

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS / CTM

JULIANA DA SILVA MOTA DIAS

ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Rio de Janeiro

2019

JULIANA DA SILVA MOTA DIAS

ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTICULAS DE PRATA

Trabalho de conclusão de curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Robson Roney Bernardo

Rio de Janeiro

2019

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

D541a Dias, Juliana da Silva Mota

Análise da estabilidade das nanopartículas de prata. / Juliana da
Silva Mota Dias. – Rio de Janeiro, 2019.

xii, 49 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Robson Roney Bernardo.

Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-
Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologia Industriais
Farmacêuticas, 2019.

Bibliografia: f. 47-49

1. Nanopartículas de Prata. 2. UV-Vis. 3. Estresse à Luz e Calor. I.
Título.

CDD 615.1

JULIANA DA SILVA MOTA DIAS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Roney Bernardo
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Xerém

Prof. M. Sc. Alessandra Catarina Chagas de Lima
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Xerém

Prof. M. Sc. Márcia Pietroluongo
Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela existência e por trazer momentos de felicidade, e por ter me fortalecido e confortado nos momentos de dificuldades, que posso dizer foram muitos.

A minha mãe Ana Lúcia da Silva Mota Dias, e toda minha família pelo seu amor, carinho, apoio e dedicação em todos os momentos do meu projeto.

Ao meu professor orientador, Robson Roney Bernardes, pelo tempo dedicado e pela ajuda prestada para a escolha do tema, por ter cedido o seu laboratório para a execução do Trabalho de Conclusão de Curso.

Ao meu Coorientador Luiz Augusto Sousa de Oliveira, por ter me aceitado.

A minha banca, Alessandra Catarina Chagas de Lima e Márcia Pietroluongo por ter todo carinho comigo na hora da minha apresentação.

A meus amigos da TIF e do trabalho, que me apoiaram diretamente para realização deste trabalho.

E finalizando com uma frase que meu querido Mestre Robson sempre falou: No final dá tudo certo!

RESUMO

A nanotecnologia é a ciência interessada no desenvolvimento e controle de nanomateriais, dentre os quais pode-se destacar as nanopartículas de prata e sua ação bactericida e anticancerígena. Este trabalho tem como objetivo estudar a estabilidade das nanopartículas de prata expostas a luz e calor. Sendo assim, as nanopartículas foram sintetizadas através da redução do nitrato de prata com borohidreto de sódio, com razão molar 1:2, respectivamente, em meio aquoso, resultando numa solução coloidal de coloração amarela. O borohidreto de sódio foi utilizado como agente redutor, além de conferir estabilidade às nanopartículas por meio de repulsões eletrostáticas. A estabilidade destas foi submetida a condições de estresse (luz e calor) e analisadas por espectrometria de absorção na região ultravioleta e visível (UV-Vis). As amostras recém-preparadas apresentaram uma banda larga na região entre 335 nm até 425 nm. Enquanto que as amostras submetidas à ausência e presença de luz apresentaram uma banda de absorção centrada em 390 nm, ao longo de 4 horas. Ao passo que, as amostras submetidas ao calor (95°C), a presença e ausência de luz, verificou-se a presença de bandas de absorção em 400 e 410 nm, respectivamente. O efeito batocrômico apresentado é reflexo da exposição das partículas às condições de estresse. As imagens obtidas por MEV mostram que as nanopartículas se apresentam como estruturas alongadas aglomeradas com larga distribuição de tamanho que variam de 100 a 500 nm.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, UV-Vis, estresse à luz e calor.

ABSTRACT

Nanotechnology is the science interested in the development and control of nanomaterials, in which silver nanoparticles can be highlighted by their bactericidal and anti-carcinogenic action. This work aims to study the stability of silver nanoparticles exposed to light and heat. Thus, the nanoparticles were synthesized by reducing the silver nitrate with sodium borohydride, with molar ratio 1: 2, respectively, in aqueous medium, resulting in a yellow colloidal solution. Sodium borohydride was used as a reducing agent, besides conferring stability to the nanoparticles by means of electrostatic repulsions. The stability of these were subjected to stress conditions (light and heat) and analyzed by ultraviolet and visible absorption spectrometry (UV-Vis). The newly prepared samples showed a broad band in the region between 335 nm and 425 nm. While the samples subjected to absence and presence of light presented an absorption band centered at 390 nm over 4 hours. While the samples subjected to heat (95 ° C), the presence and absence of light, the absorption bands were present at 400 and 410 nm, respectively. The bathochromic effect presented is a reflection of the exposure of the particles to stress conditions. SEM images show that the nanoparticles present as elongated agglomerated structures with a large size distribution ranging from 100 to 500 nm.

Keywords: silver nanoparticles, UV-Vis, stress to light and heat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Nanopartícula magnética de óxido de ferro utilizada na liberação de fármacos para o tratamento do câncer	14
Figura 2: Esquema da estabilização das nanopartículas de prata com o borohidreto.....	27
Figura 3: Aspecto visual da solução de nanopartículas de prata (A) à esquerda; Solução (B) à direita, na ausência e presença de luz, respectivamente.....	28
Figura 4: Espectro de absorção da solução de nanopartículas de prata recém preparadas e com 15 dias após o preparo.....	29
Figura 5: Espectro de absorção de nanopartículas de prata na ausência da luz de zero a 4 horas.....	31
Figura 6: Comparação das absorbâncias protegida da luz de zero a 4 horas.....	32
Figura 7: Gráfico comparativo (diferença x limites) – Tempos.....	34
Figura 8: Gráfico comparativo (diferença x limites) – Comprimentos.....	35
Figura 9: Espectro de absorção de nanopartículas de prata exposta à luz de zero a 4 horas.....	36
Figura 10: Comparação das absorbâncias expostas à luz de zero a 4 horas.....	37
Figura 11: Gráfico comparativo (diferença x limites) – Tempos.....	39
Figura 12: Gráfico comparativo (diferença x limites) – Comprimentos – Amostra total.....	41
Figura 13: Espectro de Absorção das nanopartículas de prata sem estresse, submetida ao estresse térmico (95 °C) e exposta a luz branca, submetida ao estresse térmico sem exposição da luz branca.....	42
Figura 14: Imagem das nanopartículas de prata obtidas por microscopia eletrônica de varredura (200 micrometros)	44
Figura 15: Imagem das nanopartículas de prata obtidas por microscopia eletrônica de varredura (100 micrometros)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados	22
Tabela 2: Materiais e Equipamentos	23
Tabela 3: Teste análise de variância fator duplo (Protegida da luz)	32
Tabela 4: Comparações entre os tempos para calcular a significância	33
Tabela 5: Teste análise de variância fator duplo (Protegida da luz) – Intervalo entre 380 e 420	34
Tabela 6: Comparações entre os comprimentos para calcular a significância	35
Tabela 7: Tamanho das nanopartículas de prata estimado pelo valor de meia altura	37
Tabela 8: Teste análise de variância fator duplo (Não protegida da luz)	38
Tabela 9: Comparações entre os tempos para calcular a significância	38
Tabela 10: Teste análise de variância fator duplo (Não protegida da luz) – Intervalo entre 380 e 420	39
Tabela 11: Comparações entre os comprimentos para calcular a significância	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag ⁺	Cátion metálico
AgNO ₃	Nitrato de prata
ANOVA	Análise Univariada de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BH ₄ ⁻	Íons de borohidreto
Bottomup	De baixo para cima
C ₆ H ₅ O ₇ ⁻	Íons citrato
d.m.s	Diferença Mínima Significativa
FISPQ	Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos
FWHH	Full Widthat Half Maximum
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAuCl ₄	Ácido tetracloroáurico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N	Número de amostras
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Citrato de sódio
nm	Nanômetros
O ₂	Superóxido
OH	Hidroxila
PAA	Ácido poliacrílico -Poli(1-caboxietileno)
PVA	Poli(álcool vinílico) - Poli(1-hidroxietano)
PVP	Poli(vinilpirrolidona) – Poli(N-vinil-2-pirrolidona)
q	Graus de liberdade
Q.M.R	Quadrados médios

Top down	De cima para baixo
UV-Vis	Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	NANOTECNOLOGIA	10
1.2	REGULAMENTAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA	11
1.3	NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	12
1.4	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	15
1.5	NANOPARTÍCULAS DE PRATA E AÇÃO ANTIMICROBIANA	16
1.6	APLICAÇÃO EM BIOMEDICINA	18
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	21
4	METODOLOGIA	22
4.1	IDENTIFICAÇÃO DA PRATA POR ESPECTROFOTOMETRIA	22
4.2	MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS	22
4.3	PREPARO DE SOLUÇÃO PARA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE PRATA	24
4.4	PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	24
4.4.1	Ensaio de estabilidade da solução de nanopartículas de prata sobre abrigo da luz e tempo	24
4.4.2	Estabilidade das nanopartículas de prata protegida da luz e submetidas há tempos amostrais de zero a 4 horas	24
4.4.3	Estabilidade das nanopartículas de prata sem proteção da luz e submetidas há tempos amostrais de zero a 4 horas	25
4.4.4	Estabilidade das nanopartículas de prata com e sem proteção da luz a uma temperatura de 95 °C durante 2 horas	25
4.5	ANÁLISES NO MICROSCÓPIO DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV)	25
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULA DE PRATA	27
5.1.1	Comparações entre os aspectos das soluções	28
5.2	ANÁLISE DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	29
5.2.1	Estabilidade da solução de nanopartículas de prata na ausência da luz em função do tempo	29
5.2.2	Estabilidade das nanopartículas de prata protegida da luz e submetidas em tempos amostrais de zero a 4 horas	30
5.2.3	Estabilidade das nanopartículas de prata expostas a luz em tempos amostrais de zero a 4 horas	36
5.2.4	Comparativo entre a estabilidade das nanopartículas de prata submetidas na presença e ausência de calor e luz branca	41
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR MICROSCÓPIO DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV)	43
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA

O setor de nanotecnologia demonstra progressos na manipulação de átomos e moléculas, responsável pela elaboração, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas que possuem propriedades físicas, químicas e biológicas distintas por apresentarem forma e tamanho na escala nanométrica (um nanômetro equivale a um bilionésimo do metro ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$)) (EBBESEN; JENSEN, 2006). Nesta nova tecnologia, os átomos e as moléculas são controlados individualmente, possibilitando a formação de minúsculas estruturas que são milhares de vezes menores do que a tecnologia atual, além de requerer a utilização de menor quantidade de matéria-prima possível (PEREIRA; BINSFIELD, 2012).

A comunidade científica demonstra cada vez mais interesse na nanociência, as dimensões são reduzidas a uma escala nanométrica, o que permite um controle de componentes estruturais de materiais e dispositivos em tamanhos bastante reduzidos. Existe outra questão relevante, que é o fator das escalas nano modificarem suas propriedades tanto físicas como químicas. Há inúmeras aplicações para as nanopartículas metálicas, desde a construção de sensores, a microeletrônica e até a ação bactericida (MELO JR *et al*, 2012).

Na Nanotecnologia é possível incorporar diversos tipos de moléculas na superfície de uma única nanopartícula, além de possibilitar a adição de novas propriedades aos nanomateriais. Em se tratando de nanomateriais, é possível, por exemplo, atuação em tecidos tumorais, realizado por meio da funcionalização de sua superfície com biomoléculas como proteínas, peptídeos, aptâmeros e anticorpos específicos, que tenham células ou tecidos como atrativo (CANCINO *et al*, 2014).

A nanotecnologia é uma das áreas de estudo com maior potencial na medicina, com o uso de nanomedicamento. O nanomedicamento é capaz de carrear o fármaco para a célula ou órgão alvo ou até mesmo permitir que o medicamento seja liberado controladamente no organismo sendo estas algumas das possibilidades dessa nova tecnologia. Como exemplo, é possível mencionar que a quimioterapia, no caso do câncer, sempre produz efeitos adversos para o paciente, pois é um procedimento que também atinge células saudáveis. Com a liberação controlada de fármacos, a tendência é que o fármaco atinja as células doentes e minimamente as saudáveis, ocasionando efeitos colaterais menores (PEREIRA; BENSFIELD, 2012).

Os investimentos em nanotecnologia têm aumentado exponencialmente no mundo inteiro, sendo que os Estados Unidos é o país que faz mais investimentos no setor, dando prioridade para a área de materiais, onde a Nanotecnologia demonstra um grande potencial (BORSCHIVER, 2009).

1.2. REGULAMENTAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA

Existe uma regulamentação sanitária no Brasil, definida pela Lei nº 9.782/1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que tem por suas atribuições fiscalizar a produção e comercialização de diversos produtos, dentre eles podemos destacar cosméticos, agrotóxicos e medicamentos entre outros. Teoricamente deveria existir uma regulamentação específica para nanomedicamentos. Na realidade, o maior desafio atual para os nanomedicamentos no Brasil é elaborar uma regulamentação eficaz para o registro e o gerenciamento de possíveis riscos que acarretem danos à saúde da população (PEREIRA; BENSFIELD, 2012), já que o nanomaterial pode apresentar diferentes características biológicas, químicas e físicas quando comparado ao macro material (OLIVEIRA *et al*, 2015).

Além disso, as variações no tamanho e forma podem ter efeitos imprevisíveis sobre as propriedades físicas e químicas dos nanomateriais. Ou seja, partículas maiores (~100 nm) podem se desintegrar em partículas menores (~1 nm), ou partículas menores poderiam se agregar em partículas maiores. Considerando que as nanopartículas podem comportar-se de modo muito diferente em um organismo se comparado aos estudos pré-clínicos em cultura de células, é fundamental que sejam realizados estudos de longo prazo para monitorar seus efeitos (PEREIRA; BENFIELD, 2012).

Tanto o Ministério da Saúde, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), possui responsabilidades políticas e técnicas no intuito de promover a elaboração de estudos e avaliações que aprimorem as normas e permitam uma regulamentação mais sintonizada com a realidade encontrada no país em relação ao uso de medicamentos e produtos nano estruturados (PEREIRA; BENFIELD, 2012).

1.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Nanopartículas metálicas são nanoestruturas com propriedades físicas, químicas e biológicas dependentes de sua composição, tamanho e forma.

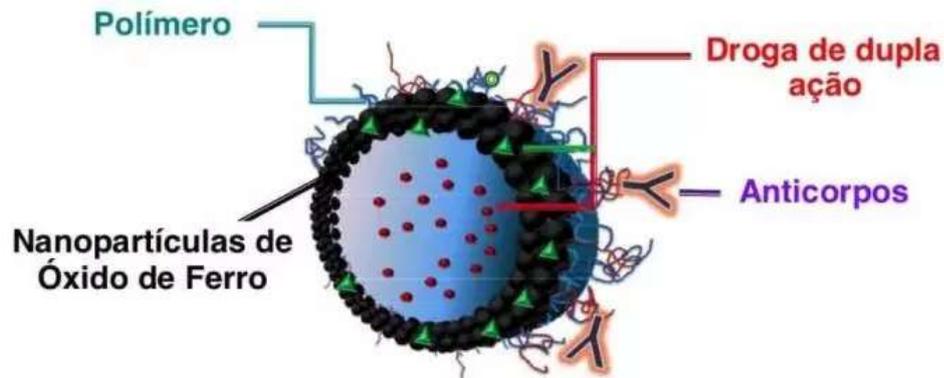
Existem duas rotas de preparação das nanopartículas metálicas: “*top-down*” (de cima para baixo) e “*bottom-up*” (de baixo para cima). No método físico “*top-down*” as partículas macroscópicas são reduzidas para a escala nano a partir de diferentes processos, tais como moagem, têmpera, fotolitografia, decomposição térmica, irradiação e difusão, entre outras. Esta rota não é adequada para preparar partículas uniformes e, partículas muito pequenas são difíceis de serem observadas. O método químico “*bottom-up*” envolve átomos ou espécies moleculares que se agregam, em reações químicas, para formar partículas de tamanho definido quando submetidos em condições experimentais adequadas. Este procedimento é mais adequado para gerar partículas uniformes de tamanho, forma e estrutura distintos (KLABUNDE, 2001) (CARVALHO, 2013).

As nanopartículas metálicas podem ser utilizadas para a entrega e liberação de drogas, insumos agropecuários e cosméticos; desenvolvimento de superfícies funcionais (embalagens ativas para proteção de alimentos); elaboração de sensores para diagnóstico de doenças, infecções e contaminações; desenvolvimento de sistemas de transferência de genes; produção de pontos quânticos (fontes alternativas para imagem por fluorescência); controle de pragas/patógenos; produção de nanopartículas super paramagnética; desenvolvimento de catalisadores; desenvolvimento de sistemas de biorremediação; produção de tecidos com propriedades ímpares (SILVA, 2017).

Dentre as nanopartículas metálicas, destacam-se aquelas com propriedades magneto-hipertermia (fenômeno correspondente ao aumento de temperatura corpórea local devido à presença de nanopartículas) no tratamento para o câncer. Neste caso, as nanopartículas magnéticas são direcionadas para a região lesionada através de um campo magnético que induz a morte das células em virtude do aumento de temperatura (POLLETO, 2008).

Pesquisas realizadas pelo professor San-Yuan Chen, as quais foram publicadas em 8 de outubro de 2013 pela Formosa TV English News, mostram que nanopartículas com óxido de ferro que podem ser utilizadas para carrear fármacos para tratar tumores cancerígenos (Figura 1). Neste caso, uma solução contendo estas nanopartículas é injetada no paciente e um campo magnético atrai a medicação para área lesionada. Desta forma, é possível injetar uma dose mínima de quimioterápicos para a região adequada ao invés de espalhar o tratamento pelo corpo evitando efeitos colaterais (queda de cabelos e náuseas) para o paciente, já que o tratamento tradicional atinge as partes saudáveis e as afetadas pelo tumor (KARAM, 2013).

Figura 1: Nanopartícula magnética de óxido de ferro utilizada na liberação de fármacos para o tratamento do câncer.



Fonte:(KARAM,2013)<https://www.showmetech.com.br/especial-taiwan-nanotecnologia-no-combate-ao-cancer/>

O experimento de síntese de nanopartículas metálicas apresenta como uma das dificuldades mais marcantes para sua realização a estabilização e obtenção de suspensões coloidais estáveis, pois as nanopartículas metálicas são de alta energia superficial, favorecendo a termodinâmica, gerando como consequência imediata a agregação destas. A agregação e a estabilidade das nanopartículas em solução são determinadas pela soma das forças atrativas e repulsivas entre as nanopartículas. A força de atração entre as nanopartículas é devida à força de van der Waals, responsável pela interação entre as forças dipolo-dipolo de átomos ou moléculas neutras. Enquanto que a força eletrostática repulsiva é devido à interação da dupla camada elétrica ao redor de cada nanopartícula, também denominada por lei de Coulomb. O critério geral para preparar solução coloidal estável é aumentar as forças repulsivas entre as nanopartículas (JIANG *et al*, 2009).

Para que esta agregação não ocorra, depende-se da preparação de sistemas coloidais com estabilizadores. Os estabilizadores poliméricos, como por exemplo, poli(N-vinil-2-pirrolidona) ou poli(vinilpirrolidona) - (PVP), poli(1-hidroxietano) ou poli(álcool vinílico) - (PVA) e poli(1-carboxietileno) ou ácido poliacrílico (PAA), são mencionados na literatura como sendo os mais eficazes, pois possui a capacidade de formar uma camada auto organizada sobre a superfície das nanopartículas, tendo esta, o papel de impedir a coalescência com a adsorção dos estabilizadores na superfície (MELO JR.*et al*, 2012).

A linha de pesquisa voltada para o desenvolvimento de nanopartículas apresenta como foco a maneira como estas penetram na membrana das células, avaliando a facilidade delas comparadas às outras moléculas ou ainda aos fármacos. Os pesquisadores buscam uma maior interação entre nanomateriais e sistemas biológicos, assim como suas limitações e mecanismos associados em curto, médio e longo prazo. Entender os mecanismos de entrada e saída das células, tal como compreender a estabilidade das nanopartículas e as propriedades de superfície, será crucial para obter a segurança e um melhor aproveitamento de suas funções (CANCINO *et al*, 2014).

1.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese de nanopartículas em solução realizada pela adição dos seguintes reagentes: metal precursor, agente redutor e agente estabilizante (GARCÍA-BARRASA *et al*, 2011)

O mecanismo de formação da solução coloidal da redução dos íons prata consiste em dois estágios: nucleação e crescimento. O passo de nucleação requer alta energia de ativação enquanto que o passo de crescimento requer baixa energia de ativação. O tamanho e a forma das nanopartículas dependem da velocidade relativa destes dois processos que podem ser controlados por meio de ajuste de parâmetros de reação (concentração, temperatura, pH, capacidade de redução) (GARCÍA-BARRASA *et al*, 2011).

No caso de nanopartículas de prata, os primeiros métodos foram preparados de acordo com o procedimento de Lee-Meisel e Creighton. O primeiro método consiste na modificação de Turkevich para a síntese de nanopartículas de ouro utilizando AgNO_3 ao invés de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) como precursor metálico e citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) como agente redutor. Neste método as nanopartículas apresentam uma larga distribuição de tamanho. (GARCÍA-BARRASA *et al*, 2011). O método descrito por Creighton consiste na redução do AgNO_3 com NaBH_4 . Este método é o mais versátil, obtendo partículas com diâmetro de até 10 nm e com estreita distribuição de tamanho. Nestes métodos, os íons citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^-$) e borohidreto têm como função estabilizar as nanopartículas e reduzir o cátion metálico (Ag^+), além de controlar o tamanho e a

forma das nanopartículas, respectivamente (SOLOMON *et al*, 2007; HARISH *et al*, 2018).

Conforme mencionado anteriormente, a agregação das nanopartículas de prata em solução pode ser evitada ao utilizar agentes de estabilização. O mecanismo de formação das nanopartículas metálicas é similar ao mecanismo de redução do sal de prata na presença de um agente redutor. A presença destes ligantes no meio reacional previne a agregação das partículas em solução e, ao mesmo tempo, alcança o controle preciso sobre o tamanho, forma e monodispersidade das partículas por explorar diferentes condições reacionais (GARCÍA-BARRASA *et al*, 2011).

Diversos métodos de redução química para sintetizar nanopartículas de prata a partir de sais de prata, os quais dão origem a nanopartículas com diâmetro entre de 3,5 a 175 nm estão descritos na literatura (GARCÍA-BARRASA *et al*, 2011) (SYAFI UDDIN *et al*, 2017).

1.5 NANOPARTICULAS DE PRATA E AÇÃO ANTIMICROBIANA

O efeito antimicrobiano das nanopartículas de prata é de grande interesse da ciência, visto que os pesquisadores guardam grande apreensão devida principalmente ao fato da crescente resistência microbiana, tais como bactérias Gram-positivas e negativas, fungos, vírus (NETO *et al*, 2008).

Entre os metais nobres, a prata atrai maior atenção por causa de sua capacidade de desinfecção, apresenta eficácia como agente anticancerígeno e seus sais são recomendados como agente antimicrobiano. Desde que aplicada em concentrações baixas, este elemento é recomendável para a saúde humana, sendo ativa contra bactérias e vírus (MOLLICK *et al*, 2015).

Dados da literatura mostram que o nitrato de prata foi utilizado para uma variedade de doenças, incluindo epilepsia, infecções venéreas, úlceras de acne e nas pernas, na qual sua função era desconhecida. Posteriormente, os sais de prata tornaram-se atrativos como antibacterianos devido à sua eficácia comprovada contra a infecção de feridas e sua toxicidade relativamente baixa. Dentre os sais de prata, de prata é possível mencionar o composto sulfadiazina de prata que controla a liberação de íons de prata para feridas da pele para o tratamento de queimaduras. Cremes e hidrocolóides contendo sulfadiazina de prata são utilizados para combater infecções provocadas por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Microrganismos mostram uma baixa propensão para desenvolver resistência aos compostos de prata, que por sua vez, atuam como antibiótico de amplo espectro (LANDSDOWN *et al*, 2002).

A prata em escala macroscópica não é prejudicial ao ser humano, exceto em casos de exposição em grandes quantidades. Partículas inaladas podem ser bioacumuladas no cérebro, e quando absorvidas pela pele podem causar lesões a estruturas celulares fundamentais, como as mitocôndrias (ALMEIDA *et al*, 2015). Apesar da ampla utilização das nanopartículas em curativos para feridas, cateteres e peças para vestuário devido sua atividade microbiana e facilidade de penetração nas células, existe carência de estudos sobre sua toxicidade (ASHARANI *et al*, 2009). Entretanto, estudos comprovam que a citotoxicidade das nanopartículas de prata está relacionada com o envolvimento do nível de espécies reativas de oxigênio celular e ruptura da membrana mitocondrial (MOLLICK *et al*, 2015).

É durante o transporte de elétrons pela cadeia respiratória da membrana mitocondrial interna que alguns destes elétrons escapam da cadeia e são aceitos pelo oxigênio molecular para formar o ânion radical Superóxido (O_2^-) extremamente reativo, o qual pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e que por sua vez pode ser completamente reduzido à água (H_2O) ou parcialmente reduzido à radical hidroxila (HO^-). Estas espécies reativas de oxigênio podem oxidar a superfície das nanopartículas de prata e liberar o cátion Ag^+ (Eq.1), que por sua vez, pode amplificar a toxicidade (ASHARANI *et al*, 2009).



Experimentos realizados com membranas de diálise, as quais permitem a passagem dos íons Ag^+ , mas não das nanopartículas de prata, mostram que a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata está relacionada com a liberação de íons Ag^+ (FERNANDES *et al*, 2014). Os íons prata (Ag^+) são conhecidos por reagirem com resíduos de aminoácidos nucleofílicos em proteínas, e por interagirem com os grupos tiol, amino, imidazol, fosfato e carboxila das membranas das proteínas e das enzimas, ocasionando a desnaturação destas proteínas (PERCIVAL *et al*, 2005). Neste caso, a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata é proveniente das interações eletrostáticas entre as cargas positivas das nanopartículas e as cargas negativas dos grupos funcionais supracitados presentes no biofilme bacteriano. Atividade antimicrobiana também é observada mediante a utilização de nanopartículas de prata carregada negativamente com *E. Coli*, mas nesse caso deve haver outro tipo de interação entre com os elementos de construção da membrana da bactéria que causa mudanças estruturais, degradações que ocasionam morte celular (SONDI; SALOPEK, 2004).

1.6 APLICAÇÃO EM BIOMEDICINA

A biomedicina recebeu durante o século XX novas abordagens, como a nanotecnologia farmacêutica que atualmente ganha importância no setor. A possibilidade de transposição para a escala industrial deve-se também a outra característica relevante, que é permitir uma liberação controlada dos fármacos dentro do organismo (CANCINO *et al*, 2014).

A maioria dos fármacos utilizados nos tratamentos convencionais após administrados percorrem todo o organismo através da corrente sanguínea, de modo que fármaco pode causar efeitos colaterais já que este atinge as regiões doentes e sadias do organismo. Este efeito pode ser contornado com os medicamentos nanotecnológicos, que são materiais nanoestruturados contendo o fármaco que é liberado controladamente para o sítio-alvo. Dentre os materiais nanoestruturados voltados para a biomedicina temos: lipossomas, dendrímeros e micelas poliméricas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, entre outros (POLETTO *et al*, 2008). Desta forma, a nanobiotecnologia ou nanomedicina, definida pela nanotecnologia aplicada às ciências da vida, pode ser utilizada de forma a contribuir bastante para a melhoria da qualidade de vida e saúde da humanidade (POLETTO *et al*, 2008).

Como a aplicação em biomedicina, ainda é algo recente necessita-se ainda de mais comprovação e estudos, bem como do efeito de longo prazo dos nanomedicamentos no organismo humano e também em relação ao impacto ao meio ambiente (POLETTO *et al*, 2008).

Portanto, neste trabalho optou por utilizar partículas metálicas, em especial a de prata, como sistema nanoestruturado devido a sua atividade antimicrobiana que pode potencializar a ação do fármaco em futuras pesquisas.

2 JUSTIFICATIVA

Dados da literatura mostram que as nanopartículas de prata apresentam as seguintes vantagens: simplicidade na síntese, propriedades antimicrobianas, biocompatibilidade com sistemas biológicos, carreadores de fármacos e facilmente caracterizadas por UV-Vis. Sendo assim, as nanopartículas de prata serão em futuro breve, um potencial adjuvante no tratamento de diversas doenças com o uso de medicamentos acoplados a elas. Portanto, o estudo de estabilidade destas nanopartículas, bem como o seu tempo de meia vida é de vital importância para posterior utilização em nanomedicamentos.

3 OBJETIVOS

- Sintetizar nanopartículas de prata utilizando borohidreto de sódio como estabilizante de superfície.
- Caracterizar as nanopartículas por UV-Vis (Ressonância de plasmon de superfície) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Estudar a estabilidade das nanopartículas de prata quando estas são submetidas a condições de estresse, tal como presença e ausência de luz e calor.
- Observar as diferenças significativas em termos de significância das amostras estressadas e não estressadas.

4 METODOLOGIA

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA PRATA POR ESPECTROFOTOMETRIA

Para a identificação da prata foi feita uma varredura por espectrofotômetro na região compreendida entre 320 e 440 nm (SOLOMON *et al*, 2007). Onde se anotou o comprimento de onda de máxima absorção.

4.2 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Antes do início dos experimentos, toda a vidraria utilizada foi lavada com água Purificada. Qualquer impureza presente no meio pode servir como impureza e promover a aglomeração das nanopartículas em solução, tornando-se necessário um maior cuidado com a limpeza de todos os materiais utilizados.

Todos os reagentes foram utilizados dentro do prazo de validade e os equipamentos com as calibrações e manutenções em dia de acordo com as tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Reagentes utilizados

Nome do reagente	Data de validade	Lote	Fabricante
Nitrato de Prata	25/04/2020	STB 5752	SIGMA
Borohidreto de Sódio	06/03/2020	MKCF 8449	SIGMA

Tabela 2: Materiais e Equipamentos

Descrição	Fabricante
Balança Analítica Adventurer Ohaus	OhausCorp. USA
Agitador magnético com aquecimento	IKA
Espectrofotômetro Thermo 60S	Thermo scientific
Pipeta pasteur	Cralplast
Bureta de 25mL	Boro Brasil
Erlenmeyer de 250mL	Boro Brasil
Béquer de 100mL	Boro Brasil
Tubo de PVC com rosca	CORNING
Tubo de vidro com rosca de teflon	PYREX
Erlenmeyer de 1000 mL	Boro Brasil
Estufa	Memmert
Geladeira	PANASONIC
Microscópio eletrônico de varredura	TESCAN VEJA 3 LMU
Termômetro	Testo 104
Sistema de água osmose reversa	Gehaka

4.3 PREPARO DE SOLUÇÃO PARA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE PRATA

Em um erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 75 mL de uma solução $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (0,0056 g) de borohidreto de sódio. O frasco foi então colocado em um banho de gelo por aproximadamente 10 a 15 minutos, sendo posteriormente colocado na placa de agitação. Com o auxílio de uma bureta, foi adicionado, gota a gota 25 mL de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (0,0042 g) de nitrato de prata em torno de 4 min. (MELO JR. *et al*, 2012). As soluções onde foram submetidas a estresse tiveram o mesmo procedimento supracitado.

4.4 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

4.4.1 Ensaio de estabilidade da solução de nanopartículas de prata sobre abrigo da luz e tempo

Foi obtida uma varredura das nanopartículas de prata (100 mL), protegida da luz, na faixa de 190 a 1100 nm no espectrofotômetro UV/VIS, priorizando-se as absorvâncias de 320 a 440 nm.

Na seqüência a solução contendo as nanopartículas foi colocada em um agitador mecânico por 9h. Após este período de agitação, a solução foi mantida em repouso e ao final de 15 dias, foi obtida a varredura nas mesmas condições supracitadas.

4.4.2 Estabilidade das nanopartículas de prata protegida da luz e submetidas há tempos amostrais de zero a 4 horas

A solução de nanopartículas de prata (100 mL) protegida da luz foi mantida sob agitação magnética em um béquer com banho de gelo. Em seguida foram retiradas 5 alíquotas (3 mL) desta solução em tempos diferentes (0h, 1h, 2h, 3h, 4h) para a realização da varredura no espectrofotômetro UV/VIS em uma faixa 190 a 1100 nm, priorizando-se as absorvâncias de 320 a 440 nm.

4.4.3 Estabilidade das nanopartículas de prata sem proteção da luz e submetidas há tempos amostrais de zero a 4 horas

A solução de nanopartículas de prata (100 mL) sem proteção da luz foi mantida sob agitação magnética em um béquer com banho de gelo. Em seguida foram retiradas 5 alíquotas (3 mL) desta solução em tempos diferentes (0h, 1h, 2h, 3h, 4h) para a realização da varredura no espectrofotômetro UV/VIS em uma faixa 190 a 1100 nm, priorizando-se as absorbâncias de 320 a 440 nm.

4.4.4 Estabilidade das nanopartículas de prata com e sem proteção da luz a uma temperatura de 95 °C durante 2 horas

Foi preparada uma solução de nanopartícula de prata de (100 mL) e fracionada em três tubos de ensaio com tampa de teflon de rosca, sendo que dois tubos (A e B) foram submetidos a um estresse em uma temperatura de 95 C° durante duas horas, onde um dos frascos estava protegido da luz e o outro não, e o terceiro tubo (C) foi protegido da luz e não foi submetido a estresse. Posteriormente após duas horas, os três tubos foram submetidos à varredura de UV/VIS em 190 a 1100 nm, observando-se a absorção em 320 a 440nm especificamente, tendo seus resultados comparados.

4.5 ANÁLISES NO MICROSCÓPIO DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV)

Foi preparada uma solução de nanopartículas de prata (100 mL) protegida da luz, da qual se retirou uma alíquota de (10 mL) que foi transferida para um frasco de PVC com rosca.

Esta solução foi submetida ao congelamento e posteriormente a liofilização durante um período de 48 horas.

O sólido obtido foi transferido para a fita de carbono sobre o stab de alumínio (estrutura que sustenta a amostra no MEV). Posteriormente, a amostra foi colocada na estufa a 100 °C por um período de 2 horas. Após este período, amostra foi submetida à identificação no microscópio de transição eletrônica TESCAN VEJA 3 LMU, onde foi utilizado o modo de varredura obtendo-se informações por elétrons secundários e retroespalhados.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o software prisma pelo ANOVA no método de Tukey para as análises estatísticas de estabilidade. Onde os resultados foram tabelados e comparados por absorbâncias e tempos amostrais diferentes, calculando-se a diferença significativa das absorbâncias obtidas especificamente no comprimento de onda de 320 a 440 nm.

Análise univariada de variância (ANOVA) é definida por ser uma técnica estatística, baseada em uma medida dependente, onde múltiplas amostras são oriundas com médias iguais (HAIR. JR *et al*,2005).

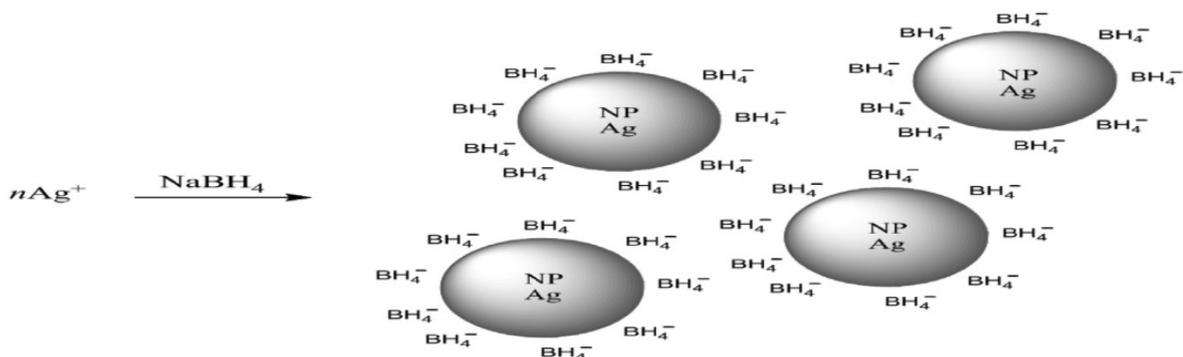
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram sintetizadas nanopartículas de prata com intuito de estudar sua estabilidade, através da análise por espectrofotometria UV/Vis e determinar o diâmetro das partículas por microscopia eletrônica MEV.

5.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULA DE PRATA

As nanopartículas foram preparadas com a relação molar 2:1 de borohidreto de sódio e o nitrato de prata, respectivamente. De acordo com os dados obtidos por Melo Jr (2012), é adequado utilizar excesso de borohidreto de sódio, em relação ao nitrato de prata, uma vez que esse reagente atua simultaneamente como agente redutor dos íons prata e também é responsável pela estabilização das nanopartículas que se formam. Os íons borohidreto (BH_4^-), em excesso, aderem na superfície das nanopartículas de prata, dando origem a forças eletrostáticas repulsivas capazes de estabilizá-las em solução, ou seja, evitando a agregação das nanopartículas (Figura 2).

Figura 2: Esquema da estabilização das nanopartículas de prata com o borohidreto.



Fonte: Adaptado de Melo Jr *et al*, (2012)

Durante a síntese, foi utilizado banho de gelo, pois o borohidreto é um forte agente redutor que em contato com a água, gera uma reação exotérmica que pode levar a sua própria degradação, conforme Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ - Sigma - Aldrich). Além disso, convém mencionar que Solomon (2007) verificou que as utilizações de baixas temperaturas durante a síntese inibem o crescimento das nanopartículas de prata.

Após a síntese, foram obtidos espectros da solução de nanopartículas na região UV/VIS.

5.1.1 Comparações entre os aspectos das soluções

Foram sintetizadas nanopartículas de prata, com o intuito de comparar possíveis alterações na coloração da solução coloidal, foram preparadas duas soluções como descritas no item 4.3 e aplicado um tratamento diferente a cada amostra, de modo que a solução A foi mantida na ausência da luz e a solução B na presença da luz (estressada).

De acordo com a Figura 3 observou-se visualmente uma diferença em relação à coloração da solução A e a solução B.

Figura 3: Aspecto visual da solução de nanopartículas de prata (A) à esquerda; Solução (B) à direita, na ausência e presença de luz, respectivamente.



Fonte: Autor

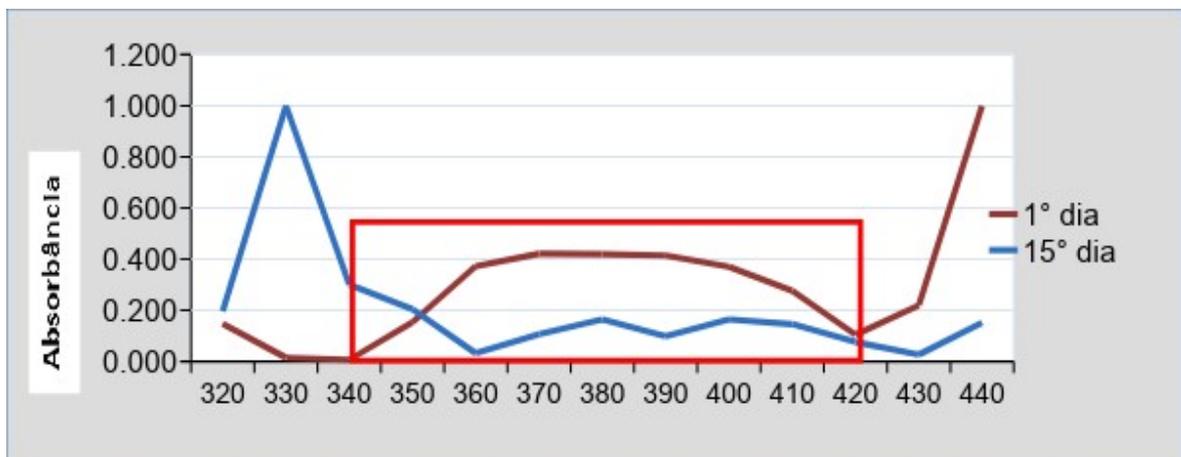
A cor amarela da solução A é característica de nanopartículas de prata em solução coloidal, que é o resultado da absorção da radiação eletromagnética na interação com os plasmons de superfície, segundo Almeida (2015). Enquanto que a coloração grafite da solução B é característica de que as nanopartículas foram oxidadas em virtude da exposição à luz. Portanto visivelmente temos uma diferença entre as soluções, mesmo tendo sido preparadas da mesma forma.

5.2 ANÁLISE DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

5.2.1 Estabilidade da solução de nanopartículas de prata na ausência da luz em função do tempo

Foram obtidos espectros de absorção das nanopartículas recém-preparadas e ao longo de 15 dias, com a finalidade de observar sua estabilidade, de modo que as soluções foram protegidas da luz.

Figura 4: Espectro de absorção da solução de nanopartículas de prata recém-preparadas e com 15 dias após o preparo.



Absorbância; Comprimento de onda

De acordo com a figura 4, observa-se a presença de uma banda larga na região entre 335 até 425 nm para a amostra recém-preparada, supondo a presença de uma mistura de nanopartículas de diferentes tamanhos. Enquanto que a amostra com 15 dias de preparo, supõe-se a presença de duas espécies com tamanhos diferentes com bandas de absorção centradas em 385 nm e 405 nm, respectivamente.

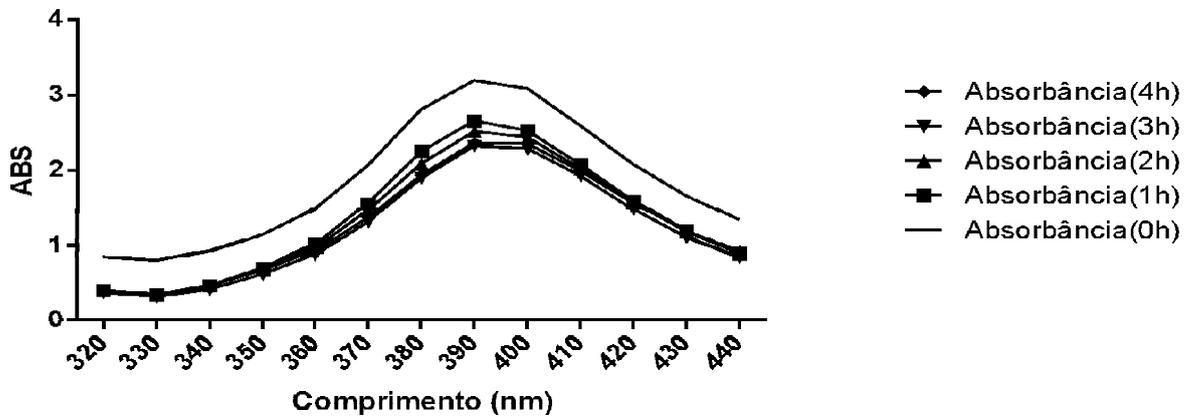
Dados da literatura obtidos por Solomon (2007) e Melo Jr.(2012) mostram que o tamanho das nanopartículas de prata é diretamente proporcional ao comprimento de onda de sua banda de absorção. Para Couto, Ramos e Cavalheiro (1998) a definição de lei de Lambert-Beer é a correlação através da absorvância de uma solução e a porção da espécie absorvente em um determinado comprimento de onda. Por esta definição conclui-se que quanto maior a absorvância maior o número de espécies de nanopartículas que absorvem luz.

Deste modo, observa-se que ao longo de 15 dias ocorre uma diminuição da concentração das nanopartículas que absorvem luz levando a formação de duas populações diferentes.

5.2.2 Estabilidade das nanopartículas de prata protegida da luz e submetidas em tempos amostrais de zero a 4 horas

Neste item, foram coletados espectros de absorção na região UV/Vis das amostras protegidas da luz, mantidas no gelo e sob agitação, nos seguintes intervalos de tempo: 0h, 1h, 2h, 3h, 4h.

Figura 5: Espectro de absorção de nanopartículas de prata na ausência da luz de zero a 4 horas.



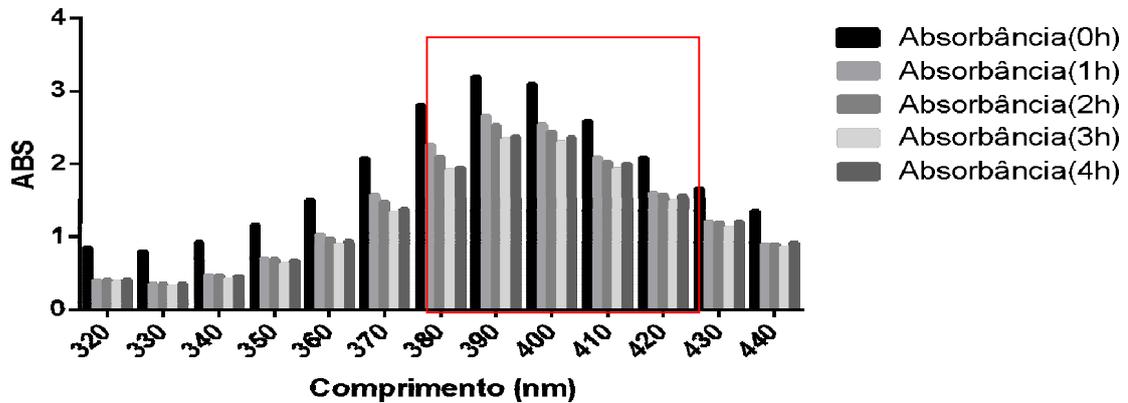
Absorbância; Comprimento (nm)

Analisando a Figura 5, observa-se a presença de uma banda larga centrada em 390 nm, para todas as amostras, que é característica de nanopartículas de prata com tamanho de partícula de 10 a 14 nm, conforme dados obtidos por Solomon (2007).

No trabalho de Sá, Bolzan e Machado (2014) o parâmetro de largura de meia altura (FWHM – *FullWidthatHalfMaximum*) que pode fornecer informações do grau de dispersão das nanopartículas de prata, que é a medida da largura da banda onde a absorção é equivalente à metade da absorção máxima indicando o grau de dispersão do tamanho de nanopartículas, ou seja, quanto menor a FWHM, mais estreito é o pico de absorção e conseqüentemente mais estreita é a distribuição de tamanho das partículas, obtendo-se nanopartículas mais uniformes.

Deste modo, percebe-se que para a amostra com 0 h, a largura da banda é maior quando comparada com os demais tempos; onde a largura da banda torna-se mais estreita. Isto se deve a menor distribuição do tamanho de partículas que se formam no decorrer do tempo, conforme largura de meia altura supracitada.

Figura 6: Comparação das absorvâncias protegida da luz de zero a 4 horas.



De acordo com a figura 6, observa-se, visualmente uma diferença entre os valores de intensidade de absorvância dos espectros coletados nos seguintes intervalos de tempo: 0h, 1h, 2h, 3h e 4h, para as amostras protegidas da luz.

A partir destes espectros, foi feita uma comparação estatística dos valores da intensidade de absorvância da figura 5 para cada tempo analisado.

Foi utilizado o Teste deTukey pelo método de Análise de Variância do Fator duplo para calcular a significância entre os tempos e o F crítico das amostras (Tabela 3).

Tabela 3: Teste análise de variância fator duplo (Protegida da luz)

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F calculado	F Tabelado	P- Valor
Absorbância	4	1,84833	0,46208	109,14	3,0069	2,13E-08
Comprimento	4	2,88675	0,72169	170,46	3,0069	6,73E-10
Resíduo	16	0,06774	0,00423			
Total	24					

Fonte de variação; Graus de liberdade; Soma dos quadrados; Quadrados médios; F calculado; F crítico; P-valor.

Para calcular a diferença mínima entre os tempos de comprimento de onda foi utilizada a seguinte equação:

$$d.m.s = q \sqrt{\frac{QMR}{r}}$$

d.m.s = Diferença mínima significativa

q = Graus de liberdade

Q.M.R = Quadrados Médios

n = Número de amostras

Onde,

$$d.m.s = 4,05 \sqrt{\frac{0,00423}{5}}$$

d.m.s= 0,117799

Tabela 4: Comparações entre os tempos para calcular a significância

Comparação	Diferença	Lim. Inferior	Lim. Superior	P - valor
1 x 0	- 0,5236	- 0,6497	- 0,3975	0,00E+00
2 x 0	- 0,6052	- 0,7313	- 0,4791	0,00E+00
3 x 0	- 0,7628	- 0,8889	- 0,6367	0,00E+00
4 x 0	- 0,7018	- 0,8279	- 0,5757	0,00E+00
2 x 1	- 0,0816	- 0,2077	0,0445	3,17E-01
3 x 1	- 0,2392	- 0,3653	- 0,1131	2,23E-04
4 x 1	- 0,1782	- 0,3043	- 0,0521	4,05E-03
3 x 2	- 0,1576	- 0,2837	- 0,0315	1,11E-02
4 x 2	- 0,0966	- 0,2227	0,0295	1,81E-01
4 x 3	0,0610	- 0,0651	0,1871	5,87E-01

Comparação; Diferença; Limite inferior; limite superior; P-valor.

Conforme tabela 4, é possível observar o resultado da soma das médias (diferença entre o limite superior e inferior) das absorbâncias lidas em todos os comprimentos de onda, gerando assim o valor da diferença absoluta. Este por sua vez, foi comparado ao valor da diferença mínima significativa (d.m.s), cujo valor foi calculado a partir dos dados da tabela 3. Esta diferença tem que ser menor ou igual a 0,117799, para ter um nível de significância aceitável.

Sendo assim o cálculo da subtração de: (1h x 0h), (2h x 0h), (3h x 0h), (4h x 0h), (1h x 3h), (1h x 4h), (2h x 3h), tiveram diferença significativa absoluta, pois ($|-0,5236|$, $|-0,6052|$, $|-0,7628|$, $|-0,7018|$, $|-0,2392|$, $|-0,1782|$, $|-0,1576|$) $> 0,117799 = d.m.s.$), o valor da diferença absoluta entre cada tempo foi maior que a d.m.s, já entre (2h x 1h), (4h x 2h) e (4h x 3h), não tiveram diferenças significativas, pois ($|-0,0816|$, $|-0,0966|$ e $0,0610 < 0,117799$), são menores que a d.m.s.; conforme dados apresentados na figura 7.

Figura 7: Gráfico comparativo (diferença x limites) – Tempos

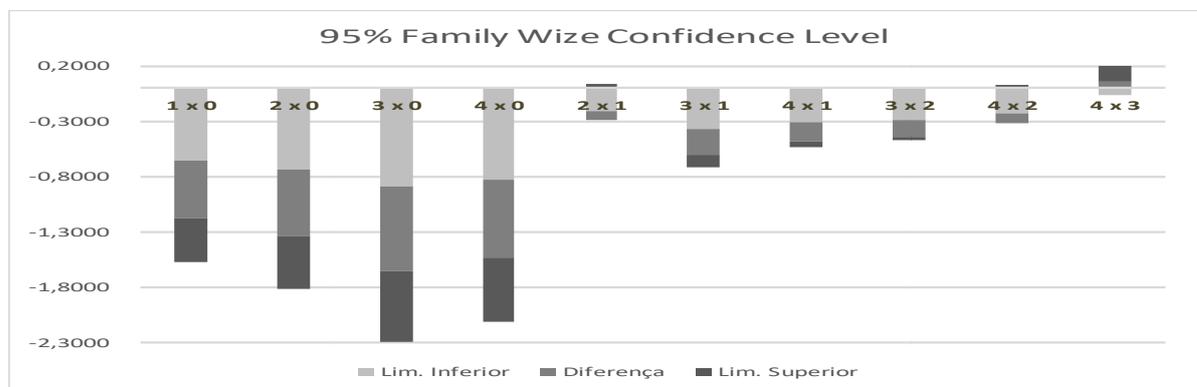


Tabela 5: Teste análise de variância fator duplo (Protegida da luz) – Intervalo entre 380 e 420

Fonte de Variação	de	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F calculado	F Crítico	P- Valor
Absorbância		4	2,89819	0,72455	178,06438	3,00692	4,79024E-13
Comprimento		4	1,85883	0,46471	114,20615	3,00692	1,50085E-11
Resíduo		16	0,06510	0,00407			
Total		24	4,82212				

Fonte de variação; Graus de liberdade; Soma dos quadrados; Quadrados médios; F calculado; F crítico; P-valor.

Onde,

$$d.m.s = q \sqrt{\frac{QMR}{r}}$$

$$d.m.s = 3,73 \sqrt{\frac{0,00406}{5}}$$

$$d.m.s. = 0,106407$$

Tabela 6: Comparações entre os comprimentos para calcular a significância

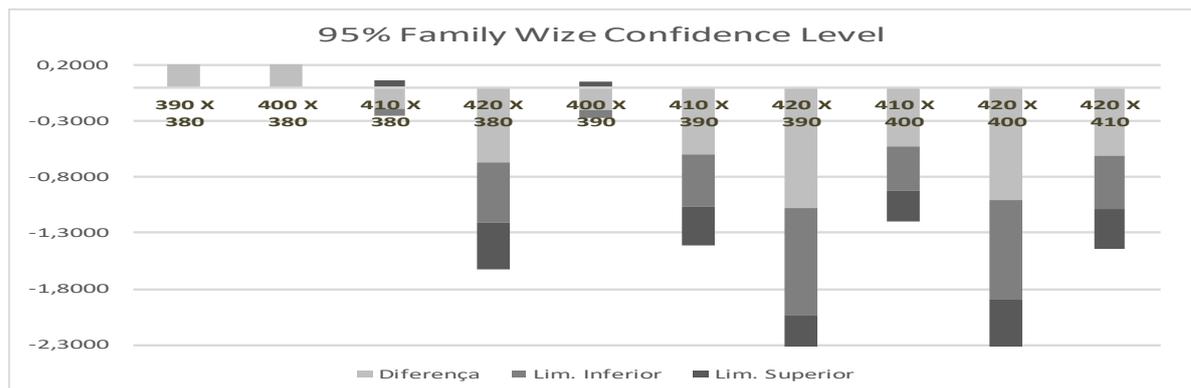
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	P - valor
390 X 380	0,4114	0,2853	0,5375	2,00E-07
400 X 380	0,3398	0,2137	0,4659	3,20E-06
410 X 380	-0,0610	-0,1871	0,0651	5,87E-01
420 X 380	-0,5416	-0,6677	-0,4155	0,00E+00
400 X 390	-0,0716	-0,1977	0,0545	4,39E-01
410 X 390	-0,4724	-0,5985	-0,3463	0,00E+00
420 X 390	-0,9530	-1,0791	-0,8269	0,00E+00
410 X 400	-0,4008	-0,5269	-0,2747	4,00E-07
420 X 400	-0,8814	-1,0075	-0,7553	0,00E+00
420 X 410	-0,4806	-0,6067	-0,3545	0,00E+00

Comparação; Diferença; Limite inferior; limite superior; P-valor.

Conforme tabela 5, é possível observar o resultado da soma das médias (diferença entre o limite superior e inferior) das absorvâncias lidas no intervalo compreendido entre 380 e 420 nm de comprimento de onda, gerando assim o valor da diferença absoluta. Este por sua vez, foi comparado ao valor da diferença mínima significativa (d.m.s), cujo valor foi calculado a partir dos dados da tabela 6. Esta diferença tem que ser menor ou igual a 0,106407 para que tenha um nível de significância aceitável.

Nota-se que apenas os comprimentos 410 x 380 e 400 x 390 não apresentam diferença significativa, dado que a d.m.s. encontrada para os dados selecionados desta amostra (destaque na Tabela 6) resulta em 0,106407, conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8: Gráfico comparativo (diferença x limites) – Comprimentos.

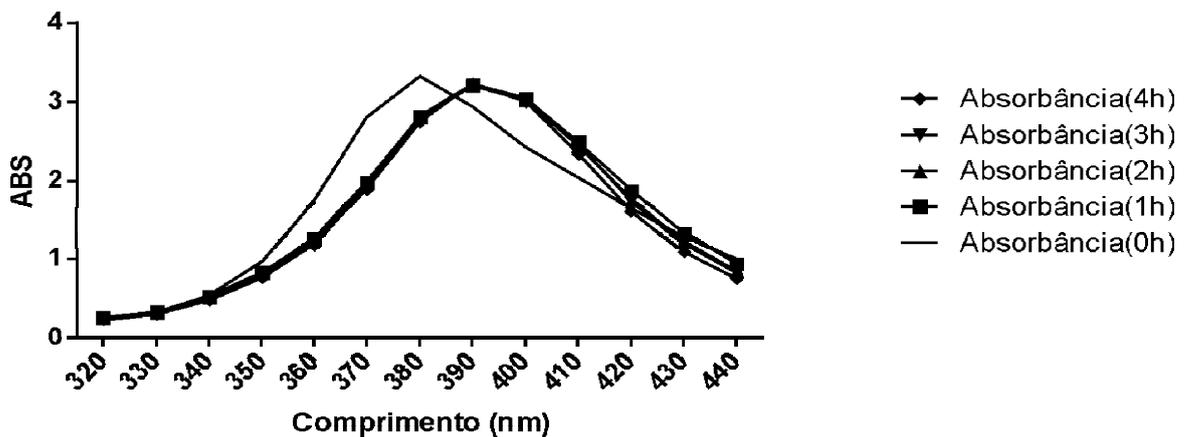


5.2.3 Estabilidade das nanopartículas de prata expostas a luz em tempos amostrais de zero a 4 horas

Neste item, foram coletados espectros de absorção na região UV/Vis das amostras expostas a luz, mantidas no gelo e sob agitação, nos seguintes intervalos de tempo: 0h, 1h, 2h, 3h, 4h.

Analisando a Figura 9, observa-se o pico máximo de absorção em 380 nm no tempo 0 h, e para os demais tempos observa-se deslocamento do pico de absorção para comprimento de onda maior (390 nm).

Figura 9: Espectro de absorção de nanopartículas de prata exposta à luz de zero a 4 horas.



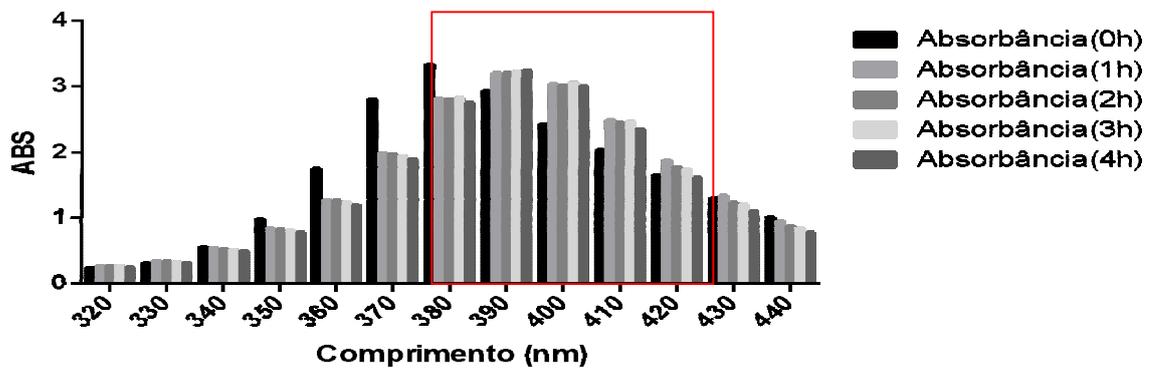
Dados obtidos por Solomon (2007) e Melo Jr. (2012), (Tabela 7) mostram que o aumento no tamanho da nanopartícula de prata resulta em deslocamento batocrômico. Grillet (2013) observou que a luz incidente sobre as nanopartículas de prata pode alterar sua estrutura e resposta óptica através de superaquecimento e da mudança química da superfície ou do núcleo das nanopartículas. Ainda neste trabalho, nanopartículas de prata submetidas à luz UV do espectrofotômetro foram fotooxidadas e resultaram na formação de uma camada de óxido de prata ao redor do núcleo das nanopartículas. Convém mencionar, que o aumento do tempo de exposição das nanopartículas à luz UV resulta na diminuição do núcleo das nanopartículas com conseqüente aumento da camada de óxido de prata ao redor do núcleo.

Tabela 7: Tamanho das nanopartículas de prata estimado pelo valor de meia altura

Cor da solução	Diâmetro estimado pela largura de meia altura/nm	Comprimento de onda máximo/nm	Diâmetro estimado por TEM/nm
Amarela	62 ± 5	396 ± 5	20 ± 5
Laranja	71 ± 8	401 ± 4	30 ± 13
Violeta	93 ± 6	404 ± 2	----
Cinza	111 ± 3	423 ± 8	----

Fonte: Mello Jr *et al*, (2012).

Figura 10: Comparação das absorvâncias expostas à luz de zero a 4 horas.



De acordo com a figura 10, observa-se, visualmente uma diferença entre os valores de intensidade de absorvância dos espectros coletados nos seguintes intervalos de tempo: 0h, 1h, 2h, 3h e 4h, para as amostras expostas a luz.

Com base nesses espectros, foi feita uma comparação estatística dos valores da intensidade de absorvância da figura 10 para cada tempo analisado. Foi utilizado o Teste de Tukey pelo método de Análise de Variância do Fator duplo para calcular a significância entre os tempos e calcular o F crítico das amostras.

Tabela 8: Teste análise de variância fator duplo (Não protegida da luz)

Fonte de Variação	de Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F calculado	F Crítico	P- Valor
Absorbância	4	0,13880	0,03471	0,8757	3,0069	0,500047
Comprimento	4	6,62900	1,65725	41,8086	3,0069	2,81E ⁻¹⁰
Resíduo	16	0,6342	0,03964			
Total	24					

Fonte de variação; Graus de liberdade; Soma dos quadrados; Quadrados médios; F calculado; F crítico; P-valor.

O cálculo usado para achar a diferença mínima entre os tempos e comprimentos de onda foi:

$$d.m.s = q \sqrt{\frac{QME}{r}}$$

$$d.m.s = 4,33 \sqrt{\frac{0,03964}{5}}$$

$$d.m.s = 0,3858$$

Tabela 9: Comparações entre os tempos para calcular a significância

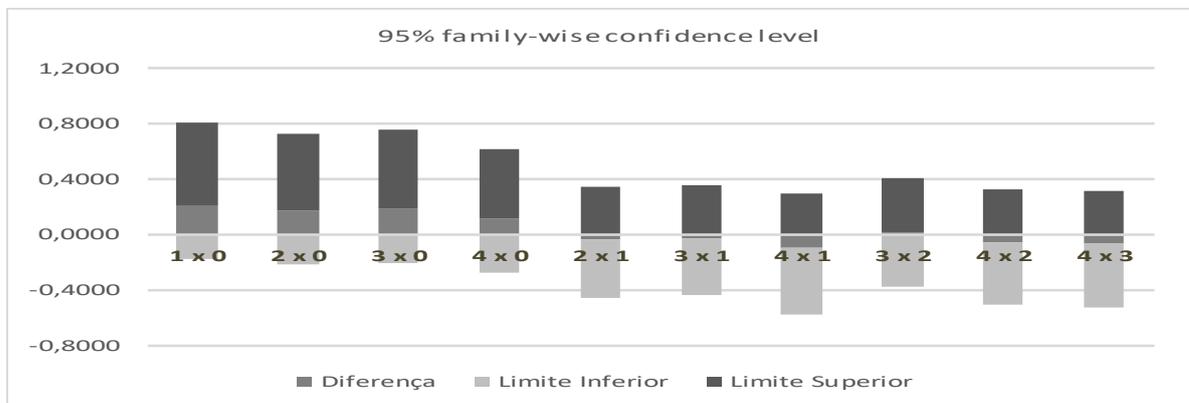
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	P - valor
1 x 0	0,2088	-0,1770	0,5946	0,48463
2 x 0	0,1718	-0,2140	0,5576	0,65738
3 x 0	0,1830	-0,2028	0,5688	0,60463
4 x 0	0,1140	-0,2718	0,4998	0,89071
2 x 1	-0,0370	-0,4228	0,3488	0,99819
3 x 1	-0,0258	-0,4116	0,3600	0,99956
4 x 1	-0,0948	-0,4806	0,2910	0,94033
3 x 2	0,0112	-0,3746	0,3970	0,99998
4 x 2	-0,0578	-0,4436	0,3280	0,98997
4 x 3	-0,0690	-0,4548	0,3168	0,98063

Comparação; Diferença; Limite inferior; limite superior; P-valor.

Conforme a tabela 8 é possível observar o resultado da soma das médias (diferença entre o limite superior e inferior) das absorbâncias lidas em todos os comprimentos de onda para as amostras protegidas da luz, gerando assim o valor da diferença absoluta. O valor da diferença absoluta (tabela 9) tem que ser menor que valor da diferença mínima significativa (d.m.s), ou seja, menor que 0,3858 para ser aceito no nível de significância, tem que ser menor que (0, 3858).

Sendo assim o cálculo da subtração de todas as amostras dos tempos, mostra que o valor da diferença absoluta entre cada tempo foi menor que a d.m.s., conforme dados apresentados na figura 11.

Figura 11: Gráfico comparativo (diferença x limites) – Tempos.



Para verificarmos a significância desta amostra de comprimentos, devemos calcular a d.m.s conforme demonstrado abaixo:

Tabela 10: Teste análise de variância fator duplo (Não protegida da luz) – Intervalo entre 380 e 420

Fonte de Variação	de Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F calculado	F Crítico	P- Valor
Absorbância	4	0,02430	0,00608	1,67862	3,00692	0,20394
Comprimento	4	6,32953	1,58238	437,15658	3,00692	4,0782E-16
Resíduo	16	0,05792	0,00362			
Total	24	6,41175				

Fonte de variação; Graus de liberdade; Soma dos quadrados; Quadrados médios; F calculado; F crítico; P-valor.

Onde,

$$d.m.s = q \sqrt{\frac{QMR}{r}}$$

$$d.m.s = 4,15 \sqrt{\frac{0,00362}{5}}$$

$$d.m.s. = 0,111661$$

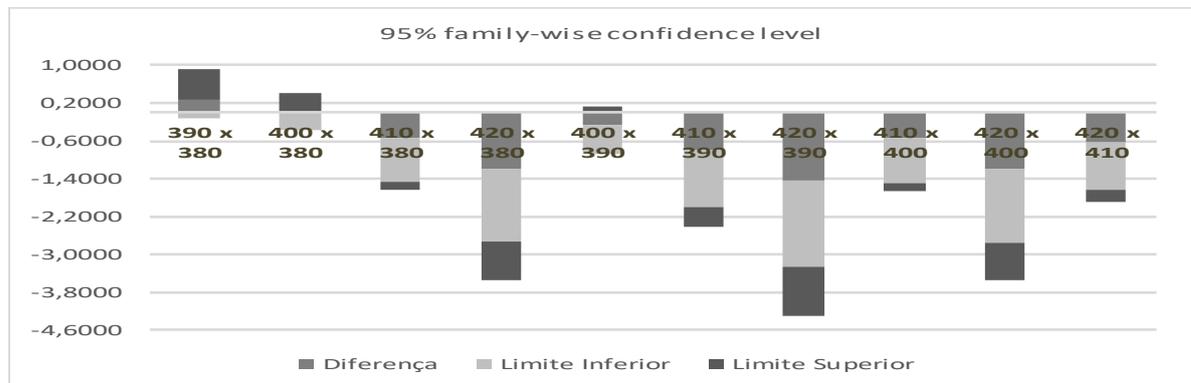
Tabela 11: Comparações entre os comprimentos para calcular a significância

Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	P - valor
390 x 380	0,2586	-0,1272	0,6444	0,28627
400 x 380	0,0056	-0,3802	0,3914	1,00000
410 x 380	-0,5474	-0,9332	-0,1616	0,00392
420 x 380	-1,1772	-1,5630	-0,7914	0,00000
400 x 390	-0,2530	-0,6388	0,1328	0,30549
410 x 390	-0,8060	-1,1918	-0,4202	0,00008
420 x 390	-1,4358	-1,8216	-1,0500	0,00000
410 x 400	-0,5530	-0,9388	-0,1672	0,00358
420 x 400	-1,1828	-1,5686	-0,7970	0,00000
420 x 410	-0,6298	-1,0156	-0,2440	0,00107

Comparação; Diferença; Limite inferior; limite superior; P-valor.

Sendo assim, como apresentado na tabela 11, o cálculo da diferença entre os comprimentos de onda no intervalo de 380 a 420 nm para as amostras não protegidas da luz com as seguintes comparações: (410 x 380), (420 x 380), (410 x 390), (420 x 390), (410 x 400), (420 x 400), (420 x 410), (390 x 380), e (400 x 390) não tiveram diferença significativa absoluta, pois (|-0,5474|, |-1,1772|, |-0,8060|, |-1,4358|, |-0,5530|, |-1,1828| e |-0,6298| , |0,2586| e |-0,2530| são todos > 0,11166, ou seja o valor da diferença absoluta entre cada tempo foi maior que a d.m.s. Somente a diferença da média (400 x 380) apresentou valor inferior a d.m.s., ou seja |0,0056| é menor do que 0,111661. Portanto, nota-se que apenas a comparação entre os comprimentos 400 x 380 não apresentou diferença significativa, conforme apresentado na Figura 12.

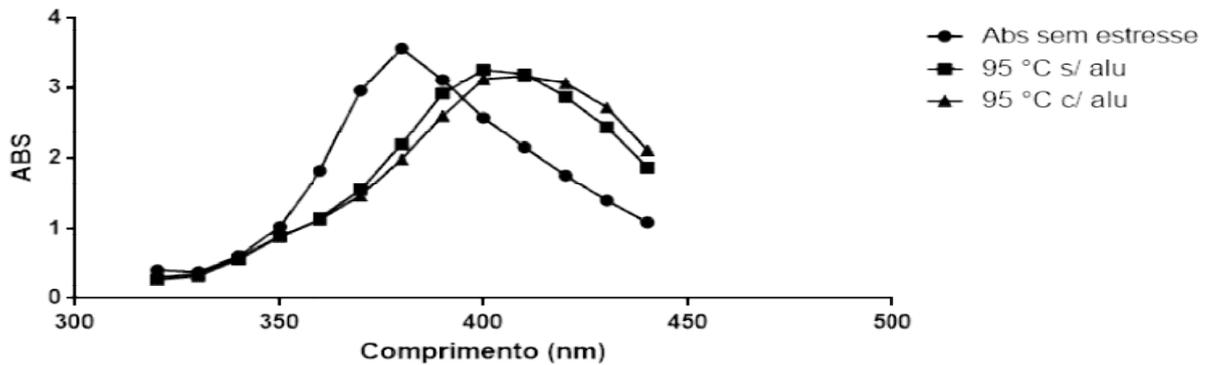
Figura 12: Gráfico comparativo (diferença x limites) – Comprimentos – Amostra total



5.2.4 Comparativo entre a estabilidade das nanopartículas de prata submetidas na presença e ausência de calor e luz branca

Neste item, a solução de nanopartículas de prata foi adicionada em 3 tubos de ensaios, os quais foram submetidos a diferentes tratamentos. A solução do primeiro tubo foi protegida da luz e sem tratamento térmico. A solução do segundo tubo foi submetida à luz e ao tratamento térmico, ao passo que o terceiro tubo foi submetido ao tratamento térmico e protegido da luz.

Figura 13: Espectro de Absorção das nanopartículas de prata sem estresse, submetida ao estresse térmico (95 °C) e exposta a luz branca, submetida ao estresse térmico sem exposição da luz branca.



De acordo com a Figura 13, é possível observar o pico máximo de absorção em 380 nm para a amostra sem tratamento. Quando a amostra é submetida ao tratamento térmico e protegido da luz, a absorção da amostra desloca-se para comprimentos de onda maiores com pico máximo centrado em 410 nm. Considerando que o tamanho das nanopartículas é diretamente proporcional ao seu comprimento de onda de absorção, é possível afirmar que o aumento de energia térmica (energia cinética) no sistema foi suficiente para superar a repulsão eletrostática entre as nanopartículas favorecendo a sua coalescência e posterior agregação, conforme menciona Pancioni (2015). Desta forma, conclui-se que o coalescimento das nanopartículas é responsável pelo efeito batocrômico observado pelas nanopartículas após exposição ao calor.

Resultados semelhantes foram obtidos por Schneid (2015), ao estudar a estabilidade térmica de filmes de nanopartículas de prata até 200 °C. A amostra submetida ao tratamento térmico e desprotegida da luz apresenta pico máximo de absorção em 400 nm. Conforme mencionado no Item 6.2.3.; Grillet (2013) ao estudar a foto-oxidação das nanopartículas de prata, verificou a formação de óxido de prata ao redor do núcleo de prata metálica ocasionando o aumento do tamanho da nanopartícula. Este efeito juntamente com o tratamento térmico leva ao deslocamento do pico de absorção para comprimento de onda maior.

Entretanto, convém mencionar que a amostra protegida da luz apresenta comprimento de onda maior devido à retenção do calor por estar envolta por papel alumínio.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR MICROSCÓPIO DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV)

O MEV é um instrumento que nos fornece rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Ele costuma ser muito utilizada em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia. Sendo o MEV um dos aparelhos mais versáteis disponíveis para observação e análise das características micro estruturais de objetos sólidos. Mais uma importante característica do MEV é a imagem tridimensional da aparência das amostras, resposta direta da grande complexidade de campo. Proporciona, assim como, o estudo em pequenas melhorias e com uma grande profundidade de foco, o que se torna muito útil, assim sendo a imagem eletrônica completa o dado fornecido pela imagem óptica (DEDAVID *et al*, 2007).

De acordo com a Figura 14, observou pequenas regiões de coloração mais clara (circuladas) que caracterizam a presença de nanopartículas de prata. A região mais escura ao redor das nanopartículas de prata refere-se ao nitrato de prata e borohidreto de sódio residual bem como outros interferentes. Quando a amostra foi ampliada (Figura 15), observa-se que as nanopartículas apresentam estruturas alongadas aglomeradas (circuladas), com tamanhos não homogêneos que variam entre 100 a 500 nm. Esta larga distribuição de tamanho de partículas é coerente com o diâmetro estimado de meia largura como descritos por Melo Jr. (2012), os quais mostram que as nanopartículas recém preparadas (coloração amarela) analisadas por MEV possuem diâmetro estimado em 20 ± 5 nm. Para se ter certeza dos tamanhos obtidos teria que recorrer a outras técnicas dentre elas a DLS.

O ensaio foi realizado na sala de microscopia eletrônica pelo responsável técnico Bruno, no Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa em Biologia (Numpex) UFRJ-Xerém.

Figura 14: Imagem das nanopartículas de prata obtidas por microscopia eletrônica de varredura (200 micrometros)

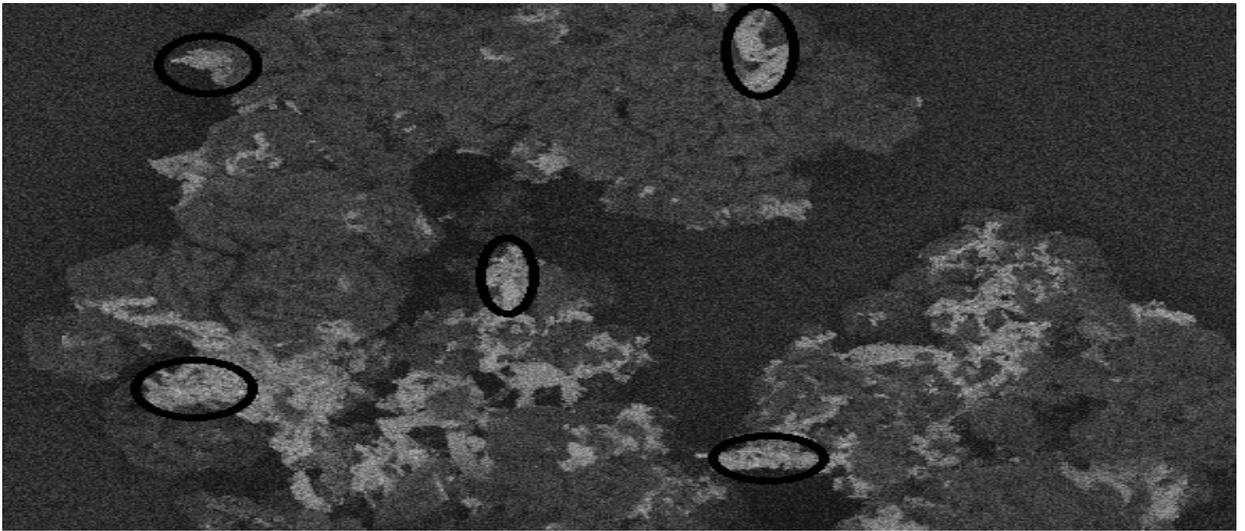
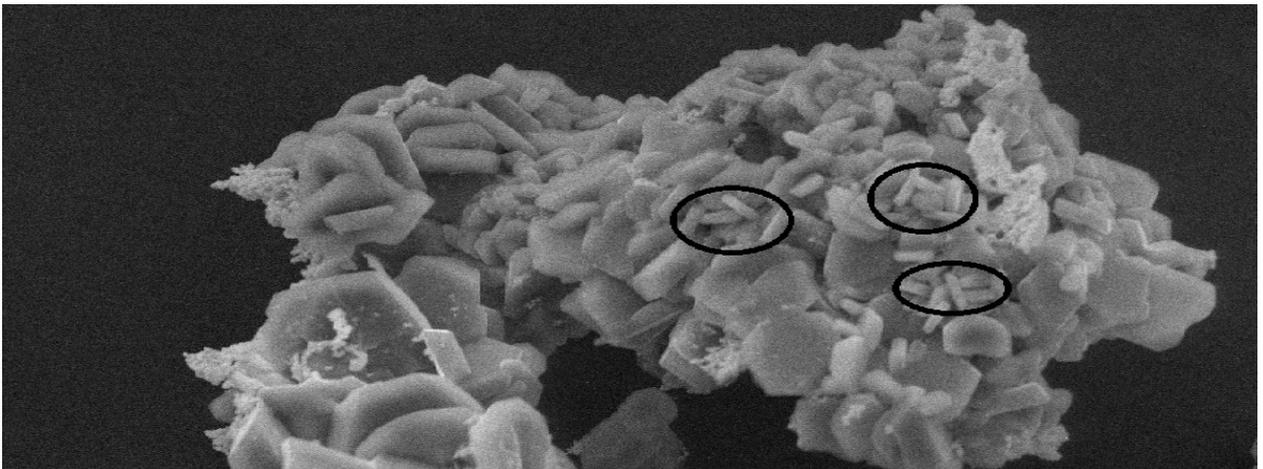


Figura 15: Imagem das nanopartículas de prata obtidas por microscopia eletrônica de varredura (100 micrometros)



6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, as nanopartículas de prata foram obtidas através da redução do nitrato de prata com borohidreto de sódio. Estas nanopartículas foram caracterizadas por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível e microscopia eletrônica de varredura. As amostras recém preparadas e protegidas da luz apresentaram comprimento de onda de 380nm, porém quando estas amostras foram submetidas a exposição da lâmpada de luz branca houve deslocamento batocrômico para 390 nm. Por outro lado, quando novas amostras foram submetidas ao calor verificou-se uma diminuição da intensidade de absorção para amostras protegida e desprotegida da luz. Quando as nanopartículas de prata foram expostas ao calor, na presença e ausência de luz, observou-se banda de absorção centrada em 400 nm e 410 nm, respectivamente.

Dados estatísticos utilizando a ferramenta ANOVA a partir do método Tukey possibilitaram a comparação estatística entre dois parâmetros amostrais: absorvância e tempo de exposição ao estresse, ou seja, através deste método analisamos os dados quantitativos obtidos e classificamos os dados obtidos como sendo confiáveis ou não, confiáveis se o valor da diferença for menor do que 5%, sendo assim consideramos confiáveis estes dados com um nível de confiança de 95%. E não confiáveis se o valor da diferença for maior que 5%, conclui-se então que quando as amostras são submetidas ao calor, bem como a luz há alteração em suas estruturas, ou seja, ocorre aumento do tamanho da nanopartícula resultando em comprimento de onda maiores (400 e 410 nm, sem e com alumínio, respectivamente). Tanto o fator calor quanto o fator luz alteram as nanopartículas a níveis maiores do que quando não submetidas a nenhum desses fatores.

As imagens das nanopartículas caracterizadas por MEV mostram a presença de estruturas alongadas aglomeradas com diâmetro estimado de 20 nm. De modo geral, conclui-se que o fator temperatura e luz alteram as características estruturais das nanopartículas de prata, ocasionando aumento do tamanho das nanopartículas.

É de suma importância estudar a estabilidade das nanopartículas de prata para controlar seu tamanho, tendo por finalidade utilizá-las como carreadores de fármacos e assim, contribuir para o avanço no estudo de novas tecnologias farmacêuticas industriais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. C. B.; PALÁCIO, S. M.; FERREIRA, L. K.; DEON, M. T. M.; CAMPOS, E. A.; KERBER, K. C. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata. **ENEMP**, São Carlos-SP, 2015.

ANVISA. LEI Nº 9.782, DE 26 DE JANEIRO DE **1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>. Acesso 19 de jun. de 2019.

ASHARANI P. V.; MUN, G. L. K.; , HANDE M. P.; , VALIYAVEETIL S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**. 2009 Feb 24;3(2):279-90.

BORSCHIVER et al. Patenteamento em nanotecnologia. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, nº 4, p. 245-248, 2005.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 3, 2014.

CARVALHO, C. N. **Caracterização de nanopartículas de prata coloidais dispersas em solos**. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2013.

COUTO, A.B; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E.T.G. Aplicação de Pigmentos de Flores no Ensino de Química. **Química Nova**, 21(2). 1998.

DEDAVID, B. A. Microscopia Eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico] / Berenice Anina Dedavid, Carmem Isse Gomes, Giovanna Machado. – Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2007.

EBBESEN, M.; JENSEN, T. G. Nanomedicine: Techniques, Potentials, and Ethical Implications. Hindawi Publishing Corporation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Volume 2006, Pages 1–11, 2006.

FERNANDES, P. E. **Síntese e Caracterização e Ação Antimicrobiana de Nanopartículas de Prata**. 2014. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

GARCÍA-BARRASA, J.; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, J. M., MONGE, M. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. **Cent. Eur. J. Chem**. 9(1), 7-19, 2011.

GRILLET, N.; MANCHON, D.; COTTANCIN, E.; BERTORELLE, F.; BONNET, C.; BROYER, M.; LERMÉ, J.; PELLARIN, M. Photo-Oxidation of Individual Silver Nanoparticles: A Real-Time Tracking of Optical and Morphological Changes. **Phys. Chem. C**, 117, 2274–2282. 2013.

HAIR, Jr., J. F. Análise Multivariada de Dados. Porto Alegre. **Bookman**, 2005.

K, H. K.; VENKATESH, N.; BHOWNIK, H.; ANUTTAM, K. Metallic Nanoparticle: **A Review. Biomed J Sci&Tech Res** 4(2), 2018.

JIANG, J.; OBERDORSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **J. Nanopart Res.** 11:77–89. (2009)

KARAM, H. **Especial Taiwan: nanotecnologia no combate ao câncer.** Disponível em: <https://www.showmetech.com.br/especial-taiwan-nanotecnologia-no-combate-ao-cancer/> Acesso 31 de jan. de 2019.

KLABUNDE, K. J. **Nanoscale Materials in Chemistry.** New York. John Wiley & Sons, Inc., 2001.

LANSDOWN, A. B. G. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. **Journal of Wound Care**, 11(4), 125–130. 2002

MELO JR, M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de Nanopartículas de Prata e Ouro: Um método Simples para a Introdução de Nanociência em Laboratório de Ensino. **Quim.Nova**, Vol. 35, No. 9, 1872-1878, 2012.

MOLLICK, M. R.; RANA, D.; DASH, S. K. Studies on green synthesized silver nanoparticles using *Abelmoschus esculentus* (L.) pulp extract having anticancer (in vitro) and antimicrobial applications. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

NETO, E. A.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens Novembro. **Comunicado Técnico 99.** São Carlos-SP, 2008.

PACIONI, N. L.; BORSARELLI, C. D.; REY, V.; VEGLIA, A. **Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles.** A Mechanistic Perspective. Silver Nanoparticle Applications. pp 13-46. Chapter First Online: 21 February, 2015.

OLIVEIRA, L.P.S.; MARINHO, M. E.; FUMAGALI, E. O. Nanomedicamentos e os Desafios da Anvisa: Diante da Inexistência de um Marco Regulatório no Brasil. **Arel Faar, Ariquemes**, RO, v. 3, n. 3, p. 36-51, set. 2015.

PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of hospital infection.** 60, p. 1-7. (2005).

PEREIRA, I. O.; BINSFELD, P. C. **Nanomedicamentos: O cenário de Regulamentação no Brasil**. Instituto de Estudos Farmacêuticos e Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GO. 2012.

POLETTO, F. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Uma Pequena Grande Revolução. **Ciência Hoje**. Vol. 43, nº 255, dezembro de 2008.

SÁ, E. M. F; BOLZAN A.; MACHADO, R. A. F. Estudo de Nucleação e Crescimento de Nanopartículas de Prata Obtidas por Redução Química. **Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química**, 2014.

SCHNEID, A. C.; PEREIRA, M. B.; HOROWITZ, F.; MAULER, R. S.; MATTE, C. R.; KLEIN, M. P.; HERTZ, P. F.; COSTA, T. M. H.; MENEZES, E. W.; BEVENUTTI, E. V. Silver Nanoparticle Thin Films Deposited On Glass Surface Using an ionic Silsesquioxane as Stabilizer and as Crosslinking Agent. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 26, No. 5, 1004-1012, 2015.

SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; PEREIRA, F.; SILVA, L. D.; ALBERNAZ, V. L.; POLEZ, V. L. P. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas. **Biotecnologia Aplicada a Agro & Indústria**, Vol. 4, p. 967 -1011, 2017.

SOLOMON, S. D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A. V.; RUTKOWSKY, S. A.; BORITZ, C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. Department of Chemistry, Drexel University, Philadelphia, **Journal of Chemical Education**, Vol. 84 No. 2 February, 2007.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, 275(1), 177–182, 2014.

SYAFIYUDDIN, A.; SALIM, M. R.; KUEH, A. B. H.; HADIBARATA, T.; NUR, H. Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. **J. Chin. Chem. Soc.** 2017, 64, 732–756, 2017.