitada na área da informática. Sendo assim, seria possível construir uma densidade com memória de 100.000 terabits por centímetro cúbico. Com uma memória dessa grandeza, por exemplo, um iPod teria capacidade de armazenar músicas no formato MP3 para tocar no decorrer de 300.000 anos, sem repetições (BASTOS, 2006).

Outra vantagem importante é a nanotecnologia voltada a fármacos, onde a nanotecnologia farmacêutica é uma área que envolve a caracterização, desenvolvimento e aplicação de sistemas terapêuticos. A pesquisa sobre esses sistemas tem sido realizada com o intuito de controlar e direcionar a liberação de fármacos (SAKATA et al., 2007).

Segundo Santana (2008), as nanopartículas apresentam características efetivas para esses sistemas de liberação de fármacos. Suas concentrações são mantidas em níveis adequados durante períodos longos de tempo, possibilitam que os fármacos sejam entregues em lugares apropriados, e também previnem sua degradação.

As nanopartículas proporcionam maior eficiência de liberação e encapsulação controlada quando comparadas com os sistemas convencionais de encapsulação, possuindo também pequeno tamanho, onde podem ser diretamente injetadas no

sistema circulatório e permitem a possibilidade de administração por via nasal, pulmonar, oral e transcutânea (SANTANA et al., 2008).

### 3.1.2 Desvantagens do uso da nanotecnologia

Embora a nanotecnologia pareça ser tão vantajosa na teoria, essa ainda cria certa desconfiança de algumas áreas da sociedade. Cientistas da Universidade de Toronto pressupõe que a nanotecnologia poderá ser o próximo assunto de briga entre a opinião pública e a indústria. Alguns cientistas asseguram que essa tecnologia pode aumentar a desigualdade entre as nações ricas e pobres, uma vez que para se investir na nanotecnologia precisa-se de grande capital, visto que apenas as regiões ricas possuem esse requisito (BASTOS, 2006).

Existe também quem acredite que os produtos nanoparticulados podem trazer riscos a saúde e ao meio ambiente. Alguns pesquisadores acreditam que o uso irresponsável da técnica pode trazer prejuízos superando os benefícios que a técnica pode trazer. Pesquisas em Houston, na Universidade de Rice, encontraram propriedades tóxicas em alguns nanocompósitos (BASTOS, 2006).

Como já citado, a Nanotecnologia manifesta um potencial ascendente para revolucionar o desenvolvimento de produtos novos e, portanto, motivar uma drástica mudança nos processos produtivos em comparação com à forma como são tratados atualmente (BASTOS, 2006).

## 3.2 NANOPARTÍCULA DE PRATA

O uso de nanomateriais estruturados está cada vez mais difundido na indústria brasileira, principalmente na área alimentícia. Pode-se perceber então um alto interesse na utilização de nanopartículas de prata (AgNPs), em virtude de suas propriedades, tais como, elevado efeito catalítico, boa condutividade, grande área superficial e alta atividade antimicrobiana. As AgNPs são capazes de reduzir

infecções, evitar a colonização bacteriana em cateteres, superfícies de prótese e materiais odontológicos, na indústria de alimentos, na fabricação de tintas antibactérias e no tratamento de água (GUZMÁN; DILLE; GODET, 2008).

Há muitos anos o efeito antimicrobiano da prata é reconhecido. Na antiguidade, essa era usada no tratamento de queimaduras e contra patologias causadas por bactérias, como a *Staphylococcus aureus*. A utilização da prata diminuiu drasticamente com a descoberta da penicilina. Entretanto, com a seleção de cepas resistentes a antibióticos, o uso da prata voltou a ser pesquisado para desenvolver novos agentes antimicrobianos (CHOPRA, 2007).

As soluções coloidais de AgNPs, em razão da sua alta relação área por volume, demonstram características antimicrobianas contra vários tipos de microorganismos, por exemplo, as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, vírus e fungos. A medicina tem apontado que a prata mata mais de 650 agentes patogênicos e não cria resistência (PETICA et al., 2008). Esse fato acontece devido as AgNPs, ao entrarem em contato com a membrana celular desses microorganismos, ocasionar danos na permeabilidade e respiração celular. Além do que, os íons de prata liberados das AgNPs podem inativar sua replicação, atuando no fosfato das moléculas do DNA. Outro mecanismo encontrado na literatura também é de que os íons de prata acarretariam em uma reação com proteínas da bactéria que contém enxofre, causando a inibição de suas funções enzimáticas (GUPTA et al., 1998; MATSUMURA et al., 2003).

Com as pesquisas, estão surgindo novos processos para a produção de AgNPs, sendo os principais embasados na redução química de sais de prata em meio aquoso. As AgNPs estão sendo sintetizadas também pela utilização de métodos de decomposição térmica, eletroquímicos, processos de micelas reversas, irradiação por microondas, dentre outros (YIN et al., 2004; JIAN; YONGCHANG; YIMIN, 2004).

Em virtude das nanopartículas serem termodinamicamente instáveis e muito pequenas, é preciso estabilizá-las com a adição de uma matriz polimérica ou reagentes protetores. A estabilização estérica ocorre adicionando grupos volumosos (AIKEN; FINKE, 1999). Já na estabilização eletrostática espécies carregadas, cátions e ânions, se adsorvem a superfície das nanopartículas (ANTUNES et al., 2013).

Atualmente, a indústria busca novos produtos para colocar no mercado. Entretanto, as AgNPs disponíveis são limitadas e caras. Por isso então, existe a necessidade de desenvolver meios para a produção de AgNPs mais acessíveis para produzir novos materiais antimicrobianos (KIM et al., 2007; PINTO et al., 2010).

### 3.2.1 Síntese da nanopartícula de prata (AgNPs)

Várias metodologias estão sendo utilizadas para sintetizar as nanopartículas de prata derivadas de sais, sendo que normalmente usa-se o nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) como material de partida. Pode-se usar várias substâncias orgânicas como ácido tartárico, alcoóis, ácido ascórbico, carboidratos, entre outros, para reduzir a prata. Cada método de redução exige um tipo de agente redutor podendo variar a concentração e quantidade destes, bem como a velocidade de agitação, duração do processo de redução e temperatura de reação. Dependendo dessas condições, varia-se o diâmetro das partículas de prata.

O método mais utilizado para caracterização de nanopartículas é a espectroscopia UV-Vis, onde bandas entre 380 e 450 nm evidenciam a formação das AgNPs (SOLOMON et al., 2007; GUZMÁN; DILLE; GODET, 2008; RATYAKSHI; CHAUHAN, 2009; ZEENA; PRASHANT, 2004). A Tabela 1 indica o tamanho das AgNPs e o comprimento de onda observado (SOLOMON et al., 2007).

**Tabela 1 – Relação entre os tamanhos das nanopartículas de prata com o comprimento de onda observado pelo método de Espectroscopia UV-Visível.**

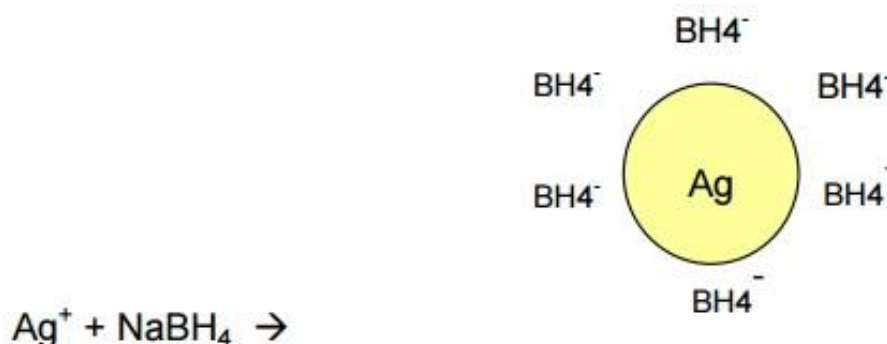
Tamanho da partícula (nm)	Comprimento de onda (nm)
5 – 10	380 – 390
10 – 14	395 – 405
35 – 50	420 – 435
60 – 80	438 – 450

Fonte : SOLOMON (2007).

Controlar o tamanho das nanopartículas e evitar o crescimento por agregação são os maiores problemas na sua síntese. O processo de agregação acontece pelo fato de que as AgNPs são muito pequenas e sua superfície de contato é muito grande, então elas se aglomeram para minimizar a área total, formando partículas secundárias diminuindo a tensão de interface do sistema.

Como dito anteriormente, pode-se utilizar diversas substâncias orgânicas para reduzir a prata, porém nesse trabalho será citado apenas o método utilizando borohidreto de sódio como agente redutor de acordo com a metodologia descrita por Lee e Meisel (1982).

O borohidreto de sódio é um forte redutor e com isso ele induz a formação de centros de nucleação que cresce dependendo do agente estabilizador formando pequenos clusters. Como mostra a Figura 2, o efeito estabilizador é em virtude da carga elétrica das nanopartículas estabilizando com os íons dos sais. No entanto, com esse processo existe a formação de impurezas devido a oxidação das espécies e dos íons dos sais utilizados.



**Figura 2 – Repulsão de nanopartículas de prata com os íons de borohidreto.**  
**Fonte: Solomon (2007).**

Na reação de redução da prata, nota-se mudança do nitrato de prata, incolor, para amarelo pálido que corresponde à formação de prata metálica. A avaliação da cor é importante porque determina o estado de agregação das partículas. A coloração amarelo-pálida se refere a pequenos agregados podendo chegar até na coloração cinzenta, onde é o máximo de agregação.

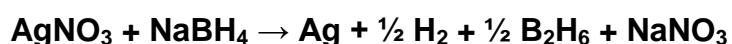
Outra metodologia utilizada para a síntese das AgNPs é pelo citrato de sódio, sendo um agente menos potente comparado com o borohidreto de sódio, com isso,



o processo de redução da prata se torna mais lento. É importante frisar que pela solubilidade em água do citrato ser maior, ele é mais utilizado porque a sua toxicidade é baixa e a facilidade de obtenção das AgNPs, visto que ele realiza dois papéis importantes na síntese: agente estabilizante e redutor.

### 3.2.2 Redução por borohidreto de sódio

No método do borohidreto de sódio com nitrato de prata a reação química é dada por:



De maneira geral, as AgNPs sintetizadas por este método podem ser caracterizadas por espectroscopia UV-Vis na faixa de 380 – 400 nm e possuem diâmetro entre 5 – 20 nm.

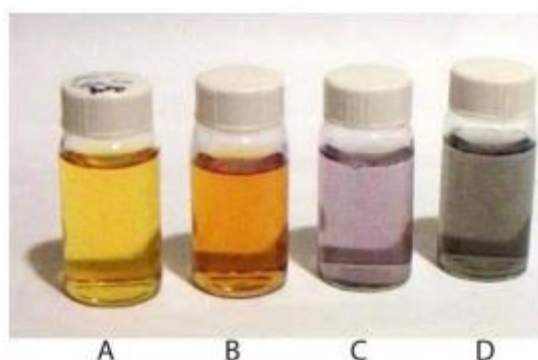
Normalmente acrescenta-se um grande excesso de NaBH<sub>4</sub> para estabilizar as AgNPs formadas. Pesquisas realizadas anteriormente mostram que a cor amarelada das AgNPs é estável por várias semanas ou até meses em temperatura ambiente e em frasco transparente (GARCIA, 2011).

A concentração dos reagentes e a agitação precisam ser constantes para que não tenha mudança do tamanho da nanopartícula e sua agregação. A Figura 3 faz uma relação entre as variáveis de controle pelo método de redução por borohidreto de sódio.



**Figura 3 – Interrelação entre variáveis de controle na produção de AgNPs pelo método de redução química da prata.**  
 Fonte: Garcia (2011).

Neste método é preciso gotejar a solução de nitrato de prata sobre a solução de borohidreto do sódio, pois a troca agrega imediatamente as partículas (SONG et al., 2009). Na Figura 4 está descrito os diferentes níveis de agregação e a coloração das AgNPs, indo da coloração amarelado até a cinzenta, onde representa uma forte agregação das partículas.



**Figura 4 – Coloide de prata em vários estágios de agregação, (a) amarelo pálido, (B) alaranjado, (C) violeta, e (D) acinzentado, conforme o aumento da agregação.**  
 Fonte: Solomon (2007).

A concentração do agente redutor também é essencial para a estabilização das AgNPs. É comprovado que a concentração de borohidreto de sódio precisa ser duas vezes a de nitrato de prata  $[(\text{NaBH}_4) / (\text{AgNO}_3) = 2,0]$  para manter a

estabilização do colóide. A Tabela 2 fornece a relação entre a razão ( $\text{NaBH}_4$ ) / ( $\text{AgNO}_3$ ), mantendo a concentração de  $\text{AgNO}_3$  em 1 mol/L para ter uma alta concentração de nanopartículas e a estabilidade da suspensão (SONG et al., 2009).

**Tabela 2 – Relação da razão ( $\text{NaBH}_4$ ) / ( $\text{AgNO}_3$ ) e a estabilidade do colóide**

**Obs: [ $\text{AgNO}_3$ ] mantida em 1,0mM**

Relação ( $\text{NaBH}_4$ ) / ( $\text{AgNO}_3$ )	Tempo de estabilidade do colóide (min)
2,0	Estável
2,1	~ 30
1,9	~ 20
1,8	~ 5

Fonte: SOLOMON (2007).

Como apresentado na Tabela 2, o tempo de reação é um fator importante que precisa ser controlado, porque caso ocorra à interrupção da adição de nitrato de prata na síntese, pode ocasionar a agregação das partículas.

A quantidade de  $\text{NaBH}_4$  precisa também ser controlada, pois a concentração do ânion  $\text{BH}_4^-$  estabiliza a nanopartícula fornecendo uma carga de superfície. Em concentrações muito baixas, a densidade eletrônica da superfície da nanopartícula diminui, causando a agregação. Também, uma concentração muito alta desse sal pode aumentar a força iônica total, causando a agregação similarmente. Portanto, a quantidade de  $\text{NaBH}_4$  tem que ser baixa para manter a estabilidade das partículas (SONG et al., 2009).

### 3.3 PROCESSOS DE ESTABILIZAÇÃO E AGREGAÇÃO DA NANOPARTÍCULA

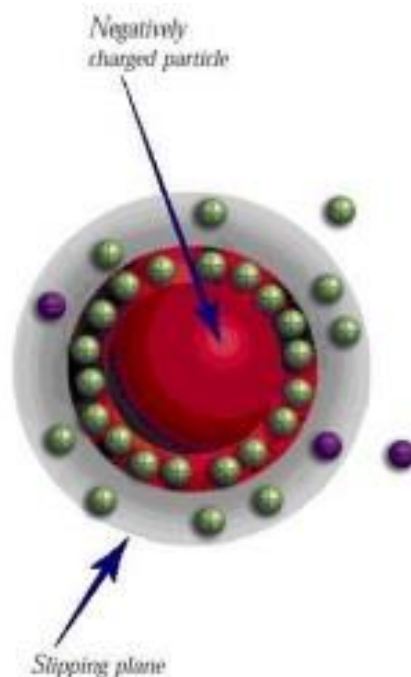
As nanopartículas são muito pequenas, com isso elas possuem uma grande superfície de contato, onde para minimizar essa área total elas se aglomeram, formando agregados, para diminuir a tensão superficial do sistema. Normalmente as partículas não podem estar aglomeradas, pois os materiais, como alguns pigmentos, algumas tintas e diversos revestimentos, precisam que elas estejam em dispersão. Em qualquer fase da síntese da nanopartícula, se não feita corretamente, pode

ocasionar a aglomeração das partículas. Neste caso, normalmente utiliza surfactantes no processo de síntese ou para a dispersão das nanopartículas (GARCIA, 2011).

De maneira geral, um surfactante é uma substância que atua na superfície do líquido, diminuindo a tensão superficial, contendo uma parte liofóbica (repulsiva do solvente) e outra liofílica (atrativa do solvente). Os surfactantes podem ser classificados como catiônicos, aniônicos, não iônico ou zwitteriônicos (carregando ambas as cargas), dependendo das cargas na superfície ativa.

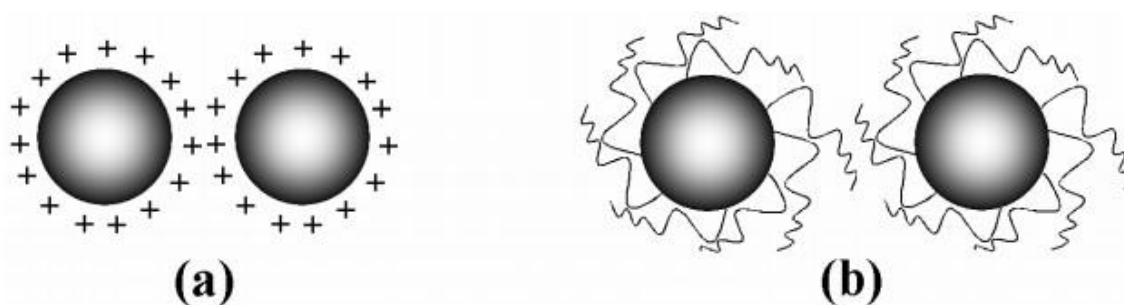
Existem dois métodos utilizados para evitar que as partículas se aglomerem. O primeiro estabiliza por dispersão, por repulsão eletrostática, resultado da interação da dupla camada elétrica (DCE), que estão em volta das partículas, visto que a distribuição de cargas entre o solvente e a partícula normalmente é desigual. A estabilização eletrostática acontece quando, entre as partículas, as forças eletrostáticas repulsivas excedem as forças atrativas de Van der Waals. A DCE possui duas camadas de íons paralelos. A primeira camada é denominada carga de superfície (podendo ser negativa ou positiva), onde é a superfície do corpo. A segunda camada tem carga oposta à primeira camada e está na superfície do líquido. Esta segunda camada é denominada difusa porque é constituída de íons livres pela influência do movimento térmico e da atração elétrica.

Existem vários exemplos de DCE no nosso cotidiano, como tintas, cimentos, argamassas cerâmicas e o sangue. O método de DCE é eficiente em meios orgânicos polares ou sistemas diluídos. Este método também é altamente sensível à mudança da concentração de eletrólitos, pois a alteração da mudança de cargas pode fazer com que a DCE seja destruída e, com isso, ter a agregação das partículas. A Figura 5 representa um esquema de DCE.



**Figura 5 – Desenho esquematizando a DCE em um líquido em contato com um corpo sólido. Fonte: Garcia (2011).**

O segundo tipo de estabilização está relacionado com forças estéricas. A interface aparece quando as cadeias moleculares dos surfactantes apresentam uma cauda móvel na solução. Na aproximação das partículas, a mobilidade dessas caudas diminui resultando em um efeito entrópico. As cadeias liofílicas das moléculas dos surfactantes fazem uma interação com o solvente e são absorvidas pelas superfícies das partículas. No caso de ausência de barreiras elétricas, a estabilização estérica pode ser efetiva em meios aquosos e não aquosos. A estabilidade da partícula está diretamente ligada com a viscosidade do meio. Os surfactantes são avaliados de duas formas: pela eficiência em produzir mudanças na energia livre e o efeito máximo que pode ser alcançado quando o surfactante satura a superfície (OLIVEIRA, 2005). Na Figura 6 estão representados os dois processos de estabilização.



**Figura 6 – (a) Tamanho de partícula estabilizado por DCE, (b) Estabilização por forças estéricas.**

Fonte: Garcia (2011).

### 3.3.1 Surfactantes

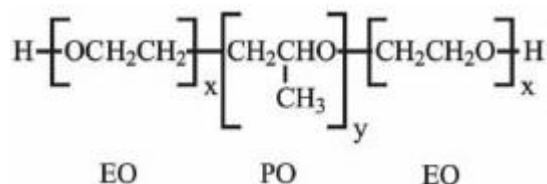
Os surfactantes químicos são moléculas anfífilas, ou anfipáticas, que contêm um grupo hidrofílico (grupo polar) ou iônico e um grupo hidrofóbico (não polar), normalmente uma grande cadeia de hidrocarboneto. Quando as moléculas dos surfactantes estão em solução, devido a sua estrutura, as moléculas ficam na superfície da água diminuindo a tensão superficial. Após a saturação da superfície as moléculas interagem entre si, formando aglomerados de moléculas. Esse aglomerado de moléculas formado é denominado micela e a concentração em que a primeira micela é formada é chamada concentração micelar crítica (CMC) (SILVA, 2015).

Segundo o trabalho de Araújo (2010) existe uma dependência da concentração do surfactante e o aumento na formação das AgNPs. Neste trabalho foi empregado uma quantidade de surfactante acima da CMC e quantificaram-se por espectrofotometria as nanopartículas formadas. Concluiu-se então à partir dessa pesquisa que a presença de micelas do surfactante foi primordial para a produção de nanopartículas mostrando uma reação de catálise micelar. Portanto, com o aumento de micelas presentes, há um aumento na síntese de AgNPs, pois, o surfactante forma uma camada sobre as partículas de prata carregadas negativamente e, com isso, evita a agregação e o crescimento das nanopartículas.

Existem diferentes grupos de surfactantes, onde para aplicações medicinais, tem se destacado os polaxâmeros ou plurônicos. Os plurônicos são poliméricos triblocos, sendo suas moléculas constituintes de Poli Óxido de Etileno (PEO) e Poli

Óxido de Propileno (PPO) rearranjados da seguinte forma: PEO<sub>x</sub>-PPO<sub>y</sub>-PEO<sub>x</sub>. Sendo PEO grupo hidrofílico e o PPO grupo hidrofóbico. Dependendo da quantidade de cada grupo presente, tem-se a mudança da lipofilicidade do surfactante (ALEXANDRIDIS; HOLZWARTH; HATTON, 1994).

A Figura 7 ilustra o plurônico F-127 (massa molar de 12600 g mol<sup>-1</sup>), que será utilizado nesse trabalho para a estabilização das nanopartículas de prata. A organização do plurônico F-127 depende da temperatura e da concentração, isto é, além de possuir uma CMC este tipo de surfactante apresenta também uma temperatura micelar crítica (TMC). Assim, abaixo de 24 °C (TMC do F-127 1% m/v) (ALEXANDRIDIS; HOLZWARTH; HATTON, 1994) as moléculas do surfactante encontram-se como monômeros e acima desta temperatura formam micelas. Com isso, ele é capaz de controlar a liberação e transportar substâncias com baixa solubilidade nos meios biológicos (SANTOS, 2015). Adicionalmente, dependendo da concentração e temperatura, o material pode formar um sol-gel. Na concentração de 20 % (m/v) o F-127 gelifica a 27 °C.



**Figura 7 – Estrutura molecular do surfactante polimérico plurônico F-127**

Obs: F-127: EO<sub>100</sub>PO<sub>65</sub>EO<sub>100</sub>

Fonte: Gerola (2013).

A parte da micela formada pelo PEO do F-127 é um bloco que forma uma coroa para transporte em sistemas fisiológicos, pelo fato de apresentar alta mobilidade e hidratação em meio aquoso, atrapalhando a interação desses com proteínas que excretariam as micelas. O núcleo do F-127 é hidrofóbico possibilitando que ele transporte substâncias pouco solúveis em água (SANTOS, 2015).

Segundo Santos (2015), outra metodologia para transportar fármaco é unindo o F-127 com nanopartículas de ouro que também transportam fármacos devido a sua superfície. A associação da nanopartícula de ouro com o plurônico mostra-se

um caminho promissor para o transporte biológico de fármacos, uma vez que eles poderiam ser ingeridos por administração oral ou parenteral do medicamento, visto que prolongaria sua permanência no organismo. Isso se dá pelo fato do plurônico F-127 ser capaz de formar arranjos micelares a uma determinada concentração, fazendo com que a associação dos dois sistemas seja uma boa opção para aplicar na área de saúde (SANTOS, 2015).

Testes realizados por Simon, Boca e Astilean (2012) com nanopartículas de ouro associadas com plurônico F-127 acima da concentração micelar crítica mostram que o sistema pode ser utilizado para o transporte de fármacos biologicamente ativos. Nesse caso, o surfactante foi utilizado como agente redutor e estabilizador das nanopartículas, além de conter azul de metileno incorporado.

### 3.4 TESTES ANTIMICROBIANOS

Os mecanismos de ação bactericida e inibitória da prata sobre muitos micro-organismos são conhecidos há muito tempo e atualmente houve um aumento na pesquisa sobre sua atividade antimicrobiana que permite sua aplicação na medicina e higiene (MACHADO, 2012).

Atualmente, a atividade antimicrobiana da nanopartícula de prata foi notada em fungos e bactérias patogênicas como: *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*. Estudos mostram que as AgNPs são mais eficientes para Gram-positivas do que Gram-negativas, isso se dá pelo fato de que as bactérias Gram-negativas, geralmente, são mais resistentes por causa da sua complexidade da membrana celular, dificultando a entrada e difusão das AgNPs para dentro desses micro-organismos (ANTUNES et al., 2013). Esses estudos também estão direcionados à toxicidade e aos mecanismos de ação dessas nanopartículas.

Existem vários mecanismos que explicam a ação bactericida de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ), sendo o principal relacionado a sua atuação a nível de membrana dos micro-organismos. Os íons interferem também na remoção de cátions  $\text{Zn}^{++}$  e  $\text{Ca}^{++}$  das bactérias por efeito de substituição. Eles também inibem o crescimento dos micro-organismos e interagem com o DNA das células microbianas impedindo a



reprodução celular. O efeito antimicrobiano dos íons prata é proporcional a sua concentração, pois, quanto maior é a concentração de  $\text{Ag}^+$ , maior é sua ação antimicrobiana. Na Figura 8 a representação do mecanismo da atividade antimicrobiana dos íon  $\text{Ag}^+$  é ilustrada.

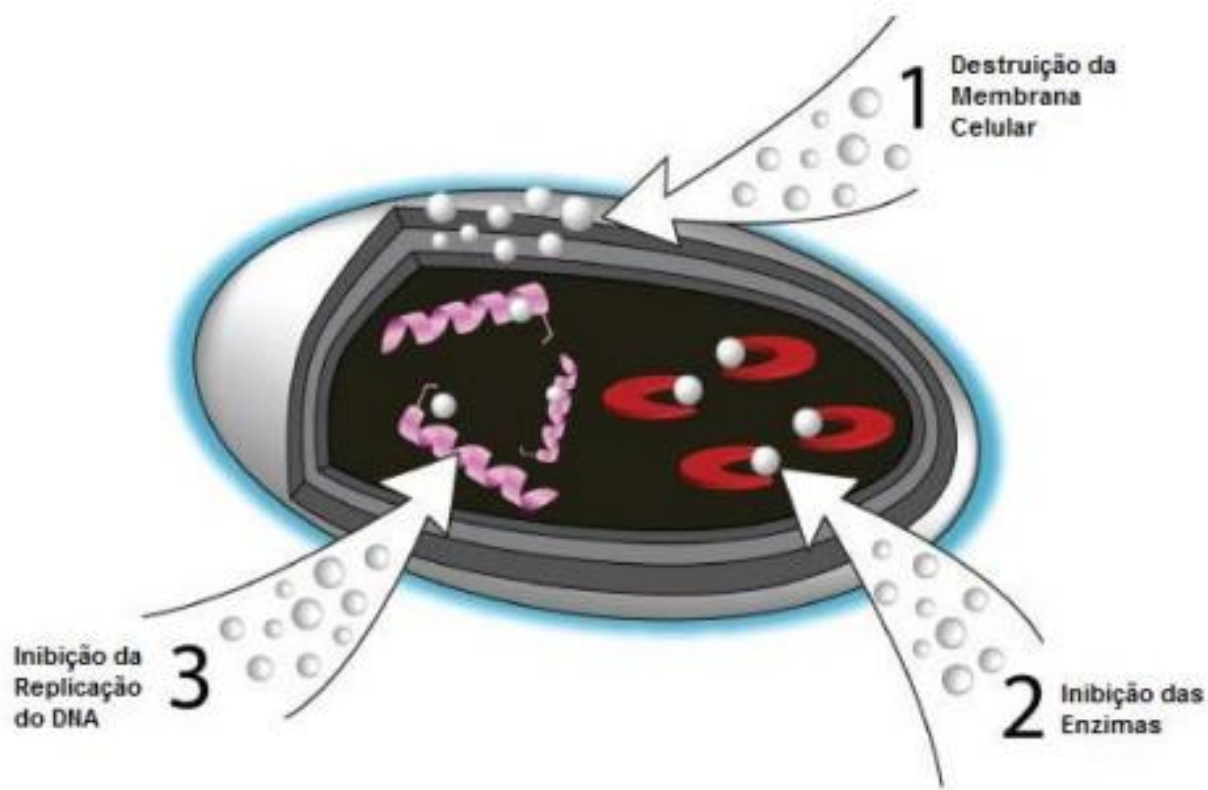


Figura 8 – Representação da atividade antimicrobiana de íons de prata.  
Fonte: MORONES (2005).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

Para síntese das AgNPs foi utilizado o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) que foram obtidos da Merck. O surfactante polimérico F-127 da classe dos Pluronic® foi adquirido da Sigma-Aldrich. Foi utilizada água ultrapura para as análises.

### 4.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

#### 4.2.1 Otimização das condições de síntese

Para sintetizar as AgNPs foi utilizado o método de redução química do sal  $\text{AgNO}_3$  usando borohidreto de sódio como agente redutor/estabilizante, segundo o método de Melo Jr. *et al.* (2012). Em um Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 50 mL de uma solução  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de borohidreto de sódio. O frasco foi colocado em um banho de gelo de 10 minutos. Após esse tempo, o frasco foi colocado numa placa de agitação.

Com uma bureta, adicionaram-se, gota a gota, diferentes volumes de uma solução  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de nitrato de prata: 2,00, 5,00, 8,00, 11,00 e 14,00 mL. A adição ocorreu aproximadamente com uma taxa de  $1 \text{ gota s}^{-1}$ . Dessa forma, as cinco soluções preparadas foram nomeadas, respectivamente, como Solução 1, 2, 3, 4 e 5.

Adquiriu-se uma solução padrão com a coloração amarelada que teve seu espectro eletrônico obtido imediatamente. Foi anotado então o comprimento de onda de máxima absorção para estimar o valor da largura de banda.

#### 4.2.2 Teste de estabilidade das nanopartículas de prata

Após a síntese das AgNPs, as Soluções 1, 2, 3, 4 e 5 foram divididas em outras soluções para analisar condições de armazenamento diferentes: i) G (geladeira) e E (escuro); ii) TA (temperatura ambiente  $\leq 27^{\circ}\text{C}$ ) e L (luz) e iii) TA e E, totalizando 15 amostras. As soluções foram analisadas por espectroscopia eletrônica diariamente, por 7 dias, para verificar a estabilidade do sistema.

#### 4.2.3 Estabilização por plurônico F-127

Primeiramente foi feito um teste incorporando-se as AgNPs sintetizadas com as soluções 1, 3 e 5 no F-127 20%. Devido ao lento processo de solubilização do surfactante e do recipiente não ser adequado, foram necessários 7 dias (na geladeira) para solubilização total, havendo uma grande agregação do material.

O teste com o plurônico F-127 foi então refeito, porém foi escolhido apenas a nanopartícula preparada com o volume de 8,00 mL de nitrato de prata, isto é solução 3. A solução foi então dividida em duas partes, uma mantida como padrão e outra recebeu o F127 (sólido) a na concentração de 20 % (m/v). Foram separadas três condições diferentes de armazenamento dessas soluções: o Tubo A foi deixado na geladeira, o Tubo B foi deixado na temperatura ambiente, ambos no estado líquido e o Tubo C foi deixada na estufa ( $35^{\circ}\text{C}$ ), os três recipientes foram protegidos da luz com papel alumínio. Foi tirado espectro eletrônico diariamente, por 7 dias, do Tubo A e B, e o Tubo C foi avaliado no tempo zero, 7 e 14 dias após colocado na estufa. Foi anotado então o comprimento de onda de máxima absorção para estimar o valor da largura de banda.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 4.3.1 Espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis

As amostras foram analisadas à partir de espectros de absorção na região do Ultravioleta-visível das soluções contendo as AgNPs e com o plurônico F-127 incorporado com as AgNPs, em um equipamento Cary 60 (Agilent Technologies), na faixa de comprimento de onda de 200 – 800 nm, com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,00 cm. A partir dos espectros, foi estimado o valor da largura de banda.

#### 4.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão permite visualizar o tamanho das nanopartículas. As amostras foram preparadas por imersão nas grades de cobre recobertas com carbono por 10 min na suspensão de AgNPs e deixando secar a temperatura ambiente. Essas foram analisadas em microscópio de transmissão eletrônica (JEOL JEM-1400 com voltagem de aceleração de 120kV).

### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a avaliação do potencial bactericida das amostras de AgNPs sintetizadas foi utilizado o método de disco-difusão em ágar, que consiste em um procedimento para medir o tamanho relativo da zona de inibição (ZOI) ao redor do agente testado. Para isso, um inóculo padrão da *E. coli* foi esfregado pelo método de “Spread Plate” sobre o meio de cultura Plate Count Agar, onde foram colocados papéis-filtro estéreis imersos com água deionizada (controle negativo), F-127, AgNPs e gel (AgNPs incorporadas com F-127). Logo em seguida, as placas foram

incubadas em estufa bacteriológica, por 48 h a 35°C, medindo depois as ZOI formadas ao redor do disco.

#### 4.4.1 Análise estatística da atividade antimicrobiana

Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) para comparar os quatro tratamentos: o controle, surfactante F-127, gel (AgNPs + F-127) e as nanopartículas (AgNPs). Em seguida, após concluirmos que há diferença significativa entre esses tratamentos, por meio do teste F, foi avaliada a grandeza destas diferenças utilizando o teste de Tukey (comparação de médias) para 15 medidas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SÍNTESE

Utilizando borohidreto de sódio e nitrato de prata, foram sintetizadas AgNPs baseada na metodologia descrita por Melo Jr. *et al.* (2012). Foram avaliadas as Soluções 1, 2, 3, 4 e 5 nas diferentes condições: temperatura ambiente e luz (TA/L); temperatura ambiente e escuro ( $TA \leq 27^{\circ}\text{C}$  /E), e geladeira e escuro (G/E). A coloração de cada volume de AgNPs foi intensificando conforme aumentou-se o volume de nitrato de prata.

Essa coloração é característica de materiais nobres na forma de nanopartículas (GARCIA, 2011). Segundo Berni e Neto (2010), a mudança da coloração (Figura 10), durante a síntese das nanopartículas está relacionada com o fenômeno chamado de ressonância plasmônica de superfície, onde há excitação de elétrons presentes na interface entre um isolante e um condutor. O formato e o tamanho das nanopartículas são fatores importantes que determinam a faixa espectral de absorção, portanto, onde acontece a ressonância. Com o aumento das AgNPs, ocorre a mudança da cor da solução padrão, passando de amarelada para laranja, e posteriormente violeta até chegar na cor cinza, característica da prata macroscópica.

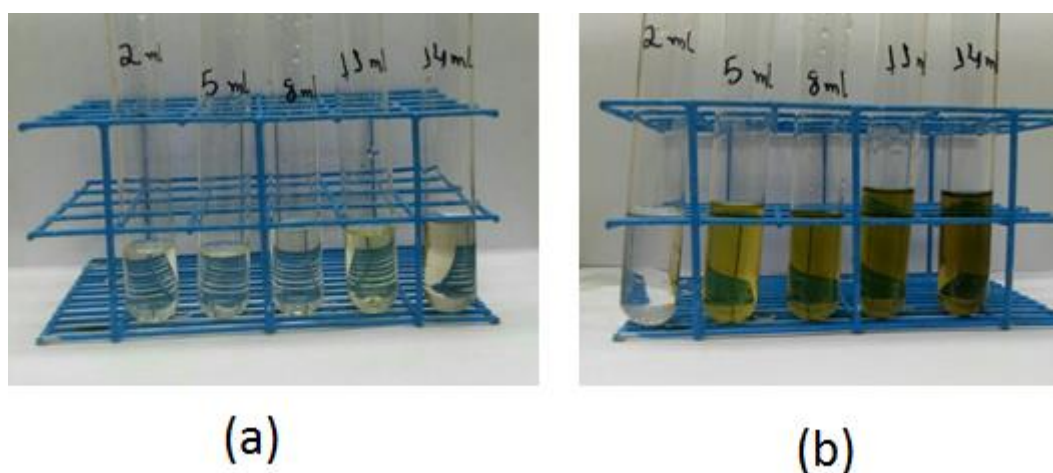
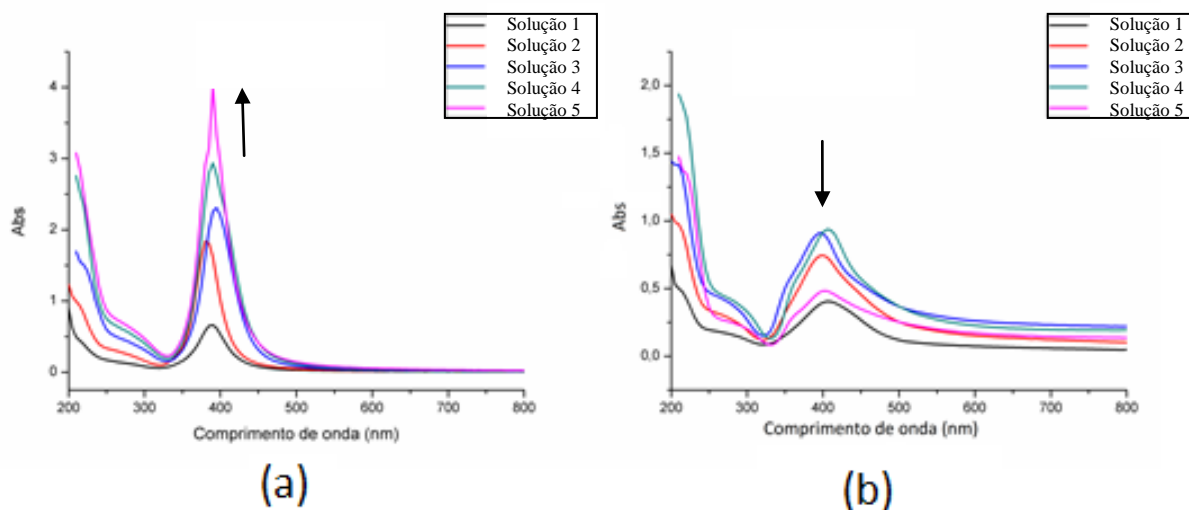


Figura 9 – Nanopartículas sintetizadas a partir de volumes diferentes de nitrato de prata para Solução 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente para (a) síntese e (b) após 47 dias de armazenamento.

As diferentes condições de AgNPs foram avaliadas por meio de espectros de absorção eletrônica durante 7 dias seguidos e avaliou-se a largura de banda desses espectros. A Figura 11 mostra os espectros do primeiro e do último dia das AgNPs dos diferentes volumes adicionados de nitrato de prata.



**Figura 10 – Espectro de UV-Vis das AgNPs com as Soluções 1, 2, 3, 4 e 5 (a) no dia da síntese e (b) 7 dias após.**

Como podemos observar nos espectros (Figura 11) dependendo do volume adicionado de nitrato de prata no primeiro dia (a), a banda plasmônica característica das AgNPs cai significativamente. Quanto maior o volume de nitrato adicionado maior é a produção de nanopartículas, pois tem-se mais sítios de nucleação para forma-las.

Porém, depois de 7 dias (b), a absorbância cai drasticamente devido a agregação das nanopartículas e a banda alarga devido a polidispersão dessas AgNPs. A Solução 3 é o limite de estabilidade das AgNPs, pois à partir dele começa a surgir um leve ombro no espectro, mostrando o estado de aglomeração das nanopartículas devido a banda plasmônica. Segundo Brause et al. (2002), com o aumento das partículas pela agregação, o espectro de absorção de nanopartículas metálicas desloca-se para comprimentos de ondas maiores, conforme pode ser observado na Figura 11 ao passar de (a) para a (b).

Pelos espectros, foi medido a largura de meia banda onde foi avaliada a melhor condição de síntese: temperatura ambiente ( $TA \leq 27^{\circ}\text{C}$ ) e luz (L); temperatura ambiente (TA) e escuro (E), e geladeira(G) e escuro (E). Para isso foram comparadas as larguras de banda do primeiro e do último dia dessas condições, nos diferentes volumes, pois ela mostra o nível de agregação das AgNPs.

**Tabela 3 – Largura de banda (nm) na síntese e após 7 dias, nas diferentes condições de síntese e volume adicionado de nitrato de prata.**

<b>Volume de AgNO<sub>3</sub></b>	<b>Datas</b>	<b>TA <math>\leq</math> 27°C/L</b>	<b>TA <math>\leq</math> 27°C/E</b>	<b>G/E</b>
<b>Solução 1</b>	Síntese	80	80	75
	Após 7 dias	140	84,9	95
<b>Solução 2</b>	Síntese	90	85	70
	Após 7 dias	95	95	85
<b>Solução 3</b>	Síntese	90	80	75
	Após 7 dias	100	95	85
<b>Solução 4</b>	Síntese	77,8	80	68
	Após 7 dias	89,5	95,5	78
<b>Solução 5</b>	Síntese	106	109	61
	Após 7 dias	126	117	94

Considerando a estabilidade inicial do material nanoparticulado, dia da síntese, a condição mais adequada é o armazenamento no escuro e a baixa temperatura, uma vez que apresenta as menores larguras de meia banda. Este fato indica menor polidispersão do sistema. Entretanto, com o tempo esta condição não se mostra muito adequada para o armazenamento do material. Isto pode ser observado pelo aumento da largura de meia banda calculada após 7 dias. Este fato deve estar associado à maior autoagregação de nanopartículas favorecida em condições de baixa temperatura, o que acarreta em aumento de polidispersão.

Embora as outras duas condições inicialmente não sejam ideais, o efeito temporal parece ser menos intenso na alteração da polidispersividade das nanopartículas, principalmente aquelas armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Assim, essa condição seria mais indicada para a manutenção das nanopartículas.



## 5.2 ENCAPSULAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM PLURÔNICO F-127

Após ter realizado a síntese das AgNPs em condições e volumes de nitrato de prata, percebeu-se que um dos maiores desafios relacionados a este procedimento está em manter as nanopartículas estáveis com o mesmo tamanho, evitando a aglomeração. Para tentar evitar então essa agregação, é utilizado surfactantes, onde estes são moléculas orgânicas de cadeias longas que ficam envolta da superfície das nanopartículas, aumentando sua estabilização.

Foi realizado então um teste inicial com AgNPs nos diferentes volumes de  $\text{AgNO}_3$  com o F-127 a 20%. Esta concentração foi escolhida, pois nessa condição o surfactante comporta-se como um sol-gel, isto é, líquido abaixo de  $27^\circ\text{C}$  e gel acima desta temperatura. As soluções 1, 3 e 5 foram escolhidos para a preparação das AgNPs. A Figura 12 mostra as soluções contendo AgNPs e o surfactante, formando o gel, onde estes foram armazenados em estufa na temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , por 7 e 14 dias após o encapsulamento.

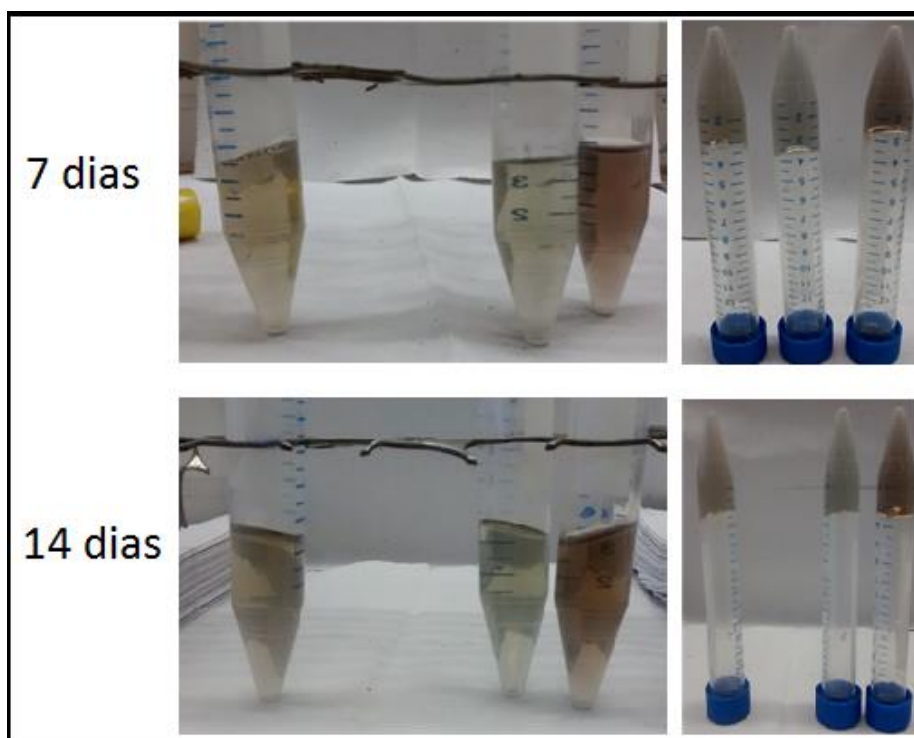
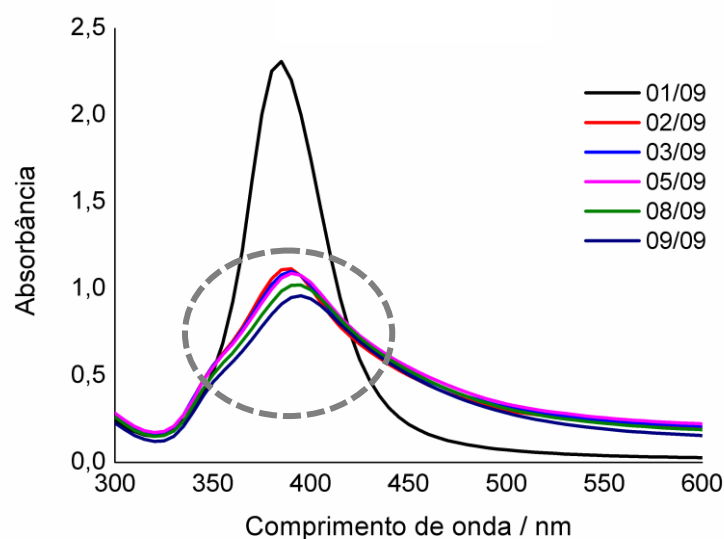


Figura 11 – Gel (AgNPs + F-127 20%) armazenado na estufa durante 7 dias e 14 dias após a sua solubilização em geladeira (7 dias), as Soluções 1, 3 e 5, da esquerda para direita.

Devido ao lento processo de solubilização do surfactante (associado a sua elevada concentração) e das características geométricas do recipiente foram necessários 7 dias na geladeira para a completa solubilização. Por esse motivo, as cores das nanopartículas foram fortes por causa da sua elevada autoagregação, ou seja, provavelmente o material encapsulado já continha partículas grandes (autoagregadas de AgNPs).

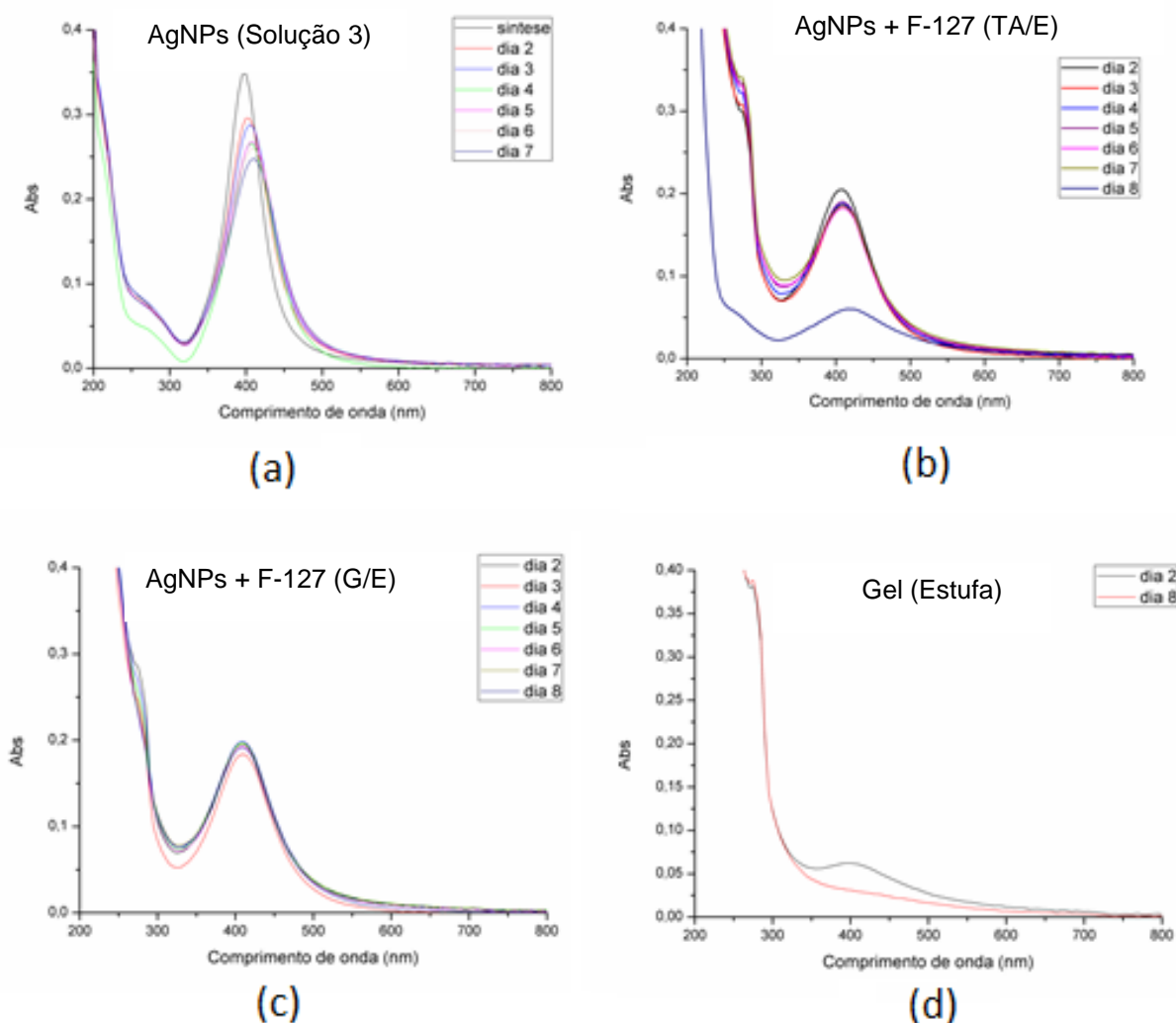
Logo após este teste, juntamente com os resultados prévios da otimização das condições de síntese, foi escolhido a condição da Solução 3 para a síntese da AgNP a ser encapsulada com o surfactante plurônico F-127. Esta solução foi escolhida pois é o limite de estabilidade das AgNPs, porque à partir dele começa a formação de ombro na banda plasmônica. Assim, as condições avaliadas foram: geladeira/escuro (G/E), estufa a 35,5 °C/escuro (Gel/E) e temperatura ambiente/escuro (TA/E). A Figura 13 ilustra os espectros de absorção com o tempo, a qual observa-se a formação de um ombro (indicativo de aumento de polidispersão) já a partir do segundo dia.



**Figura 12 – Espectro de absorção UV-Vis para AgNPs de 8 mL geladeira/escuro (G/E) de nitrato de prata, avaliado durante 7 dias após a síntese, mostrando o deslocamento da banda.**

Foi sintetizada então uma nova solução de AgNPs da Solução 3 para encapsular com o surfactante F-127, com uma concentração de 20%, nas mesmas condições: (G/E), (Gel/E) e (TA  $\leq$  27°C/E). Ressalta-se que apenas a amostra

aconditionada na estufa encontrava-se na forma gel. Essas condições foram avaliadas durante 7 dias após a síntese. Os espectros constam na Figura 14 onde estão descritos todos os dias de análise.



**Figura 13 – Os espectros apresentam a intensidade dos picos nas diferentes condições por 7 dias de análises, (a) AgNPs em solução aquosa (Solução 3); nos outros espectros a AgNPs é incorporada com o F-127 à 20% (b) temperatura ambiente/escuro ( $TA \leq 27^\circ\text{C}/E$ ); (c) geladeira/escuro (G/E); (d) estufa à  $35,5^\circ\text{C}/\text{escuro}$  (Gel/E).**

Os espectros ilustrados acima evidenciam dois fatos: i) após o encapsulamento das AgNPs no surfactante polimérico a intensidade de absorção é reduzida, fato que pode indicar uma baixa taxa de encapsulamento; ii) as AgNPs encapsuladas mostraram-se mais estáveis com o tempo quando comparada aquelas

que permaneceram em solução aquosa. Adicionalmente, o armazenamento do nanomaterial na forma gel não mostrou-se muito adequado, uma vez que foi observado uma redução drástica da banda plasmônica. A Tabela 4 apresentando a largura de banda e o comprimento de onda máximo de cada amostra, do primeiro dia e do último dia analisado.

**Tabela 4 – Largura de banda da síntese de AgNPs e AgNPs acoplada com plurônico F-127 em diferentes condições, avaliadas durante 7 dias.**

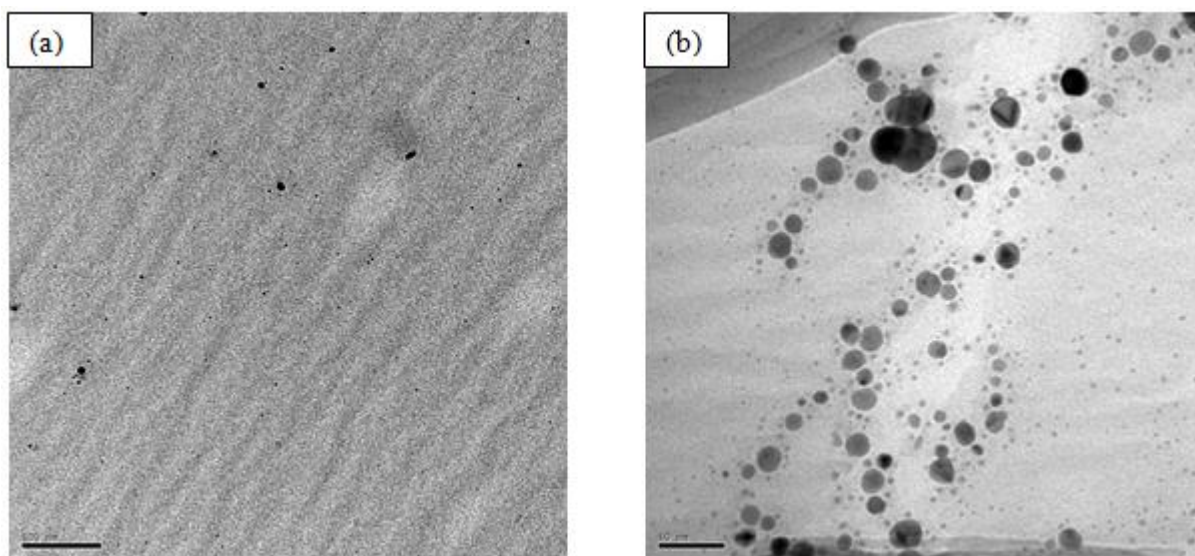
<b>Amostra Solução 3</b>	<b>Data</b>	<b>Comprimento de onda máx (nm)</b>	<b>Largura de banda (nm)</b>
<b>AgNPs (padrão)</b>	Síntese	405	64,8
	Após 7 dias	410	74
<b>AgNPs + F-127 (TA ≤ 27°C/E)</b>	Síntese	407	69
	Após 7 dias	410	61,7
<b>AgNPs + F-127 (G/E)</b>	Síntese	409,9	68,5
	Após 7 dias	410	66

Os dados da Tabela 4 indicam que a largura de banda e o comprimento de onda máximo de absorção aumentam com o tempo para a AgNP mantida em solução aquosa. Estes fatos indicam aumento do índice de polidispersão causado, provavelmente, pelo aumento da autoagregação. Entretanto ao analisar o material encapsulado estes efeitos são menos intensos indicando que o processo de encapsulamento realmente protege as AgNPs da autoagregação. Inclusive a largura de banda das AgNPs diminuem nos formulados evidenciando a melhor estabilidade das nanopartículas de prata e a menor agregação. O comprimento de onda máximo de absorção praticamente se manteve inalterado com as AgNPs e o surfactante F-127 na geladeira, sinalizando que não houve alteração no tamanho das AgNPs, se comportando como um sistema estável quando comparado sem o surfactante. Esse resultado se dá pelo fato de que o surfactante participa do processo de crescimento das nanopartículas e pelo impedimento estérico.

### 5.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram realizadas micrografias apenas para a nanopartícula mantida em solução aquosa. Houve uma tentativa em analisar os materiais incorporados, entretanto, devido à elevada concentração do surfactante, o filme formado foi muito espesso, fato que prejudicou as análises realizadas.

A Figura 15 mostra que as nanopartículas formadas que apresentam formato aproximadamente esférico. Na Figura 15 (a) pode-se verificar a formação de AgNPs extremamente pequenas, da ordem de 2-5 nm de diâmetro. Já a Figura 15 (b) indica a formação de materiais com tamanho maior, da ordem de 15-20 nm. Desta forma os dados de microscopia estão em concordância com a literatura (SOLOMON et al., 2007) observada para as AgNPs sintetizadas pelo mesmo procedimento do presente trabalho. Adicionalmente, as micrografias são condizentes com os espectros de UV-Vis obtidos, isto é, posição da banda plasmônica (tamanho) e com a largura de meia banda (polidispersão).



**Figura 14 – Microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs (a) ampliação de 120.000; (b) 200.000 vezes.**

Com as imagens de microscopia foi utilizado o programa Image-PRO Plus para estimar o tamanho das AgNPs. É preciso que seja analisada uma amostra significativa da população, considerando-se que 150 valores seja a quantidade

mínima para uma boa representatividade. Sendo assim, no presente trabalho foi utilizada uma amostra de 180 AgNPs.

Com os valores encontrados do tamanho das AgNPs foi feito o histograma, Figura 16, e calculado o tamanho médio das AgNPs onde a média ficou entre 20,7147 nm e desvio padrão de 8,5518 nm.

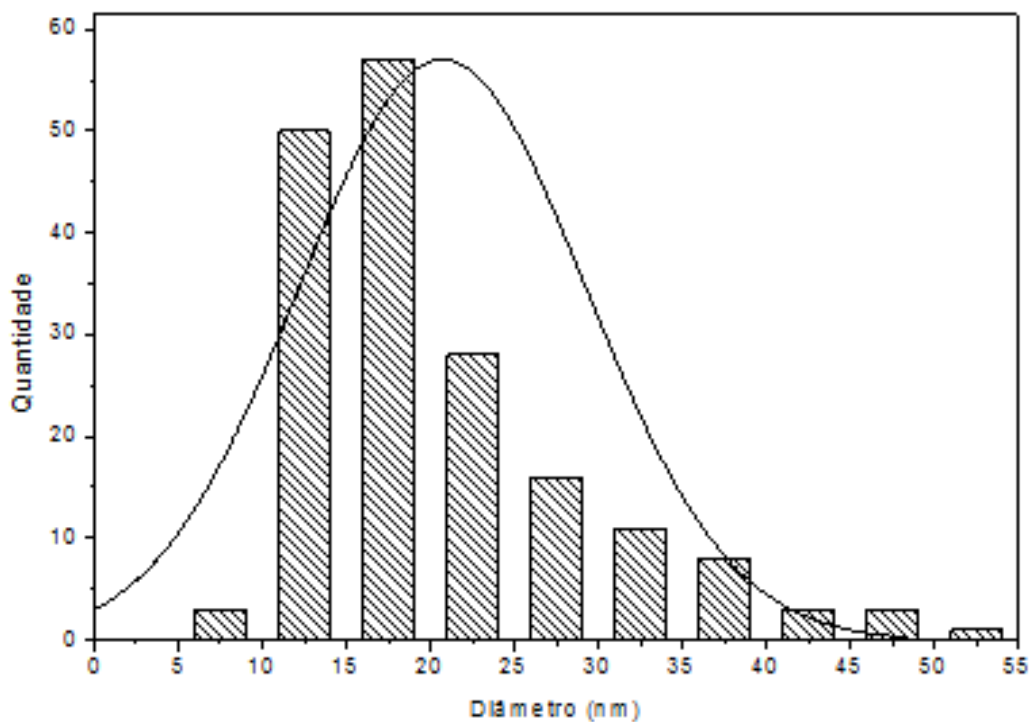


Figura 15 - Histograma com o tamanho médio das AgNPs.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AgNPs

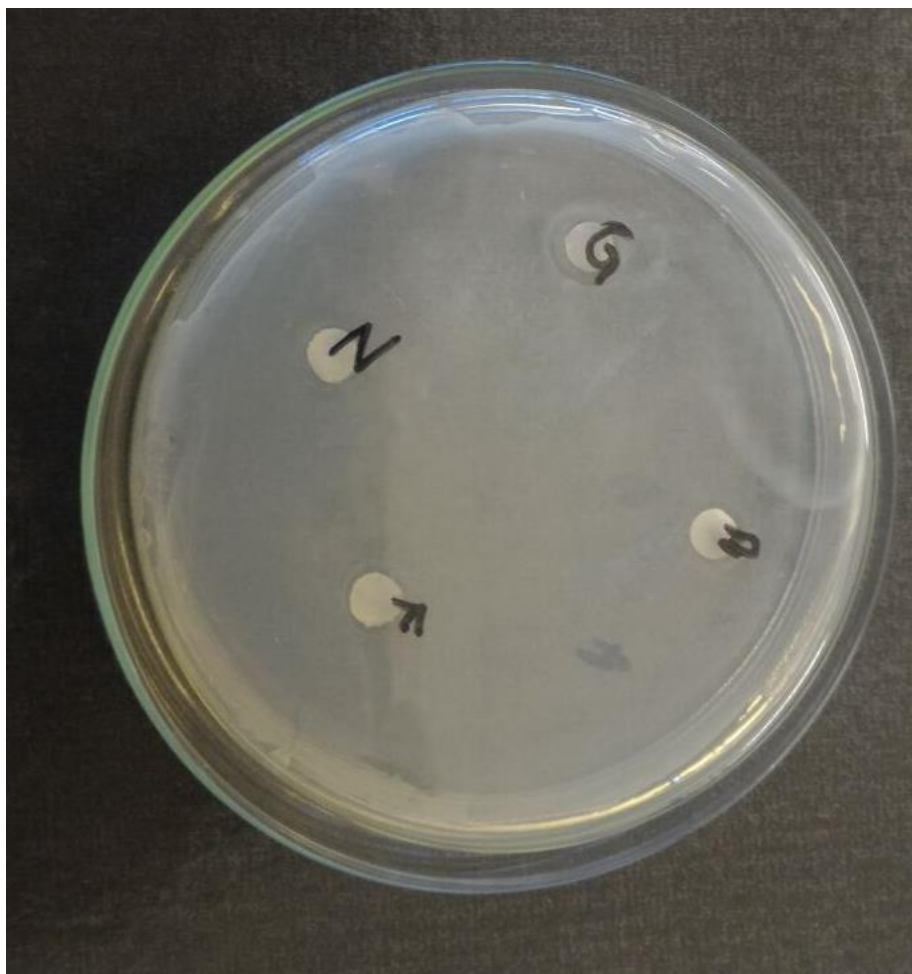
Foi realizado um teste inicial pela técnica de Pour-Plate, onde foi disposto as nanopartículas incorporadas com o surfactante F-127 na forma de gel no meio de cultura com a bactéria *E. coli* para avaliar a capacidade microbiana. A Figura 16 mostra a ação antimicrobiana do gel, onde este não permitiu o crescimento da bactéria.



Figura 16 – Teste piloto com incorporação do gel no meio de cultura com *E. coli*.

#### 5.3.1 Análise estatística da atividade antimicrobiana

Logo em seguida foi realizado o teste de halo de inibição para avaliar a diferença da ação antimicrobiana das amostras: (N) controle; (F) F-127; (A) AgNPs em solução aquosa; e (G) Gel (AgNPs incorporadas com F-127), como mostra a Figura 17.

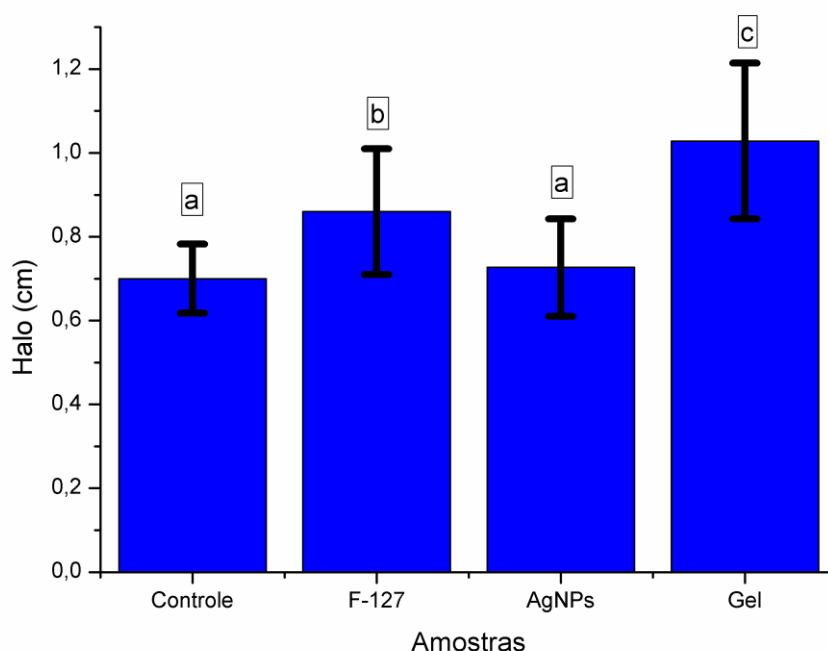


**Figura 17 – Halo de inibição das diferentes amostras: (N) controle; (F) F-127; (A) AgNPs em solução aquosa; e (G) Gel (AgNPs incorporadas com F-127).**

Através do tamanho do halo de inibição foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) para comparar os quatro tratamentos: (N) controle; (F) F-127; (A) AgNPs; e (G) Gel (AgNPs incorporada com F-127). Após aplicar o Teste “F” para o tratamento da ANOVA, sendo este significativo entre os tratamentos, foi realizado o teste de comparação de média, o Teste de Tukey.

Este teste é utilizado para testar toda diferença entre duas médias de tratamento e comparar se indicam diferenças significativas. O nível de confiança utilizado foi de 95% para este teste, como mostra na Figura 18.





**Figura 18 – Médias e desvio padrão do halo de inibição das diferentes amostras presentes com a *E. coli*. As letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de  $p > 0,05$  – Análise de variância ANOVA, teste de Tukey.**

Como podemos avaliar, não há diferença significativa do tratamento apenas com as AgNPs. Essa baixa sensibilidade à prata demonstrada à bactéria *E-coli* pode ser explicada devido a composição de sua membrana Gram-negativa, onde é composta por uma camada de lipopolissacarídeos (LPS) que favorecem uma barreira efetiva contra nanopartículas (BRAYNER et al., 2006; FAN et al., 2002). Outro fator que pode explicar também é o tamanho das nanopartículas, pois as AgNPs precisam ser menores que 10 nm para conseguir penetrar com eficiência na parede celular da bactéria e com a análise do tamanho das AgNPs estas tinham tamanho médio maior (aproximadamente 20 nm).

Isso pode ser comprovado quando adiciona-se o surfactante F-127 com as AgNPs, pois foi o método em que a diferença significativa foi maior. Esse fato pode ser explicado pela estabilização estérica causada pelo surfactante, impedindo a aglomeração das AgNPs, sendo assim elas puderam penetrar melhor na membrana celular das bactérias. Por ela se manter com menor agregação, outra explicação é que os íons de prata liberados das AgNPs podem inativar sua replicação, atuando no fosfato das moléculas do DNA. Outro mecanismo encontrado na literatura

também é de que os íons de prata acarretariam em uma reação com proteínas da bactéria que contém enxofre, causando a inibição de suas funções enzimáticas (GUPTA et al., 1998; MATSUMURA et al., 2003).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos verificou-se a importância das condições experimentais para a síntese das nanopartículas de prata, em especial aquelas referentes ao volume de nitrato de prata e da velocidade de adição deste. Ainda nesse tocante, os resultados demonstraram que embora a baixa temperatura seja favorável a manutenção das propriedades das AgNPs, com o tempo essa condição é inapropriada para a estabilização das mesmas.

Os resultados obtidos indicaram que os surfactantes poliméricos, em especial o F-127, aumenta a estabilidade de nanopartículas de prata sintetizadas a partir do método de borohidreto. Estes materiais preservaram as características das AgNPs por longos períodos de tempo quando comparado com as mesmas partículas mantidas em solução aquosa. Adicionalmente, o F-127 potencializou a ação bactericida das AgNPs frente a *E. coli*, bactéria Gram-negativa. Este fato deve estar associado a melhor entrega das nanopartículas, proporcionada pelo F-127, à complexa membrana dessa classe de micro-organismo. Ainda, os testes *in vitro* mostraram que a formulação das AgNPs em um sistema sol-gel é viável. O sistema desenvolvido no presente trabalho tem um apelo interessante, pois responde ao efeito da temperatura, em especial a corpórea. Este trabalho abre portas para que novas pesquisas sejam desenvolvidas nessa área, incluindo testes microbiológicos quantitativos.

## REFERÊNCIAS

AIKEN, John D.; FINKE, Richard G. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 145, p. 1-44, 1999.

ALEXANDRIDIS, Paschalis; HOLZWARTH, Josef F.; HATTON, T. Alan. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propyleneoxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. **Macromolecules**, v. 27, p. 2414-2425, 1994.

ANTUNES, Fabiana S. et al. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20-26, 2013.

BROWN, Leif O.; HUTCHISON, James E. Formation and Electron Diffraction Studies of Ordered 2-D and 3-D Superlattices of Amine-Stabilized Gold Nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 105, p. 8911-8916, 2001.

BASTOS, Ricardo M. de P. **Nanotecnologia: Uma revolução no desenvolvimento de novos produtos**. Juiz de Fora, 2006. 35 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2006.

BRAYNER, R. et al. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultra ZnO nanoparticles colloidal médium. **Nano Lett**, v. 6, p. 866-870, 2006.

CAMARGO, Emerson R.; LEITE, Edson R.; RIBEIRO, Cauê. Efeito do pH na síntese de uma dispersão coloidal de nanopartículas de prata utilizando o ácido cítrico como agente redutor. **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. São Paulo, dez. 2007.

CASANOVA, Monise C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. São Carlos, 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 587-590, 2007.

DREXLER, K. E. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 5275-5278, 1981.

FAN, L. et al. Interaction of ozone and negative air ions to control microorganisms. **J App Microbiol**, v. 93, p. 144-148, 2002.

FONSECA, Glédison S. **Nanopartículas de irídio em líquidos iônicos: síntese, caracterização e aplicação em reações de hidrogenação catalítica**. Porto Alegre, 2005. 252 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

GARCIA, Marcus V. D. **Síntese, caracterização e estabilidade de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. Campinas, 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GEROLA, Adriana et al. Estudos quimiométricos da pheo formulada em pluronics®: ação fotodinâmica sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 97-101, 2013.

GOGOTSI, Yuri. Introduction to Nanotechnology: Definition – What is nanotechnology?. **Nano were**. Disponível em: <[http://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction\\_to\\_nanotechnology\\_1.php](http://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction_to_nanotechnology_1.php)>. Acesso em: 20 abr. 2016.

GUPTA, et al. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v.64, p. 5042-5045, 1998.

GUZMÁN, Maribel G.; DILLE, Jean; GODET, Stephan. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **World Academy of Science: Engineering e Technology**, v. 43, p. 367, 2008.

JIAN, Zhu; YONGCHANG, Wang; YIMIN, Lu. Fluorescence spectra character of silver-coated gold colloidal nanoshells. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 155-161, 2004.

KIM, Jun S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 95-101, 2007.

LEE , P. C.; MEISEL, D. Adsorption and Surface – Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, p. 3391-3395, 1982.

LEVIN, Carly S. et al. Magnetic plasmonic core-shell nanoparticles. **Journal American Chemical Society - ACS Nano**, v. 3, p. 1379-1388, 2009.

MACHADO, Fernanda M. **Avaliação do uso de nanopartículas de prata e atividade microbiana para tratamento de águas**. Florianópolis, 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MATSUMURA, Y. et al. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Appl Environ Microbiol**, v.69, p. 4278-4281, 2003.

MELO Jr., Maurício A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p.1872-1878, 2012.

MORONES, J. R. et al. The bacterial effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-2353, 2005.

MULFINGER, Lorraine et al. Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

OLIVEIRA, Marcela H. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**. Curitiba, 2005. 174 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PETICA, A. et al., Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. **Materials Science and Engineering: B**, v. 152, p. 22-27, 2008.

PINTO, Vera V. et al. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 364, p. 19-25, 2010.

PILLAI, Zeena S.; KAMAT, Prashant V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 3, p. 945–951, 2004.

RATYAKSHI, C.; CHAUHAN, R.P. Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 10, p. S113-116, 2009.

SANTOS, Douglas C. **Investigação de parâmetros de síntese e de potencialidades dos sistemas de nanopartículas de ouro empregando pluronic F127 e pluronic F127 tiolado como redutor/estabilizador**. Sergipe, 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Sergipe, 2015.

SANTANA, Maria H. A et al. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**, v. 9, p. 44-50, 2008.

SCHIERHOLZ, Jorg; BEUTH, Joseph; PULVERER, Gerhard. Silver-Containing Polymers. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 2819-2821, 1999.

SCHMID, Gunter et al. A Gold Cluster of Unusual Size. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 114, p. 3634-3642, 1981.

SILVA, Ana C. P. **Avaliação do efeito sinérgico dos compostos Protoporfirina IX e Azure A incorporados na forma mista em sistemas micelares nanoestruturados**. Apucarana, 2015. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2015.

SIMON, T; BOCA, S. C.; ASTILEAN, S. Pluronic – Nanogold hybrids: Synthesis and tagging with photosensitizing molecules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 77-83, 2012.

SONG, Ki C. et al. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 153-155, 2009.

TURKEVITCH, John; STEVENSON, Peter C.; HILLIER, James. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Royal Society of Chemistry**, v. 11, p. 55-75, 1951.

YIN, Hengbo et al. Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 83, p. 66-70, 2004.