



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Mecânica

JOSIAS ROGÉRIO LOPES

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
(*NPsAg*) EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE FIBROÍNA
DE SEDA E GELATINA**

CAMPINAS

2017

JOSIAS ROGÉRIO LOPES

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (*NPsAg*) EM
SOLUÇÕES AQUOSAS DE FIBROÍNA DE SEDA E GELATINA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica, na Área de Materiais e Processos de Fabricação.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila

Coorientador: Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez

ESSE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO JOSIAS ROGÉRIO LOPES E ORIENTADO PELO PROF. DR. MARCOS AKIRA d'ÁVILA

Marcos Akira d'Ávila

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

L881s Lopes, Josias Rogério, 1971-
 Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) em soluções aquosas de
 fibroína de seda e gelatina / Josias Rogério Lopes. – Campinas, SP : [s.n.],
 2017.

 Orientador: Marcos Akira D'Ávila.
 Coorientador: Diego Stéfani Teodoro Martinez.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
 de Engenharia Mecânica.

 1. Fibroína. 2. Gelatina. 3. Nanopartículas de prata. I. D'Ávila, Marcos
 Akira, 1972-. II. Martinez, Diego Stéfani Teodoro. III. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) in silk fibroin and gelatin aqueous solutions

Palavras-chave em inglês:

Fibroin

Gelatin

Silver nanoparticles

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora:

Marcos Akira D'Ávila [Orientador]

Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Fabrcio de Souza Delite

Data de defesa: 30-01-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA DE MATERIAIS E PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (*NPsAg*) EM SOLUÇÕES
AQUOSAS DE FIBROÍNA DE SEDA E GELATINA**

Autor: Josias Rogério Lopes

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila

Coorientador: Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila
Universidade Estadual de Campinas – FEM/DEMM

Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Universidade Estadual de Campinas – FEM/DEMM

Prof. Dr. Fabrício de Souza Delite
Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais – CNPEM/LNNano

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Campinas, 30 de Janeiro de 2017.

Dedico Essa Dissertação...

À minha Mãe Maria pelo amor, coragem e apoio em todos os momentos da minha vida.

À minha querida esposa Léris pelo amor e paciência nos momentos em que estive longe.

Às minhas filhas Maria Eduarda e Ana Júlia, obrigado por fazerem parte da minha vida e encher de alegria os meus dias. Vocês chegarão mais longe na vida que o papai. Se eu pudesse ter a dádiva de escolher outra forma de ser, seria uma de vocês.

KIDA (SAUDAÇÃO entre os praticantes de KRAV MAGA; significa todo o respeito e gratidão adquiridos até aquele momento).

***Ancora che lo ingenio umano in inventioni varie
rispondendo com vari strumenti a um medesimo fine,
mai esso troverá inventione piú bella né piú facile né piú
breve della natura, perché nelle sue inventioni nulla
manca e nulla è supérfluo.***

Leonardo da Vinci (Estudos Anatômicos, fólho 114 v)

Apesar de a engenhosidade humana em várias invenções usar diferentes instrumentos para o mesmo fim, ela nunca encontrará uma invenção mais bonita, mais fácil ou mais econômica do que a da natureza, pois em suas invenções nada falta, nada é supérfluo.

***Un avvenimento è qualcosa
che irrompe dall'esterno
È qualcosa di imprevisto
È questo il metodo supremo
della conoscenza.
È un irruzione del nuovo
che rompe gli ingranaggi,
che mette in moto un processo.***

Um evento é algo
que quebra a partir do exterior
É algo inesperado
Este é o método supremo
do conhecimento.
É uma irrupção do novo
que quebra as engrenagens,
que coloca em movimento um processo.

Alain Finkelkraut ("Le Mécontemporain")

AGRADECIMENTOS

O que resta desses dois anos de trabalho, passados entre a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), vai além dos resultados experimentais e a redação final desta dissertação: permanece acima de tudo o meu crescimento pessoal e profissional, que devo aos preciosos seres humanos.

Antes de tudo desejo um afetuoso agradecimento à minha família, minha mãe Maria, minha esposa Léis e minhas filhas Maria Eduarda e Ana Júlia, por me ajudarem com paciência e incentivo em todos esses anos. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Agradeço a aqueles que me guiaram, corrigiram e me encorajaram: meu orientador Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila do Departamento de Engenharia de Manufatura e Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/UNICAMP – CAMPINAS), meu coorientador Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano – CAMPINAS); os seus constantes empenhos representaram – com maneiras e em tempos diferentes – a direção e o ambiente onde foi possível trabalhar com paixão e desejo de aprender.

Aos Diretores do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais e Laboratório Nacional de Nanotecnologia o meu reconhecimento por assegurar a possibilidade de frequentar os *Laboratórios de Síntese e Caracterização de Nanomateriais, Microscopia Eletrônica e Nanotoxicologia*, e utilizar as várias “*facilities*” por um longo e precioso período de tempo.

Desejo relatar também a preciosa disponibilidade de muitos docentes e pesquisadores de várias Instituições, que auxiliaram na pesquisa e/ou cordialmente permitiram que eu frequentasse seus Laboratórios:

- Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu, da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (FEQ/UNICAMP – CAMPINAS), pela doação dos casulos da seda e a possibilidade de utilizar os materiais e equipamentos do

Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (UNICAMP) para a extração e purificação da fibroína;

- Profa. Dra. Mariana Agostini de Moraes, da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de São Paulo (FEQ/UNIFESP – Campus Diadema), por me ensinar a extrair e purificar a fibroína no Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (UNICAMP);

- Prof. Dr. Elias de Barros Santos, do Instituto de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP – Campus São José dos Campos), pela síntese e caracterização das nanopartículas de prata em fibroína;

- Prof. Dr. Ítalo Odoni Mazzali, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP – CAMPINAS), pela síntese das nanopartículas de prata em fibroína;

- Dr. Marcelo Alexandre de Farias, do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME/LNNano – CAMPINAS), pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Uma recordação especial a todas as pessoas que me ajudaram de várias maneiras durante os anos de mestrado, desejo recordar particularmente de alguns, cujas presenças são insubstituíveis: Dra. Cecília Zavaglia, Dr. Fabrício Delite, Dra. Zaira Clemente, Dr. Mathias Strauss, Francine Côa, Laís Luz, Ariane Garcia, Gabriela, Lidiani Franqui, Maurício Pierozzi, Jefferson Ronieri, Elisa Ferreira, Dra. Rosemeire Almeida, João Segundo, José Luis, Tais Salles, Nicolao Lima, Dra. Geraldine Perea, ...

Desejo um singelo agradecimento a todos os alunos e, ao instrutor George Godoy, pelas aulas de Krav Maga. Este primeiro ano foi muito importante para manter o stress afastado. **“Faça, mais faça certo”, “Reaja na proporção da necessidade”** (Imi Lichtenfeld, Z"l, criador do Krav Maga).

A todos, ***KIDA***.

RESUMO

Um método de síntese verde foi utilizado para a preparação de um compósito de nanopartículas de fibroína-prata (Fib-*NPsAg*) em meio aquoso. A metodologia é baseada na redução direta dos íons de prata de fibroína sem a adição de qualquer outro agente redutor. O espectro Raman da fibroína purificada é dominado por duas bandas mais fortes devido às ligações peptídicas, incluindo a vibração amida I a 1665 cm^{-1} (vibração de alongamento C = O principalmente), a vibração amida III a 1230 cm^{-1} (principalmente NH no plano de curvatura e vibrações de alongamento CN), e vibração de alongamento C^α-C a 1085 cm^{-1} . As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que o compósito Fib-*NPsAg* exibe uma estrutura hiper ramificada com tamanhos micrométricas entre 500-1000 μm , que é formado como resultado de uma agregação hierárquica de pequenas unidades micrométricas fibroína-prata. Os espectros de absorção de UV-vis dos quatro colóides Fib-*Ag* exibiram bandas com diferentes intensidades e em posições de 415-445 nm, correspondendo à ressonância de plasma de superfície localizada (RPSL). A intensidade da banda RPSL e a sua posição são dependentes da condição experimental utilizada para a síntese do composto Fib-*NPsAg*. Este resultado sugere que a solução dialisada e sob agitação é a melhor condição para preparar o composto Fib-*NPsAg*, caso o objetivo é a obtenção de concentração elevada de prata. Íons Na^+ e Ca^{2+} podem competir com os íons de prata por sítios de adsorção das fibras, que deve ser o que interfere significativamente no processo de redução de Ag^+ para Ag^0 . Consequentemente, esta interferência conduz à formação do compósito Fib-*NPsAg* com baixa concentração de nanopartículas de prata. Além disso, pode-se concluir que a condição de agitação também é um parâmetro importante para esta abordagem sintética. A banda RPSL aumenta significativamente a sua intensidade para as soluções mantidas sob agitação, até mesmo para a solução sem a etapa de diálise. Este resultado indica que a banda *plasmon* do compósito Fib-*NPsAg* pode ser ajustada alterando as condições experimentais, que é um parâmetro importante a ser controlada para aplicações plasmônicas deste composto. *NPsAg* foram sintetizadas utilizando AgNO_3 , gelatina, glicose e NaOH como precursor de prata, agente estabilizador, redutor e acelerador de reação, respectivamente. As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por Espectroscopia UV-vis, Espalhamento de Luz Dinâmico e Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy – TEM*). As *NPsAg* apresentam concentração inibitória mínima em concentrações baixas e atividade antimicrobiana contra uma bactéria gram-positiva (*B. subtilis*) e uma gram-negativa (*E. coli*). Porém, as nanopartículas de prata foram mais eficazes contra a bactéria *B. subtilis*. Além disso, não foi observada atividade antimicrobiana em soluções que não apresentavam as nanopartículas (controle), mostrando que a atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com as *NPsAg*.

Palavras chave: Fibroína. Compósito Fibroína-Prata. Plasmônico. Síntese verde. Gelatina.

ABSTRACT

A green synthesis method was used for preparation of fibroin-silver nanoparticles composite (Fib-*NPsAg*) in aqueous media. The methodology is based on the direct reduction of the silver ions by the fibroin without adding any other reducing reagent. The Raman spectrum of the degummed fibroin is dominated by the strongest bands due to the peptide bonds, including the amide I vibration at 1665 cm^{-1} (mainly C=O stretching vibration), the amide III vibration at 1230 cm^{-1} (mainly N-H in-plane bending and C-N stretching vibrations), and C α -C stretching vibration at 1085 cm^{-1} . Scanning electron microscopy images showed that the Fib-*NPsAg* composite exhibit an hyperbranched structure with micrometric sizes between 500-1000 μm , which is formed as a result of an hierarchical aggregation of micrometric silver-fibroin small unities. The UV-vis absorption spectra of the four Fib-Ag colloids exhibited bands with different intensities and positions at 415-445 nm, corresponding to the localized surface plasmon resonance (LSPR). The LSPR band intensity and its position are dependent on the experimental condition used for the synthesis of the Fib-*NPsAg* composite. This result suggests that the dialyzed solution under stirring is the best condition to prepare the Fib-*NPsAg* composite, if the objective is to obtain high silver concentration. Na^+ e Ca^{2+} ions can compete with the silver ions by the adsorption sites of the fibers, which should be interfering significantly in the reduction process from Ag^+ to Ag^0 . Consequently, this interference leads to the formation of the Fib-*NPsAg* composite with low concentration of silver nanoparticles. Moreover, it can be concluded that the stirring condition also is a significant parameter for this synthetic approach. The LSPR band significantly increase its intensity for the solutions kept under stirring, even for the solution without the dialyze step This result indicated that the *plasmon* band of the Fib-*NPsAg* composite can be tuned changing the experimental conditions, which is an important parameter to be controlled for plasmonic applications of this composite. *NPsAg* were synthesized using AgNO_3 , gelatin, glucose and NaOH as silver precursor, stabilizing agent, reducing agent and reaction accelerator, respectively. The nanoparticles synthesized were characterized by UV-vis spectroscopy, Dynamic Light Scattering and Transmission Electron Microscopy (TEM). *NPsAg* had minimal inhibitory concentration at low concentrations and antimicrobial activity against gram-positive (*B. subtilis*) and gram-negative (*E. coli*) bacteria. However, silver nanoparticles were more effective against *B. subtilis* bacteria. In addition, no antimicrobial activity was observed in solutions that did not present the nanoparticles (control), showing that the antimicrobial activity is directly related to the *NPsAg*.

Keywords: Fibroin. Silver-fibroin composite. Plasmonic. Green synthesis. Gelatin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - PRINCIPAIS REVOLUÇÕES TÉCNICAS OCORRIDAS NOS ÚLTIMOS SÉCULOS.....	21
FIGURA 1.2 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS ÁREAS DE ABRANGÊNCIA DO SISTEMA NBIC, SIGLA DE “NANOTECNOLOGIAS, BIOTECNOLOGIAS, TECNOLOGIAS DE INFORMAÇÃO E CIÊNCIAS COGNITIVAS”	24
FIGURA 1.3 - QUÃO PEQUENO É O NANÔMETRO? A ESCALA DAS COISAS E COMPARAÇÕES DE TAMANHO	25
FIGURA 1.4 - A TAÇA DE LICURGO (ROMA) É UM VIDRO DICROICO COMPOSTO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA; AO SER ILUMINADO POR FORA O VIDRO APRESENTA UMA COR VERDE (OPACA); QUANDO A LUZ É PROVENIENTE DO SEU INTERIOR, O VIDRO ADQUIRE A COR VERMELHA (TRANSLÚCIDA)	26
FIGURA 1.5 - PRIMEIRO PIGMENTO SINTÉTICO, O AZUL EGÍPCIO, ERA UTILIZADO EM TODO O MUNDO MEDITERRÂNEO PARA PINTAR VÁRIOS TIPOS DE MONUMENTOS E SE DIVIDIA EM NANOFOLHAS MUITO FINAS	27
FIGURA 1.6 - ESMALTES BRILHANTES UTILIZADOS PARA PINTAR CERÂMICAS NO MUNDO ISLÂMICO	28
FIGURA 1.7 - VITRAL <i>ROSACE NORD</i> DA <i>CATEDRAL DE NOTRE DAME DE CHARTRES</i> NA FRANÇA. AS MUDANÇAS DE COLORAÇÃO NO VIDRO DEPENDEM DA FORMA E DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA	29
FIGURA 1.8 - LÂMINAS DE UM SABRE “DAMASCUS” COM NANOTUBOS DE CARBONO. A IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ALTA RESOLUÇÃO (<i>HIGH-RESOLUTION TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY – HRTEM</i>) MOSTRAM NANOFIOS DE CEMENTITA REMANESCENTES ENCAPSULADOS POR NANOFIOS DE CARBONO	30
FIGURA 1.9 - CAPA DA REVISTA DO <i>CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY – CALTECH</i> QUE APRESENTA UM ARTIGO ADAPTADO DA PALESTRA DE <i>FEYNMAN</i> INTITULADA “ <i>THERE’S A PLENTY OF ROOM AT THE BOTTOM</i> ”	31
FIGURA 1.10 - PRINCIPAIS DESCOBERTAS QUE PERMITIRAM O DESENVOLVIMENTO DA NANOTECNOLOGIA NA ERA MODERNA (PARTE 1)	32
FIGURA 1.11 - PRINCIPAIS DESCOBERTAS QUE PERMITIRAM O DESENVOLVIMENTO DA NANOTECNOLOGIA NA ERA MODERNA (PARTE 2)	33
FIGURA 1.12 - PRINCIPAIS DESCOBERTAS QUE PERMITIRAM O DESENVOLVIMENTO DA NANOTECNOLOGIA NA ERA MODERNA (PARTE 3)	34
FIGURA 2.1 - COMPÓSITOS NATURAIS. OSSO FORMADO POR COLÁGENO E HIDROXIAPATITA. MADEIRA CONSTITUÍDA DE FIBRAS DE CELULOSE CONTIDAS EM MATRIZ DE LIGNINA	39

FIGURA 2.2 - APLICAÇÕES DE NANOCOMPÓSITOS DE BASE POLIMÉRICA EM DIVERSOS SETORES	41
FIGURA 2.3 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS NA PREPARAÇÃO DE NANOBIOCOMPÓSITOS	43
FIGURA 2.4 - PERSONAGENS E REPRESENTAÇÕES QUE FAZEM PARTE DA HISTÓRIA DAS NANOPARTÍCULAS	45
FIGURA 2.5 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO (A) PLASMON DE SUPERFÍCIE POLARIZADO E (B) PLASMON DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO	47
FIGURA 2.6 - DIFERENTES MORFOLOGIAS DE NANOPARTÍCULAS. VARIAÇÃO DA COR DA DISPERSÃO COLOIDAL EM FUNÇÃO DA MORFOLOGIA E TAMANHO	48
FIGURA 2.7 - PRINCIPAIS MÉTODOS UTILIZADOS NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS (<i>TOP-DOWN</i> E MÉTODO <i>BOTTOM-UP</i>)	49
FIGURA 2.8 - SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DE EXTRATOS VEGETAIS AQUOSOS DE CASCA DE LARANJA	58
FIGURA 2.9 - BICHO-DA-SEDA DOMESTICADO; CASULOS COM A FIBROÍNA E A SERICINA; ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA FIBROÍNA DE SEDA: α -HÉLICE E FOLHA- β	60
FIGURA 2.10 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS REGIÕES AMORFAS CRISTALINAS E ESTRUTURA FOLHA - β DA FIBROÍNA DE SEDA	61
FIGURA 2.11 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA EXTRAÇÃO DA GELATINA A PARTIR DO COLÁGENO	67
FIGURA 3.1 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE REMOÇÃO DA SERICINA	71
FIGURA 3.2 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE DISSOLUÇÃO DA FIBROÍNA DE SEDA	72
FIGURA 3.3 - FLUXOGRAMA COM OS PARÂMETROS E ETAPAS EMPREGADAS NA SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO	74
FIGURA 3.4 - FLUXOGRAMA COM OS PARÂMETROS E ETAPAS EMPREGADAS NA SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NPsAg</i>	76
FIGURA 3.5 - ESQUEMA DAS MICROPLACAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	78
FIGURA 4.1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FIBROÍNA	81
FIGURA 4.2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE REDUÇÃO DA PRATA	83
FIGURA 4.3 - ESPECTROS RAMAN DA FIBROÍNA BRUTA E FIBROÍNA PURIFICADA	84
FIGURA 4.4 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VISÍVEL DAS QUATRO DISPERSÕES COLOIDAIS DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/ <i>NPsAg</i>	86
FIGURA 4.5 - IMAGENS DE SEM: ^(a) MISTURA DE FIBROÍNA E AgNO ₃ ; ^(b) NANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/ <i>NPsAg</i> , SEM AGITAÇÃO; ^(c) NANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/ <i>NPsAg</i>	

COM AGITAÇÃO; ^(d) IMAGEM DE SEM COM AMPLIAÇÃO DA HASTE DO NANOCOMPÓSITO <i>NPsAg</i>	87
FIGURA 4.6 - ^(a) EQUAÇÃO QUÍMICA COM A OXIDAÇÃO DA Tyr E REDUÇÃO DOS ÍONS Ag^+ ; ^(b) FORMAÇÃO DA ESTRUTURA DENDRÍTICA	88
FIGURA 4.7 - ^(a) IMAGEM DE SEM E ESPECTRO <i>EDS</i> DO COMPÓSITO FIBROÍNA/PRATA SINTETIZADOS SEM AGITAÇÃO; ^(b) IMAGEM DE SEM E ESPECTRO <i>EDS</i> DO COMPÓSITO COM AGITAÇÃO	89
FIGURA 4.8 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NPsAg</i>	92
FIGURA 4.9 - ESPECTRO DE UV-vis DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NPsAg</i>	93
FIGURA 4.10 - CÁLCULO DA FWHM EFETUADO NO ESPECTRO DE UV-vis DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NPsAg</i>	95
FIGURA 4.11 - IMAGENS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA DISPERSAS SOBRE O GRID DE COBRE E OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	99
FIGURA 4.12 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE ^(a) <i>BRIGHT-FIELD</i> , ^(b) <i>DARK-FIELD</i> E ^(c) DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
a.C.	antes de Cristo
ACS	<i>Americal Chemical Society</i>
Ala	<i>Alanine</i>
Au-SF-SH	<i>Au-Silk Fibroin-Thiol</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAMHB	<i>Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standarts Institute</i>
CNT	<i>Carbon Nanotube</i>
DH	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDS	<i>Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
ELS	<i>Electrophoretic Light Scattering</i>
FCC	<i>Face-Centered Cubic</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
G	Gelatina
Gly	<i>Glycine</i>
GNG	Gelatina/NaOH/Glicose
G/NPsAg	Gelatina/ Nanopartículas de prata
GSH	glutaciona
HRTEM	<i>High-Resolution Transmission Electron Microscopy</i>
IP	Índice de Polidispersidade
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
LSPR	<i>Localized surface plasmon resonance</i>
MHRW	<i>Moderately Hard Reconstituted Water</i>
NPs	Nanopartículas
NPsAg	Nanopartículas de prata

NP	Nanoprata
PAA	poli(ácido acrílico)
PADA	poli(cloreto de dimetildialilamônio)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS	Poli(succinato de butileno)
PCL	Policaprolactona
PDA	polidopamina
PES	Poli(succinato de etileno)
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
PHBV	Poli- β -hidroxibutirato-co- β -hidroxivalerato
Phe	<i>Phenylalanine</i>
PLA	Poli(ácido láctico)
PPDO	Poli(p-dioxanona)
PVC	<i>Physical Vapour Deposition</i>
RNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
SD	<i>Standard Desviation</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
Ser	<i>Serine</i>
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Scattering</i>
SF	<i>Silk Fibroin</i>
SF-SH	<i>Silk Fibroin-Thiol</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
STM	<i>Scanning Tunneling Microscope</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TM	<i>Trade Mark</i>
Trp	<i>Tryptophan</i>
TV	<i>Television</i>
Tyr	<i>Tyrosine</i>
u.a.	unidades arbitrárias
UFC	Unidade de Formação de Colônias
UV-vis	Ultravioleta-Visível
ZP	<i>Zeta Potencial</i>

SIGLAS

ASTM	<i>American Society of Testing and Materials</i>
BAUA	<i>Bundesanstalt für Arbeitsschutz Und Arbeitsmedizin</i>
BRATAC	<i>Brazil Takushoku Kumiai</i>
BSI	<i>British Standards Institution</i>
CALTECH	<i>California Institute of Technology</i>
IBM	<i>International Business Machines</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
NBIC	<i>Nanotechnology, Biotechnology, Information Technology, Cognitive Science)</i>
NIOSH	<i>National Institute of Occupational Safety and Health</i>
NNI	<i>National Nanotechnology Initiative</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCCP	<i>Scientific Committee on Consumer Products</i>

LISTA DE LETRAS LATINAS E GREGAS

LETRAS LATINAS

Ag	Argentum
Au	Aurum
D_r	Taxa de Purificação
E	Potencial
E⁰	Potencial Padrão
Na	Natrium
S	Sulfur ou Sulphur

LETRAS GREGAS

α	α -hélice
β	Folha- β
ΔE^0	Varição do Potencial Padrão da Reação
ΔG^0	Energia Livre Padrão de Gibbs
η	Parâmetro de Dureza
λ	Comprimento de Onda
μ	Micrômetro (μm)
Ψ	Potencial Eletrostático
π	Transição Eletrônica
ζ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA	20
1.2 NANO – AS TRIBULAÇÕES DE UM PREFIXO	22
1.3 LINHA DO TEMPO – NANOTECNOLOGIA PRÉ-MODERNA	26
1.4 LINHA DO TEMPO – “UMA BREVE HISTÓRIA DAS COISAS PEQUENAS NA ERA MODERNA	30
1.5 OBJETIVOS	35
1.5.1 OBJETIVO GERAL	35
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIONANOCOMPÓSITOS	36
2.2 CONCEITOS – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	37
2.2.1 NANOPARTÍCULAS E NANOCOMPÓSITOS	37
2.2.2 BIONANOCOMPÓSITOS	42
2.2.3 BREVE HISTÓRIA DAS NANOPARTÍCULAS	44
2.2.4 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E A BANDA <i>PLASMON</i>	46
2.2.5 MÉTODO TOP-DOWN e MÉTODO BOTTOM-UP	48
2.2.6 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (<i>NPsAg</i>).....	51
2.2.7 MÉTODOS DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (<i>NPsAg</i>).....	52
2.2.8 FIBROÍNA DE SEDA	59
2.2.9 GELATINA	66

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS.....	69
3.2 MÉTODOS	70
3.2.1 FIBROÍNA DE SEDA	70
3.2.2 PREPARAÇÃO DOS CASULOS DO BICHO-DA-SEDA <i>Bombyx mori</i>	70

3.2.3 REMOÇÃO DA SERICINA.....	70
3.2.4 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AQUOSA DE FIBROÍNA DE SEDA	71
3.2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO AQUOSA DE FIBROÍNA DE SEDA	73
3.2.6 SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/ <i>NP_sAg</i>	73
3.2.7 CARACTERIZAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/ <i>NP_sAg</i>	74
3.2.8 SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NP_sAg</i>	75
3.2.9 CARACTERIZAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NP_sAg</i>	76
3.2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NP_sAg</i>	78
3.2.10.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	78
3.2.10.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	79

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/ <i>NP_sAg</i>	80
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/ <i>NP_sAg</i>	84
4.3 SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NP_sAg</i>	90
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NP_sAg</i>	92
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/ <i>NP_sAg</i>	102

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

5.1 CONCLUSÃO	105
5.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	107

REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

Essa dissertação descreve a preparação e caracterização de nanocompósitos híbridos com base em biopolímeros. Em particular foi estudada a síntese e caracterização de nanopartículas metálicas de prata (NPsAg) em fibroína de seda e gelatina. No Capítulo 1 são apresentados os seguintes tópicos: introdução; nanotecnologia; nano – as tribulações de um prefixo; linha do tempo – nanotecnologia pré-moderna e a linha do tempo – “uma breve história das coisas pequenas na era moderna”. O capítulo introdutório é concluído com a exposição dos objetivos gerais e específicos dessa dissertação

1.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia faz parte de um conjunto de revoluções técnicas que permearam a humanidade nos últimos séculos. As revoluções técnicas ocorridas nos últimos 300 anos podem ser divididas em: revolução geográfica, com os navios de exploração que percorriam distâncias longínquas; revolução industrial, com as novas máquinas a vapor; revolução da tecnologia da informação, com a invenção do transistor; e a nanotecnologia, com o microscópio eletrônico de tunelamento (FIGURA 1.1).

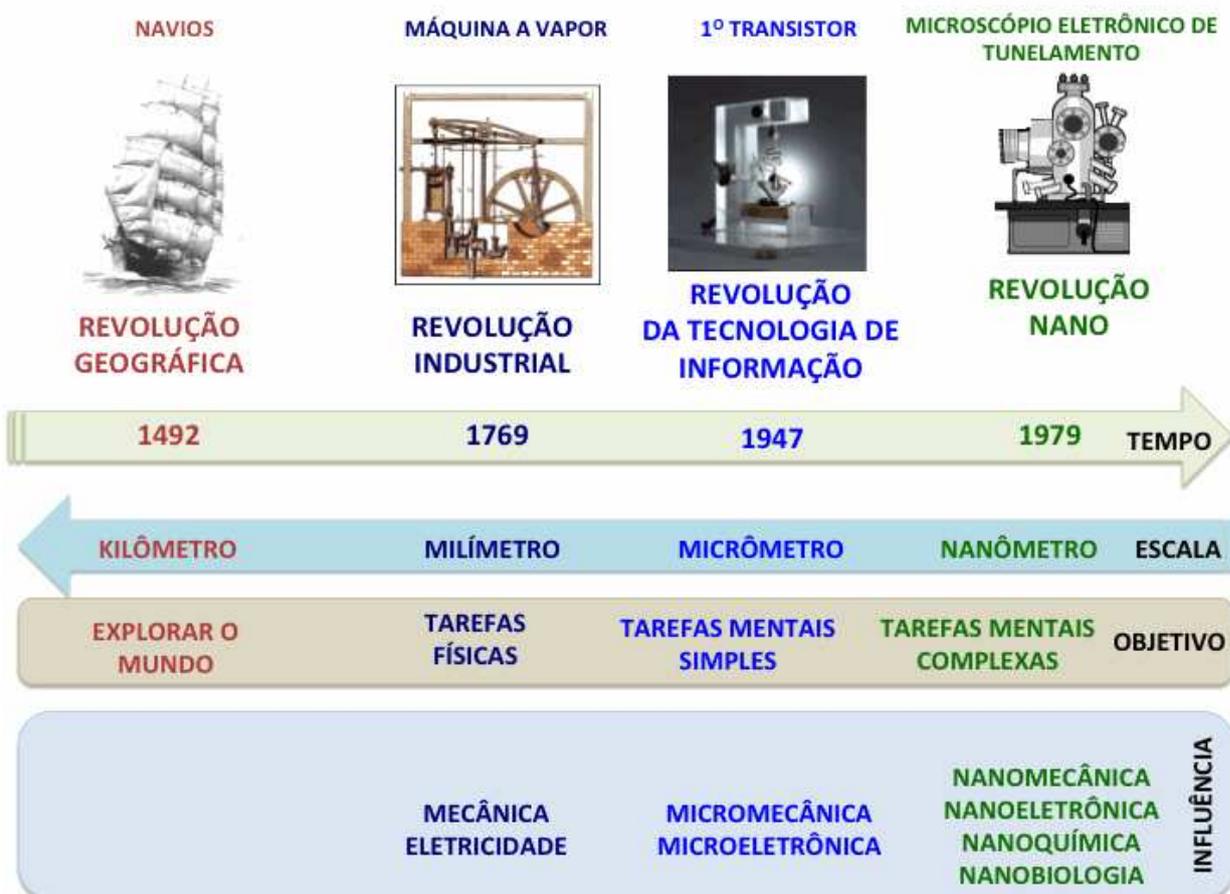
Nos séculos XX e XXI ocorreram duas importantes tecnologias – **a tecnologia da informação e a nanotecnologia** – e ambas desempenham um papel essencial no desenvolvimento da sociedade e da ciência moderna. A tecnologia da informação se desenvolveu por volta de 1947, com a invenção do transistor, e agora está em progressão pelo mundo inteiro. A segunda é a nanotecnologia, que desempenhará um papel fundamental no desenvolvimento das diversas ciências e tecnologias, em decorrência de sua aplicação em diversos campos. A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar e atravessa as tradicionais fronteiras do conhecimento da química, física, biologia, engenharia e ciências da terra (RAI, 2013).

A palavra “Nanotecnologia” chamou a atenção de diversos meios de comunicação (redes de TV, internet, jornais, etc.), o fascínio e a imaginação da comunidade em geral logo após o seu surgimento. A *National Nanotechnology*

Iniative (NNI) – um programa federal dos Estados Unidos de pesquisa em ciência, engenharia e desenvolvimento tecnológico, em nanoescala – define nanotecnologia como a manipulação da matéria com ao menos uma dimensão na ordem de 1 a 100 nanômetros ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$, um bilionésimo de um metro) (HORISKOSHI; SERPONE, 2013).

O surgimento de propriedades intrínsecas magnéticas, ópticas, eletrônicas, químicas, mecânicas, dependentes da nanoescala, resultou em uma grande aceitação da nanotecnologia por parte da comunidade científica mundial (RAI, 2013).

FIGURA 1.1 – PRINCIPAIS REVOLUÇÕES TÉCNICAS OCORRIDAS NOS ÚLTIMOS SÉCULOS.



FONTE: Adaptado de BAYINDIR, 2015.

Novos materiais e dispositivos foram e podem ser criados, a partir da Nanociência e Nanotecnologia, com a pesquisa em equipamentos e procedimentos

adequados para a manipulação individual de átomos e moléculas (WHITESIDES, 2005).

1.2 NANO – AS TRIBULAÇÕES DE UM PREFIXO

Uma lenda menciona que o poeta grego *Minermo* de *Colofon*, por volta do ano 600 antes da era moderna, foi enfeitado por uma flautista chamada *Nanno*. Marinheiros deixaram o porto da Fócida, nessa mesma época, em direção ao litoral sul da Gália. Uma tribo ligúria, cujo rei chamava-se *Nann* e tinha uma filha para casar, vivia na região onde atualmente é Marselha. Essa tribo estava em vias de ser colonizada pelos gregos. A filha de *Nann* devia escolher o futuro marido durante um banquete real e, em circunstâncias, fez com que a princesa escolhesse um dos marinheiros gregos em detrimento ao seu pretendente ligúrio. No banquete real foram servidos pãezinhos de mel, que séculos mais tarde, no mesmo porto de Marselha, seriam ainda conhecidos como “nannos”. Os “nannos” foram esquecidos e nem os filósofos gregos, que conceberam o conceito de átomo, nem os cientistas modernos, séculos mais tarde, com o surgimento da microscopia óptica ressuscitaram o termo *nannos*, que significa “anão” em grego, para qualificar as pequenas coisas da natureza invisíveis a olho nu. Do grego *mikros*, que significa “pequeno”, o prefixo “micro” prevaleceu para a posterioridade e o microscópio – que permite visualizar o que é invisível a olho nu – ajudou a marcar para sempre o prefixo “micro” para o que é pequeno (JOACHIM, PLÉVERT, 2009).

Em 1909, na Alemanha, apareceu pela primeira vez o “nanno” como um termo científico. *Hans Lohmann*, eminente professor de zoologia da *Universidade de Kiel* e por ocasião de um seminário da Sociedade Alemã de Zoologia, propôs denominar algas microscópicas – (*Calycomonas gracilis Lohmann*) com dimensões inferiores a um micrômetro (1 μm) – de *Nannoplankton*, ao observar esse tipo de organismo em seu microscópio óptico (HORISKOSHI; SERPONE, 2013). O prefixo nanno foi utilizado por *Lohmann* – que sentiu a obrigação de forjar um prefixo para qualificar os objetos de dimensões inferiores ao micrômetro – baseado no argumento que *nannos* é a tradução grega da palavra alemã *Zwerg*, que significa “anão”. O prefixo “nanno” fez sua segunda aparição científica na história em outubro de 1958, durante a sessão da Comissão Internacional de Pesos e Medidas. Como proposto

pelo soviético *G. Bourdoun*, em 1956, o termo nanômetro foi reconhecido como a bilionésima parte do metro e os membros do Comitê determinaram um único “n” em nano, em respeito às regras segundo as quais prefixos gregos são atribuídos aos múltiplos – “quilo” é retirado do grego *khilioi* (mil) – e prefixo latinos aos submúltiplos – milésimo (10^{-3}) “mili” vem do latim *millesimus* (JOACHIM, PLÉVERT, 2009).

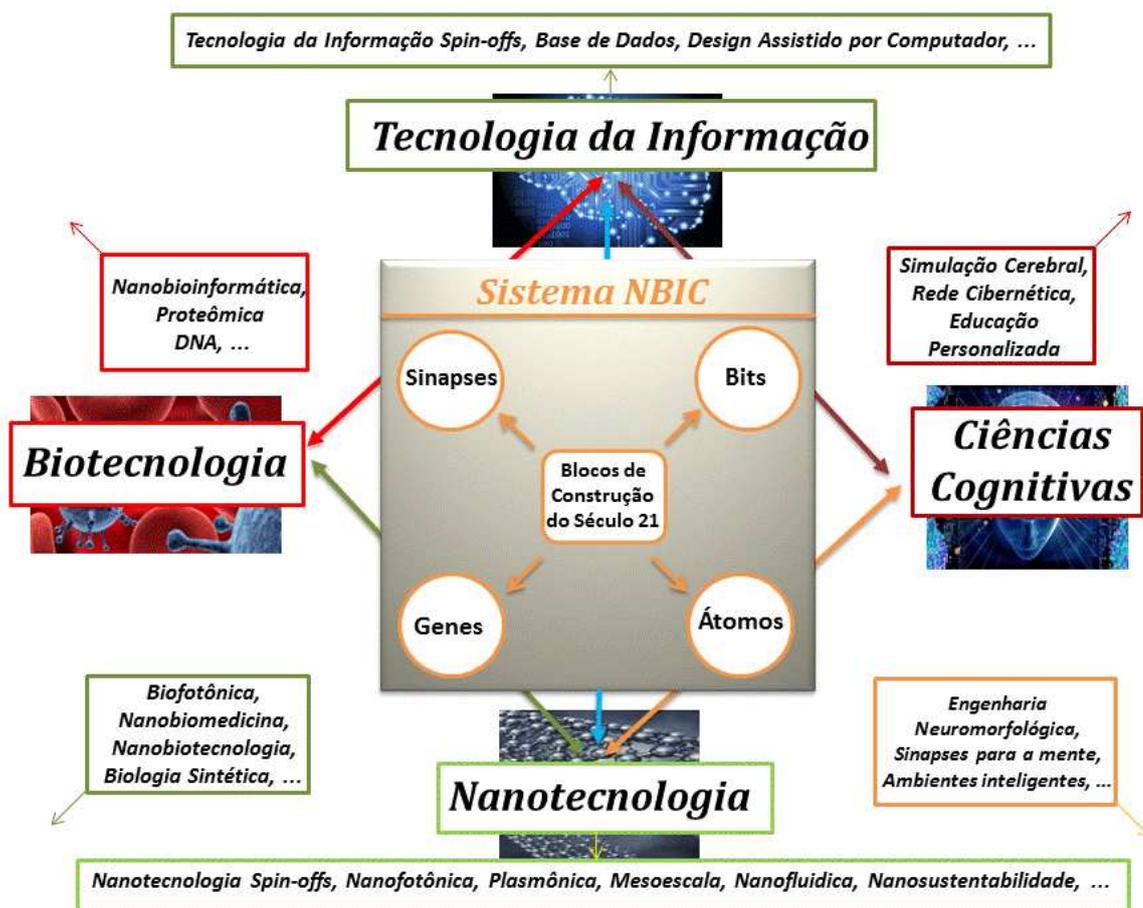
Nos anos 1950 foi necessário encontrar outras raízes para construir outros prefixos e, desta forma, surgiram gigas e teras – “gigante” e “monstro” em grego, respectivamente – resultaram em “giga” (10^9) e “tera” (10^{12}). De acordo com essa lógica, a raiz latina de “anão” – *nanus* – foi preterida ao grego *nannos* para ser utilizada como prefixo “nano”, quando se desejava exprimir o bilionésimo. Com o passar dos anos a confusão, entre o anão grego – *nannos* – utilizado pelo zoólogo *H. Lohmann*, e o anão latino – *nanus* – da Comissão Internacional de Pesos e Medidas, aumentou muito e a utilização dos termos “nanno” e “nano” tornou-se uma fonte de mal-entendidos. Em 1960, o Comitê Consultivo de Linguagem Científica da Academia de Ciências da França concluiu que a duplicação do “n” dependia das ciências nas quais os termos estavam implicados. A medicina, fisiologia e a física, em especial a metrologia, utilizavam o prefixo “nano”, enquanto que a micropaleontologia e paleontologia conservavam o termo “nanno” (JOACHIM, PLÉVERT, 2009).

Nas próximas décadas as pesquisas em eletrônica e biologia molecular, física mesoscópica – estudo de objetos do tamanho de uma macromolécula, situados na escala entre 10 e 100 nanômetros – foram inexoravelmente em direção ao mundo “lá embaixo” (JOACHIM, PLÉVERT, 2009). Entretanto, as conferências científicas e seminários proferidos nessa época não mencionavam em seus títulos os termos “nanno” e “nano”. Em 1974, no Japão, ocorreu a terceira história com o prefixo nano. A palavra “**Nanotecnologia**” foi utilizada em um trabalho publicado por *Norio Taniguchi* – especialista em ciência dos materiais da *Universidade de Tóquio* – que descrevia a construção do primeiro transmissor eletrônico unimolecular (WHITESIDES, 2005). Um microscópio de tunelamento desenvolvido pelos físicos *Gerd Binnig* e *Heinrich Rohrer* no laboratório de pesquisas da IBM em Zurique, Suíça, permitiu deslocar os átomos um a um e remeteu o prefixo “nano” ao meio científico após 15 anos de obscuridade. A *Digital Instrument* – uma empresa com sede na Califórnia – produziu e comercializou um microscópio de tunelamento

denominado **Nanos-cope I**. A primeira revista científica de nanotecnologia foi criada Inglaterra – *Nanotechnology* – incentivada pelo professor *David Whitehouse*, um especialista em indústria de precisão e microengenharia da *Universidade de Warwick*.

O prefixo “nano” atingiu a saturação, sobretudo em decorrência de sua ambição de estender sua influência em todas as áreas e, nas últimas décadas, alcançou novos objetivos na química, mecânica e biologia. Além disso, declinado sob o rótulo de convergência, começou a abrir novas fronteiras: a nanotecnologia começou a cair em desuso e novos termos foram cunhados, **NBIC**, sigla de “**nanotecnologias, biotecnologias, tecnologias de informação e ciências cognitivas**” (FIGURA 1.2).

FIGURA 1.2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS ÁREAS DE ABRANGÊNCIA DO SISTEMA NBIC, SIGLA DE “NANOTECNOLOGIAS, BIOTECNOLOGIAS, TECNOLOGIAS DE INFORMAÇÃO E CIÊNCIAS COGNITIVAS”.

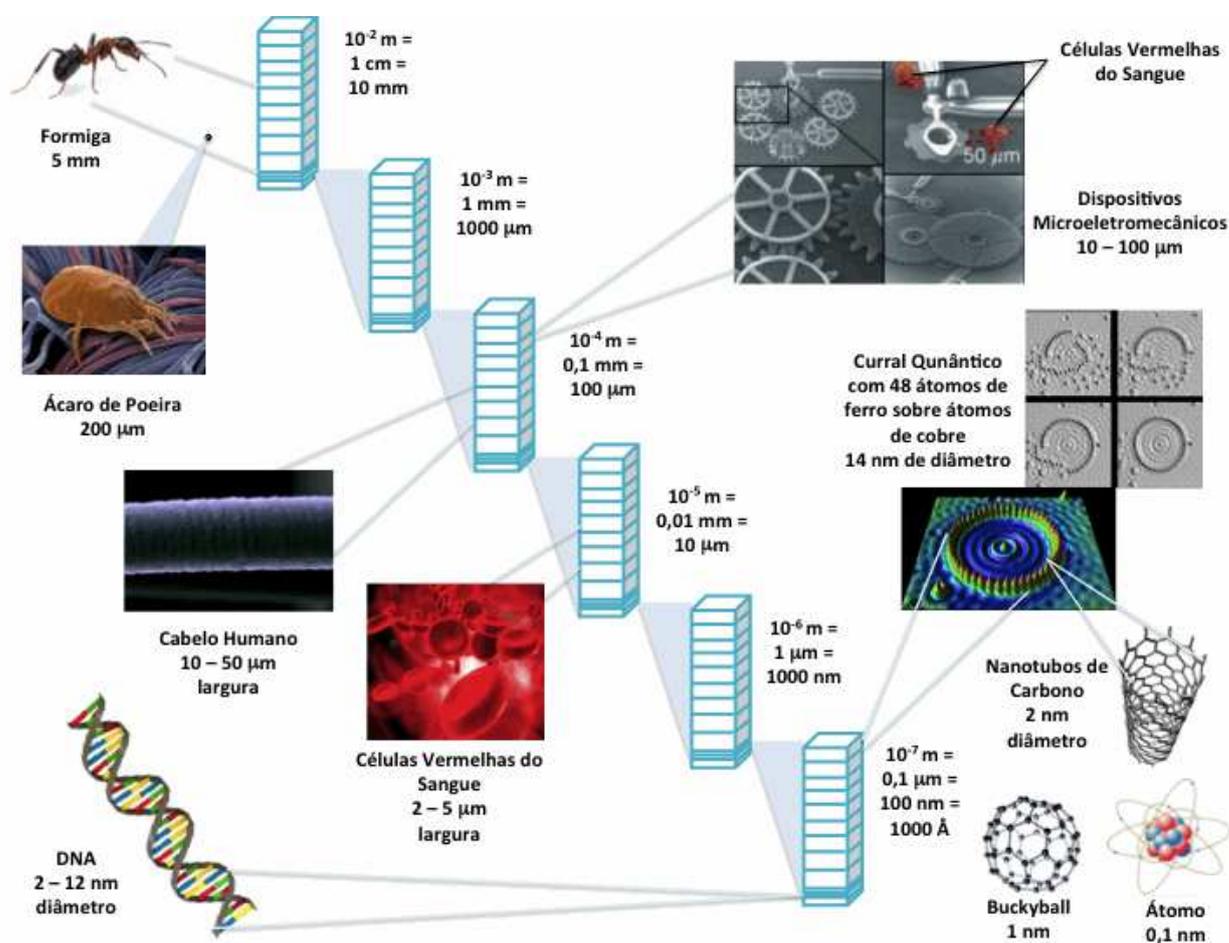


FONTE: Adaptado de ROCO, 2014.

No âmbito de angariar capital para a construção de indústrias ou investimentos em novas pesquisas, o prefixo híbrido “micro & nano” é utilizado de maneira categórica como forma de pressão aos órgãos governamentais e privados. Neste emaranhado de termos criou-se uma enorme confusão e os cientistas preferem atualmente uma escala 1000 vezes menor que o nano, o picômetro (10^{-12} m). Outros pesquisadores recorrem à “escala atômica”, uma vez que utilizam os átomos para designar as tecnologias desenvolvidas em seus laboratórios. Para complicar um pouco mais a utilização do termo nano, existe muita resistência na paleontologia e biologia que ainda utiliza o prefixo como nanno.

Quão pequeno é o nano? No Sistema Internacional de Unidades, o prefixo “nano” significa um bilionésimo, ou seja, 10^{-9} . Portanto, um nanômetro é um bilionésimo de um metro, como mostrado na FIGURA 1.3.

FIGURA 1.3 – QUÃO PEQUENO É O NANÔMETRO? A ESCALA DAS COISAS E COMPARAÇÕES DE TAMANHO.



FONTE: Adaptado de BRITANNICA, 2011.

Antes que os cientistas encontrem um consenso a respeito do termo nano, no momento, pode-se apenas chegar à conclusão que: **nano – as tribulações de um prefixo.**

1.3 LINHA DO TEMPO – NANOTECNOLOGIA PRÉ-MODERNA

Nanoestruturas são tão antigas quanto a própria vida, uma vez que o ser humano utilizava materiais nanométricos desde os primórdios da raça humana. A história da nanotecnologia remonta aos tempos pré-históricos quando os primeiros seres humanos utilizaram elementos de ocorrência natural com escala nanométrica. Átomos de carbono nanoestruturados, utilizados em pinturas nas paredes das cavernas, interagem muito bem com a superfície porosa das rochas e, desta forma, permaneciam aderidos por milhares de anos.

Os primeiros exemplos de materiais nanoestruturados baseavam-se na compreensão empírica dos artesãos e na manipulação dos materiais. Utilização de altas temperaturas foi um passo comum nos processos de produção destes materiais com novas propriedades. Um exemplo desses sistemas nanoestruturados antigos é a **Taça de Lycurgus**, que faz parte do acervo do *British Museum* (Londres) e data do século IV d.C.; essa taça é considerada a primeira descoberta arqueológica a conter nanopartículas (FIGURA 1.4) (NANO..., 2016)

FIGURA 1.4 – A TAÇA DE LICURGO (ROMA) É UM VIDRO DICROICO COMPOSTO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA; AO SER ILUMINADO POR FORA O VIDRO APRESENTA UMA COR VERDE (OPACA); QUANDO A LUZ É PROVENIENTE DO SEU INTERIOR, O VIDRO ADQUIRE A COR VERMELHA (TRANSLÚCIDA).



FONTE: NANO. GOV NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2016.

A *Taça de Lycurgus* é composta de um tipo muito especial de vidro, conhecido como vidro dicróico, que muda de cor conforme a luz incide sobre o material. Análise do vidro revelou a presença de uma pequena quantidade de uma fina camada de cristais metálicos de prata (Ag) e ouro (Au) com uma relação molar de 14:1, que confere as suas propriedades ópticas não usuais. A presença destes nanocristais conferem à Taça de Licurgo as cores verde e vermelha (HORISKOSHI; SERPONE, 2013).

Um pigmento azul brilhante que era utilizado por diversos povos há mais de 5 mil anos pode dar o suporte aos cientistas para desenvolver novos nanomateriais. O primeiro pigmento sintético, o **azul egípcio**, era utilizado em todo o mundo mediterrâneo para pintar vários tipos de monumentos. Vestígios deste pigmento foram encontrados na estátua da *Deusa Íris*, no *Partenon* ou em um famoso afresco, Lago do Jardim, que se encontra na decoração do túmulo do escriba egípcio *Nebamun*, em Tebas. Os pesquisadores descobriram que o silicato de cálcio e cobre no azul egípcio se divide em nanofolhas tão finas que milhares delas caberiam num fio de cabelo (FIGURA 1.5) (JOHNSON-MCDANIEL *et al.*, 2013).

FIGURA 1.5 – PRIMEIRO PIGMENTO SINTÉTICO, O AZUL EGÍPCIO, ERA UTILIZADO EM TODO O MUNDO MEDITERRÂNEO PARA PINTAR VÁRIOS TIPOS DE MONUMENTOS E SE DIVIDIDA EM NANOFOLHAS MUITO FINAS.



FONTE: JOHNSON-MCDANIEL *et al.*, 2013.

Nos séculos IX e XVII, no mundo islâmico, **esmaltes brilhantes** eram utilizados para conferir brilho às cerâmicas e, posteriormente, na Europa, os pigmentos eram constituídos de prata, cobre ou outras nanopartículas metálicas (FIGURA 1.6) (NANO..., 2016).

FIGURA 1.6 – ESMALTES BRILHANTES UTILIZADOS PARA PINTAR CERÂMICAS NO MUNDO ISLÂMICO.

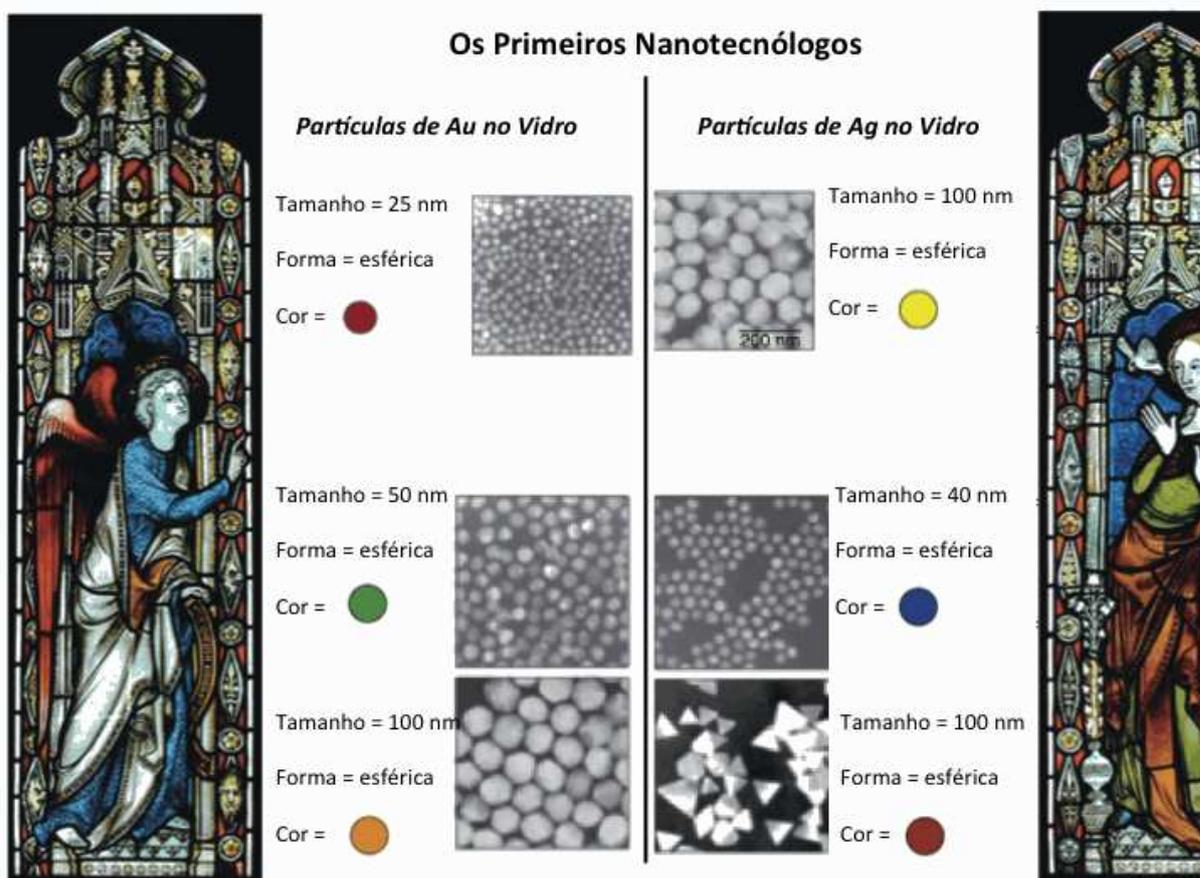


FONTE: NANO. GOV NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2016.

A nanotecnologia é muito evidente em várias igrejas antigas. A cor vermelha rubi utilizada nas janelas de vidro das catedrais, durante a Idade Média, é um exemplo de aplicação nanotecnológica.

O processo utilizado pelos artesãos na fabricação do vidro controlava o tamanho e a forma das nanopartículas de cloreto de ouro e outros óxidos e cloretos metálicos. As nanopartículas de ouro atuavam também como purificadores fotocatalíticos de ar. As nanopartículas conferiam também ao vidro cores magníficas, como pode ser observado em uma rosa que compõe os **vitrais da Catedral de Notre Dame de Chartres** na França (FIGURA 1.7) (JIN *et al.*, 2001).

FIGURA 1.7 – VITRAL ROSACE NORD DA CATEDRAL DE NOTRE DAME DE CHARTRES NA FRANÇA. AS MUDANÇAS DE COLORAÇÃO NO VIDRO DEPENDEM DA FORMA E DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA.



FONTE: HORISKOSHI; SERPONE, 2013.

O *New York Times* publicou em 22 de fevereiro de 2005 uma figura que mostra a relação entre as cores do vidro e o tamanho/forma das nanopartículas e, após muitas décadas, os constituintes presentes nos vidros de várias igrejas medievais foram determinados pelas modernas técnicas analíticas (FIGURA 1.7) (JIN *et al.*, 2001).

Nos séculos XIII-XVIII foram desenvolvidas armas de aço ultrarresistentes. Um exemplo são as lâminas de sabre “**Damascus**” que continham nanotubos de carbono e nanofios de cementita (FIGURA 1.8) (NANO..., 2016).

FIGURA 1.8 – LÂMINAS DE UM SABRE “DAMASCUS” COM NANOTUBOS DE CARBONO. A IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ALTA RESOLUÇÃO (*HIGH-RESOLUTION TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY – HRTEM*) MOSTRAM NANOFIOS DE CEMENTITA REMANESCENTES ENCAPSULADOS POR NANOFIOS DE CARBONO.



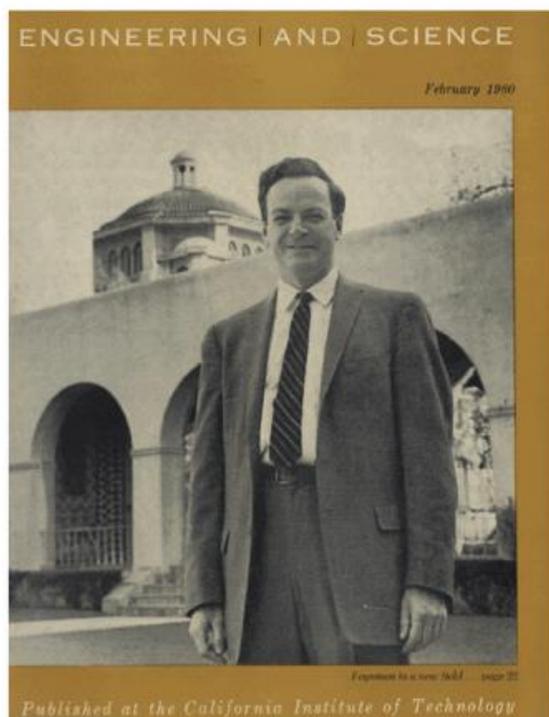
FONTE: REIBOLD *et al.*, 2006

A formulação de aço/carbono conferia à arma muita força, resiliência (propriedade de um corpo retornar à forma original após ter sido submetido a uma deformação elástica), capacidade de manter a aresta afiada e um padrão moiré de interferência visível no aço que conferem às lâminas a denominação sabre.

1.4 LINHA DO TEMPO – “UMA BREVE HISTÓRIA DAS COISAS PEQUENAS NA ERA MODERNA”

A miniaturização teria começado em 29 de dezembro de 1959. Embora existam referências anteriores, a apresentação do poder revolucionário da nanotecnologia foi efetuada por **Richard Feynman** (prêmio Nobel de Física em 1965). *Feynman* proferiu discursos extremamente “visionários” sobre o fato de que na parte inferior da escala de tamanho – “a princípio uma quantidade enorme (de trabalho) pode ser feito” e “existe um número enorme de aplicações técnicas” [*Feynman* em sua famosa palestra intitulada “**There’s a Plenty of Room at the Bottom**”, proferida no Encontro Anual da *American Physical Society* (*California Institute of Technology - Caltech*) em 29 de dezembro de 1959] – existe um novo mundo a ser investigado (FIGURA 1.9) (FEYNMAN, 1960).

FIGURA 1.9 – CAPA DA REVISTA DO CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY – CALTECH QUE APRESENTA UM ARTIGO ADAPTADO DA PALESTRA DE FEYNMAN INTITULADA “THERE’S A PLENTY OF ROOM AT THE BOTTOM”.



There's Plenty of Room at the Bottom

An invitation to enter a new field of physics.

by Richard P. Feynman

I imagine experimental physicists must often look with envy at men like Kamerlingh Onnes, who discovered a field like low temperature, which seems to be bottomless and in which one can go down and down. Such a man is then a leader and has some temporary monopoly in a scientific adventure. Percy Bridgman, in designing a way to obtain higher pressures, opened up another new field and was able to move into it and to lead us all along. The development of ever higher vacuum was a continuing development of the same kind.

I would like to describe a field, in which little has been done, but in which an enormous amount can be done in principle. This field is not quite the same as the others in that it will not tell us much of fundamental physics (in the sense of, "What are the strange particles?") but it is more like solid-state physics in the sense that it might tell us much of great interest about the strange phenomena that occur in complex situations. Furthermore, a point that is most important is that it would have an enormous number of technical applications.

What I want to talk about is the problem of manipulating and controlling things on a small scale.

As soon as I mention this, people tell me about miniaturization, and how far it has progressed today. They tell me about electric motors that are the size of the nail on your small finger. And there is a device on the market, they tell me, by which you can write the Lord's Prayer on the head of a pin. But that's

nothing; that's the most primitive, halting step in the direction I intend to discuss. It is a staggeringly small world that is before us. In the year 2000, when they look back at this age, they will wonder why it was not until the year 1960 that anybody began seriously to move in this direction.

Why cannot we write the entire 24 volumes of the *Encyclopaedia Britannica* on the head of a pin?

Let's see what would be involved. The head of a pin is a sixteenth of an inch across. If you magnify it by 25,000 diameters, the area of the head of the pin is then equal to the area of all the pages of the *Encyclopaedia Britannica*. Therefore, all it is necessary to do is to reduce in size all the writing in the *Encyclopaedia* by 25,000 times. Is that possible? The resolving power of the eye is about 1/120 of an inch – that is roughly the diameter of one of the little dots on the fine half-tone reproductions in the *Encyclopaedia*. This, when you demagnify it by 25,000 times, is still 30 angstroms in diameter – 32 atoms across, in an ordinary metal. In other words, one of these dots still would contain in its area 1,000 atoms. So, each dot can easily be adjusted in size as required by the photograving, and there is no question that there is enough room on the head of a pin to put all of the *Encyclopaedia Britannica*.

Furthermore, it can be read if it is so written. Let's imagine that it is written in raised letters of metal, that is, where the black is in the *Encyclopaedia*, we have raised letters of metal that are actually 1/25,000

"There's Plenty of Room at the Bottom" is a transcript of a talk given by Dr. Feynman on December 29 at the annual meeting of the American Physical Society at Caltech.

22

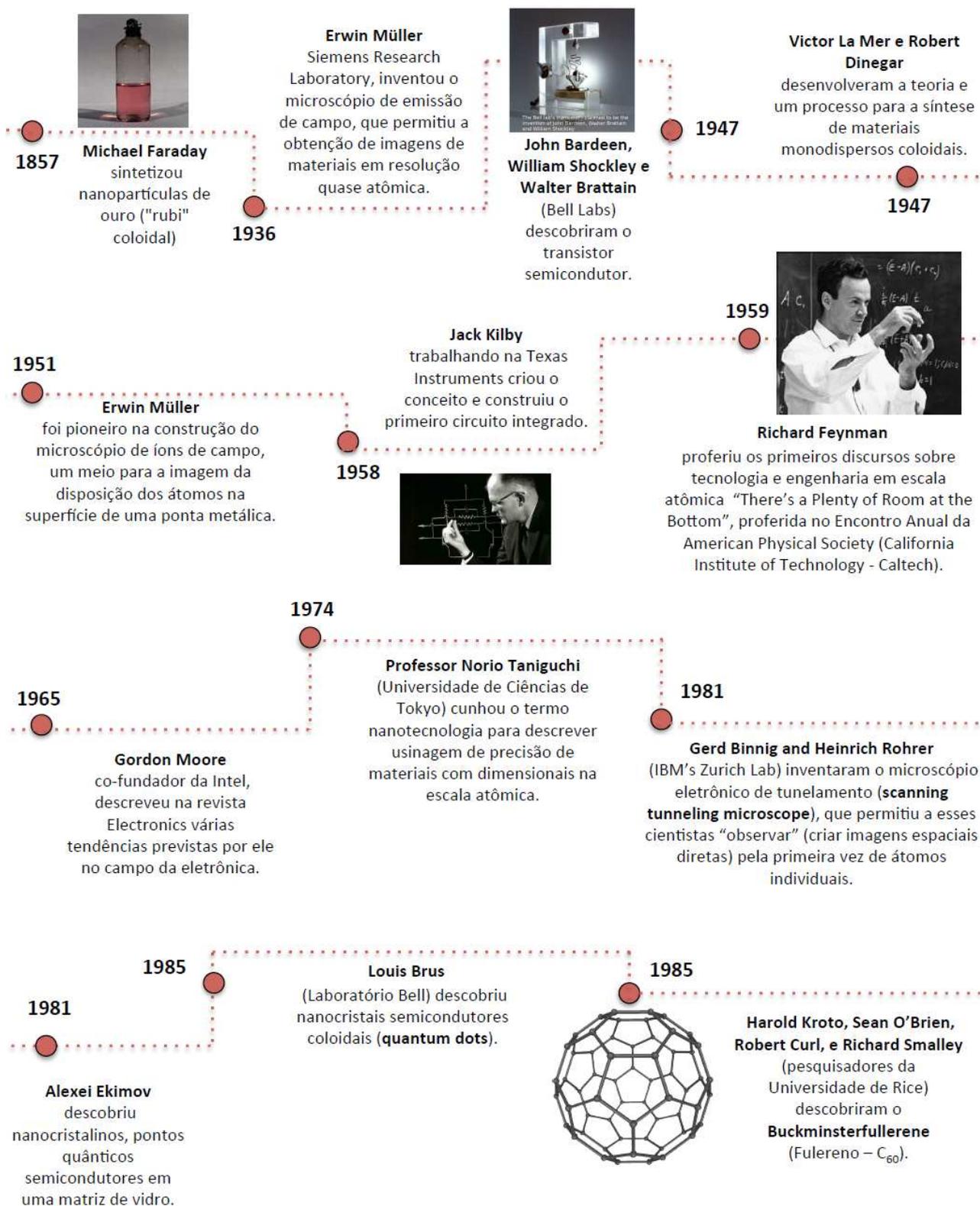
Engineering and Science

FONTE: FEYNMAN, 1960.

Esse fabuloso discurso ainda é considerado muitas vezes como um evangelho e qualificado, de fundador, enquanto *Feynman* é consagrado Pai das Nanotecnologias. Orientados pelas “boas novas” do Salvador do Mundo os físicos teriam dado origem às nanotecnologias, quando se lançaram na exploração de um mundo miniaturizado (JOACHIM, PLÉVERT, 2009). Outros cientistas acreditam que a origem da nanotecnologia ocorreu em 1979, quando os físicos europeus *Gerd Binnig* e *Heinrich Rohrer* desenvolveram o **microscópio de tunelamento** (*scanning tunneling microscope – STM*) (EIGLER, SCHWEIZER, 1990).

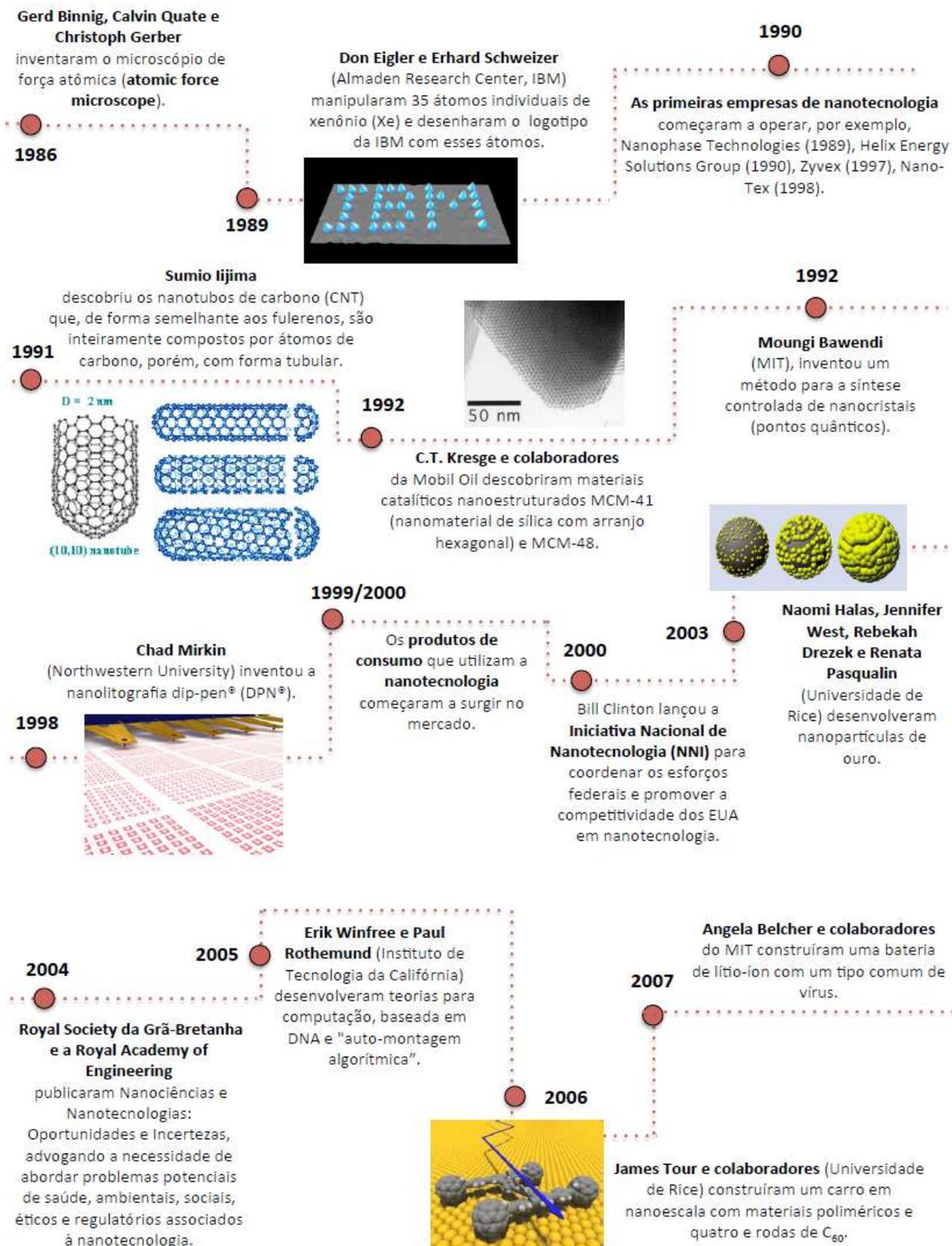
A ordem cronológica da história da nanotecnologia, na Era Moderna, começa com os experimentos de **Faraday** e termina com as perspectivas para o ano de 2020. Os principais exemplos de descobertas, que possibilitaram o desenvolvimento da nanotecnologia na Era Moderna, foram baseados na compreensão científica, experimentação e instrumentação mais sofisticada.

FIGURA 1.10 – PRINCIPAIS DESCOBERTAS QUE PERMITIRAM O DESENVOLVIMENTO DA NANOTECNOLOGIA NA ERA MODERNA (PARTE 1).



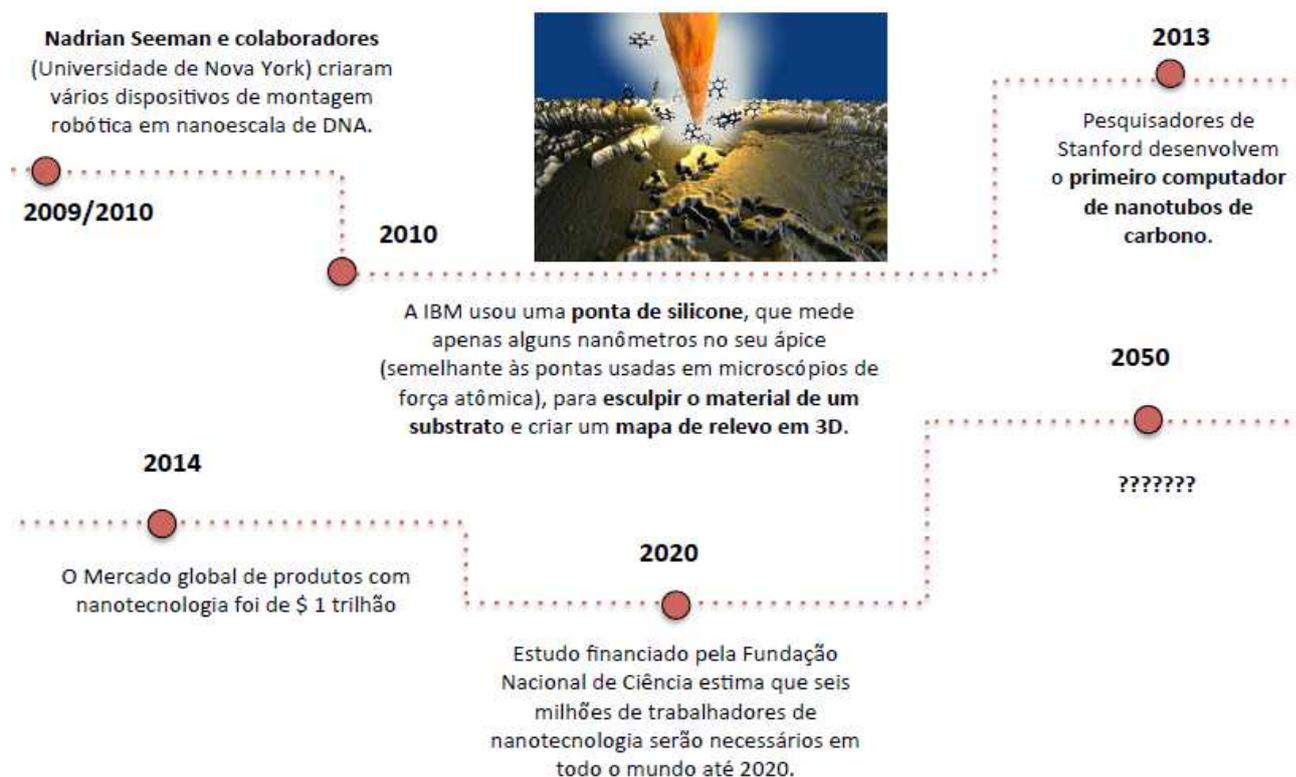
FONTE: NANO. GOV NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2016.

FIGURA 1.11 – PRINCIPAIS DESCOBERTAS QUE PERMITIRAM O DESENVOLVIMENTO DA NANOTECNOLOGIA NA ERA MODERNA (PARTE 2).



FONTE: NANO. GOV NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2016.

FIGURA 1.12 – PRINCIPAIS DESCOBERTAS QUE PERMITIRAM O DESENVOLVIMENTO DA NANOTECNOLOGIA NA ERA MODERNA (PARTE 3).



FONTE: NANO. GOV NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2016.

Ao longo dos anos a tecnologia tornou-se mais “elástica” e transformou-se em “nanotecnologias”, que deixou de manipular a matéria átomo por átomo e passou a utilizar diferentes técnicas que permitiram aos cientistas fabricar “pequenos objetos” com a precisão da ordem do nanômetro, quando estão em jogo bilhões de átomos. A exploração desse mundo material “lá embaixo”, como mencionado por *Feynman* em seu famoso discurso de 1959 no *Caltech*, apenas percorreu seus primeiros passos e ainda existe muito a ser explorado.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi a preparação dos bionanocompósitos fibroína/prata e gelatina/prata, investigando a dependência entre as propriedades plasmônicas destes compósitos e os parâmetros experimentais de síntese, visando ressaltar a versatilidade dos bionanocompósitos no desenvolvimento de materiais.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração da fibroína da seda a partir de casulos de bicho-da-seda domesticado (*Bombyx mori*);
- Síntese do compósito fibroína/nanopartículas de prata;
- Investigação da dependência entre as propriedades plasmônicas do compósito e os parâmetros experimentais de síntese (fibroína dialisada e não dialisada, síntese da nanopartícula de prata com e sem agitação);
- Síntese do compósito gelatina/nanopartículas de prata;
- Avaliação do comportamento da banda *plasmon*, tamanho de partícula e morfologia das nanopartículas presentes no compósito gelatina/nanopartículas de prata;
- Determinação da atividade antimicrobiana do compósito gelatina/nanopartículas de prata em uma espécie de bactéria gram-positiva comum no solo e na água, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), e uma bactéria gram-negativa encontrada normalmente no trato gastrointestinal inferior de organismos de sangue quente, *Escherichia coli* (*E. coli*).

2. REVISÃO DA LITERATURA

No Capítulo 2 são apresentadas a revisão da literatura e a fundamentação teórica, nanocompósitos, bionanocompósitos, breve histórico das nanopartículas, nanopartículas metálicas e de prata (NPsAg), a banda plasmon, métodos de síntese de nanopartículas de prata, fibroína de seda e gelatina.

2.1 BIONANOCOMPÓSITOS

Nanomateriais híbridos (ou nanocompósitos) pertencem a uma classe seleta de materiais que mais se desenvolveram em modernas áreas do conhecimento das ciências e tecnologias (SANCHES *et al.*, 2005). Os materiais híbridos, em escala nanométrica, ocupam um lugar de destaque dentro da área da ciência e engenharia de materiais, especialmente em pesquisas relacionadas aos novos materiais compósitos formados da combinação de componentes orgânicos e inorgânicos. A interação entre as fases componentes tem grande influência nas propriedades físicas e químicas desses nanomateriais como, por exemplo, propriedades ópticas, magnéticas e catalíticas (GOMEZ-ROMERO, 2001). O grande potencial de aplicação desses materiais multifuncionais é a obtenção de propriedades diferenciadas, em diversos casos, superiores àquelas obtidas para os materiais puros (SANCHES; ARRIBART; GUILLE, 2005).

Na última década, investigações de materiais compósitos de matriz polimérica tornaram-se um campo notável de pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias (PAUL; ROBENSON, 2008). Um exemplo deste tipo de material é a utilização de nanopartículas para a liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) (ANNABI *et al.*, 2014), aplicações cosméticas e bactericidas (SABA; TAHIR; JAWAID, 2014) e estudos que envolvem propriedades eletrônicas e ópticas dessa classe de materiais (YI *et al.*, 2011). A combinação de diferentes componentes que apresentam propriedades diferenciadas como, por exemplo, materiais híbridos orgânicos/inorgânicos, pode propiciar o surgimento, em decorrência do comportamento sinérgico dos materiais constituintes, de novas propriedades ou a intensificação de uma propriedade previamente existente no material (PAUL; ROBENSON, 2008). Estas propriedades, diferenciadas daquelas encontradas nas partes individuais dos componentes, torna o material compósito uma alternativa

interessante na supressão das limitações dos materiais convencionais, geralmente empregados em suas formas puras, e a viabilidade da exploração dos compósitos em diversas aplicações científico-tecnológicas. Além disso, caso pelo menos um dos componentes apresente dimensões na ordem de 1-100 nm, novas propriedades relacionadas com o efeito do tamanho nanométrico irão surgir (YUAN; MULLER, 2010). No campo de nanocompósitos existe uma grande variedade de aplicações em diferentes áreas como a química, a ciência de polímeros, a medicina e o desenvolvimento de novos dispositivos eletrônicos. Neste contexto, a vantagem da dimensão de nanoescala em relação a uma escala maior é uma questão importante e deve ser considerada, a fim de aperfeiçoar o nanocompósito resultante.

Dentro da grande diversidade de polímeros, os biopolímeros surgiram como uma classe versátil de materiais que apresentam potenciais aplicações em diversas áreas, incluindo os materiais compósitos (SU *et al.*, 2011) (YOUNES; RINAUDO, 2015). Quitosana, celulose e fibroína são biopolímeros e foram investigados por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo; muitos produtos confeccionados a partir desses polímeros são comercializados hoje em dia (YOUNES; RINAUDO, 2015) (KIM *et al.*, 2005) (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010). A seda é uma fibra que possui baixo custo de produção, além de ser um recurso natural abundante, renovável e disponível no Brasil.

2.2 CONCEITOS – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2.1 NANOPARTÍCULAS E NANOCOMPÓSITOS

A definição de nanopartícula e como ela é vista dependem, sobretudo, da sua aplicação específica (HORISKOSHI; SERPONE, 2013).

A TABELA 1 apresenta um resumo da definição de nanopartículas e nanomateriais, conforme as diversas organizações internacionais.

TABELA 1 - DEFINIÇÕES DE NANOPARTÍCULAS E NANOMATERIAIS UTILIZADAS POR DIVERSAS ORGANIZAÇÕES INTERNACIONAIS: INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO), AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIALS (ASTM), NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS (SCCP), BRITISH STANDARDS INSTITUTION (BSI), E BUNDESANSTALT FUR ARBEITSSCHUTZ UND ARBEITSMEDIZIN (BAuA).

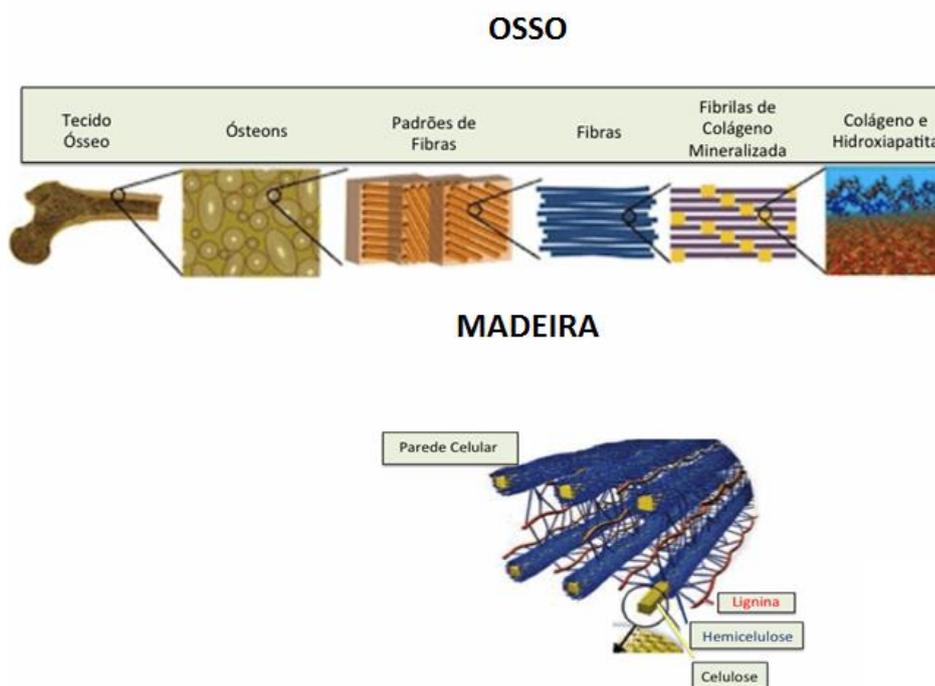
	NANOPARTÍCULA	NANOMATERIAL
ISO	Partícula com dimensão de 1-100 nm (diâmetro).	_____
ASTM	Partícula ultrafina cujo comprimento em 2 ou 3 sítios é de 1-100 nm.	_____
NIOSH	Partícula com um diâmetro de 1-100 nm, ou uma fibra atravessando a faixa 1-100 nm.	_____
SCCP	Pelo menos um dos lados está na faixa de nanoescala.	Material para o qual ao menos um lado ou a estrutura interna está em nanoescala.
BSI	Todos os campos ou diâmetros estão na faixa de nanoescala.	Material para o qual pelo menos um lado ou estrutura interna está em nanoescala.
BAuA	Todos os campos ou diâmetros estão na faixa de nanoescala.	Material constituído por uma nano estrutura ou nanosubstância.

FONTE: Adaptado de HORISKOSHI; SERPONE (2013).

A existência de híbridos, como seres fantásticos e prodígios, já permeavam o imaginário humano desde os mais antigos registros da mitologia grega. O grifo, um

temido guardião do templo dos Deuses, era um híbrido que aliava a cabeça e as asas de uma águia (simbolizando a perspicácia e capacidade de voar) e, o corpo de um leão (força). Na natureza os materiais compósitos (híbridos) existem desde épocas remotas e, entre os inúmeros compósitos naturais, dois apresentam estruturas excepcionais, o osso e a madeira. Nos ossos a estrutura é composta por uma rede de colágeno, que constitui o reforço, imersa em uma matriz de hidroxiapatita, formada a partir dos elementos cálcio, sódio, fósforo, magnésio e flúor. O comportamento mecânico do osso é resultado da contribuição de ambos os materiais, pois as fibras de colágeno são resistentes à tração, enquanto que a matriz de hidroxiapatita é resistente às cargas de compressão. O outro compósito natural, a madeira, é formada por fibras de celulose contidas em uma matriz de lignina. Estes compósitos são sintetizados através de processos químicos em meio aquoso, sob condições ambientes de temperatura e pressão, envolvendo interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio e forças de van der Waals ou interações eletrostáticas (FIGURA 2.1) (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004).

FIGURA 2.1 – COMPÓSITOS NATURAIS. OSSO FORMADO POR COLÁGENO E HIDROXIAPATITA. MADEIRA CONSTITUÍDA DE FIBRAS DE CELULOSE CONTIDAS EM MATRIZ DE LIGNINA.



FONTE: TXCHNOLOGIST (2014). YARRIS, (2010).

Admiráveis materiais híbridos são sintetizados, sob condições ambientais de temperatura e pressão, e encontrados na natureza. As sínteses destes materiais envolvem processos químicos em meios aquosos, com mecanismos de “automontagem” que englobam interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de van der Waals. Alguns nanocompósitos naturais apresentam arquitetura molecular e sinergia perfeita entre os seus componentes, com propriedades mecânicas extraordinárias. Estas propriedades serviram de inspiração em diversas pesquisas que visam a sua reprodução, buscando o controle da estrutura e das propriedades dos compósitos naturais que, conseqüentemente, propicia a obtenção de materiais tecnologicamente avançados. A tendência das pesquisas na área de nanocompósitos é a preparação de materiais nos quais as interações entre os componentes ocorrem em escala molecular ou nanométrica, e os nanocompósitos preparados nessa escala diminuta apresentam propriedades diferenciadas dos compósitos tradicionais e que podem ser definidas no processo de síntese. Essa extraordinária classe de materiais avançados apresenta um grande número de aplicações na área de tintas e revestimentos, materiais retardadores de chama, dispositivos magnéticos, óptico-eletrônicos e catálise (ESTEVEZ; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004).

Nanocompósitos são materiais promissores para diversas aplicações devido às propriedades de seus componentes individuais ou da combinação de diferentes componentes, e o grande interesse nestes materiais está relacionado com a preparação de estruturas multifuncionais formadas a partir da mistura de diferentes componentes (KICKELBICK, 2003).

Hoffman, Roy e Komarneni descreveram a síntese de nanomateriais heterogêneos obtidos pelo processo sol-gel em 1984 e o trabalho destes pesquisadores são as primeiras referências aos **nanocompósitos** (HOFFMAN; ROY; KOMARNENI, 1984) (KOMARNENI, 1992). Nestes primeiros estudos, a definição de compósitos fazia referência aos materiais com mais de uma fase sólida, pelo menos uma dimensão estava na faixa nanométrica e, normalmente, as fases sólidas estavam com dimensões de 1-20nm.

As propriedades dos nanocompósitos, também denominados híbridos orgânicos/inorgânicos, podem não ser decorrentes apenas da soma das contribuições individuais de ambas as fases, mas também de efeitos sinérgicos que

possam ocorrer a partir das fases. Portanto, a interface tem um relevante papel já que é ela que controla as propriedades do material, por exemplo, a estabilidade, a transparência e a homogeneidade química (SANCHES, C. *et al.*, 2001). A fase orgânica (com diversas estruturas e moléculas orgânicas naturais e sintéticas, disponíveis comercialmente ou na natureza) é responsável pelo controle da reatividade e estabilidade da fase inorgânica, enquanto que a fase inorgânica confere aos nanomaterial propriedades funcionais específicas (ópticas, mecânicas, eletrônicas e magnéticas).

Os recentes avanços tecnológicos, aliados ao desenvolvimento científico, propiciaram o surgimento de novos métodos para a síntese controlada de nanopartículas. As preparações de materiais compósitos, a partir da mistura de polímeros e nanopartículas, proporcionaram o desenvolvimento de novos materiais, ou melhoraram as propriedades dos materiais já existentes. Diversos nanocompósitos com base em polímeros sintéticos, desenvolvidos nos últimos anos, são aplicados em diversas áreas como na agricultura, sensores, construção, medicina, embalagens e higiene pessoal (FIGURA 2.2) (YANG; WANG; WANG, 2007).

FIGURA 2.2 – APLICAÇÕES DE NANOCOMPÓSITOS DE BASE POLIMÉRICA EM DIVERSOS SETORES.



FONTE: Adaptado de SANCHES *et al.* (2011).

2.2.2 BIONANOCOMPÓSITOS

De maneira notória, nanocompósitos com matrizes poliméricas são largamente investigados, produzidos e utilizados em diversas aplicações industriais. Nanocompósitos produzidos com polímeros naturais (bionanocompósitos) são consideravelmente menos estudados e aplicados industrialmente, quando comparados aos materiais sintéticos. A classe de materiais formada pela união de polímeros naturais e componentes inorgânicos – exibindo pelo menos uma dimensão em escala nanométrica – é denominada de **bionanocompósitos**. A pesquisa e desenvolvimento de nanocompósitos à base de biopolímeros aumentaram nos últimos quinze anos, desencadeados pela preocupação no desenvolvimento de materiais sustentáveis (recursos naturais com baixo custo, renováveis e com pequeno impacto ambiental) e a preparação de materiais com a disposição entre as fases orgânicas / inorgânicas inspiradas em nanocompósitos naturais, denominado de biomimetismo (DARDER; ARANDA; RUIZ-HITZKY, 2007) (LIU; BURGER; CHU, 2003).

Uma ampla variedade de polímeros biodegradáveis derivados de fontes naturais e materiais baseados em biopolímeros foi produzida na última década. Estes polímeros, conforme a sua origem, podem ser divididos em três classes:

- **Poliésteres produzidos por microrganismos:** poli- β -hidroxibutirato (PHB) e poli- β -hidroxibutirato-co- β -hidroxivalerato (PHBV).
- **Poliésteres sintéticos:** policaprolactona (PCL), poli(p-dioxanona) (PPDO), poli(succinato de butileno) (PBS), poli(succinato de etileno) (PES) e o poli(ácido lático) (PLA).
- **Polímeros provenientes de recursos naturais renováveis:** fibroína de seda, gelatina, celulose, amido e quitosana.

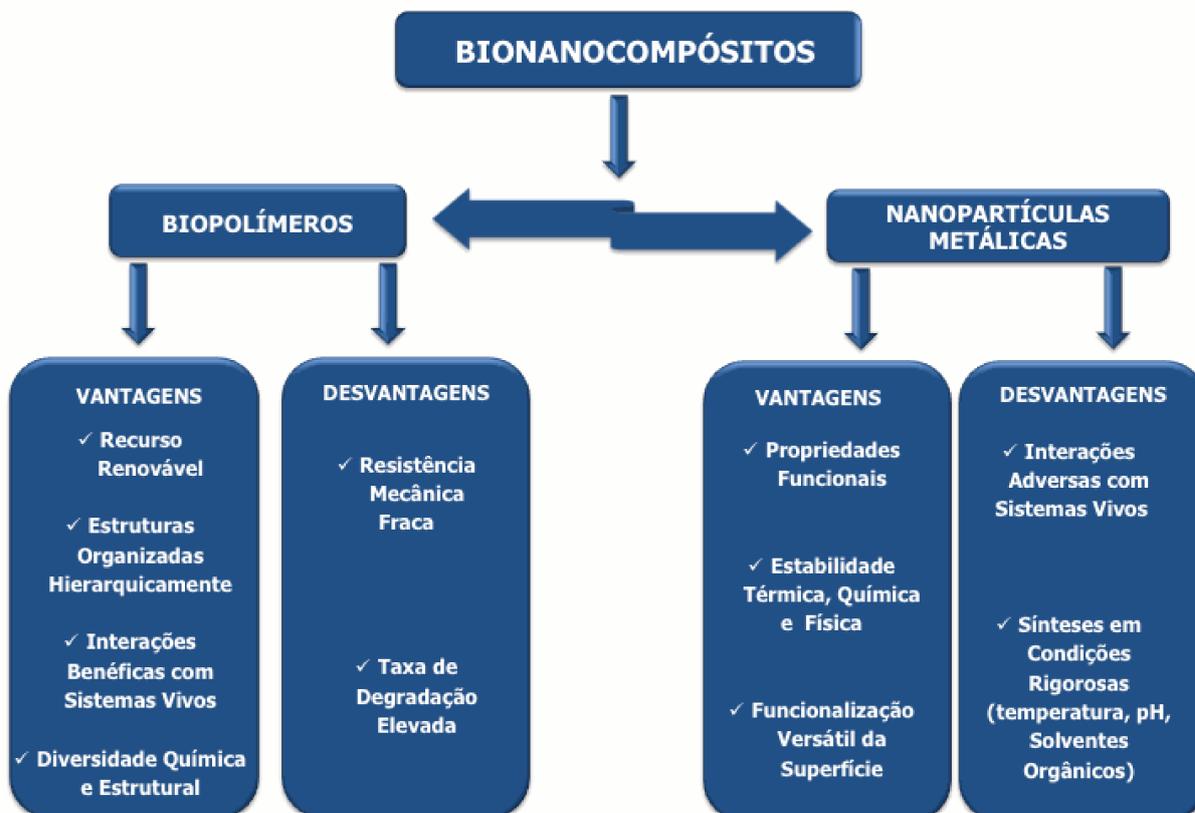
O número menor de aplicações dos bionanocompósitos está relacionado com as propriedades mecânicas desfavoráveis destes materiais e ao seu elevado caráter hidrofílico (YANG; WANG; WANG, 2007). A preparação dos bionanocompósitos passa necessariamente pela modificação e funcionalização dos biopolímeros, por exemplo, a incorporação de nanopartículas inorgânicas a estes

materiais melhoram o desempenho dos materiais produzidos. Em diversas áreas já é conhecido que a interação de partículas metálicas com biopolímeros (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, etc.) é um fator importante em diversos processos, por exemplo, catálise fermentativa, bioissorção, geobiotecnologia, biodrometalurgia e biomineralização. Polímeros naturais criam um ótimo ambiente para a funcionalização efetiva de centros ativos, bem como, a formação de uma ligação e não somente um complexo polinuclear (POMOGAILO; KESTELMAN, 2005).

A nanotecnologia é um recurso utilizado no desenvolvimento de novos bionanocompósitos, tem o objetivo de aperfeiçoar o desempenho dos materiais produzidos e uma das maneiras de fazer isso é a incorporação de nanopartículas inorgânicas (NPs) aos biopolímeros (YANG; WANG; WANG, 2007).

As principais vantagens e desvantagens dos materiais utilizados na síntese de nanobiocompósitos são mostradas na FIGURA 2.3.

FIGURA 2.3 – VANTAGENS E DESVANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS NA PREPARAÇÃO DE NANOBIOCOMPÓSITOS.



FONTE: Adaptado de HORISKOSHI; SERPONE (2013).

Nanocompósitos são materiais promissores para diversas aplicações devido às propriedades de seus componentes individuais ou da combinação de diferentes componentes, e o grande interesse nestes materiais está relacionado com a preparação de estruturas multifuncionais formadas a partir da mistura de diferentes componentes (KICKELBICK, 2003).

As propriedades dos bionanocompósitos são geralmente determinadas pela matriz. Biopolímeros constituem uma excelente matriz para nanopartículas, protegendo-as da degradação química e física e facilitando o seu processamento e sua manipulação. A síntese controlada de biopolímeros/nanopartículas inorgânicas possibilita a obtenção de materiais homogêneos de fácil processamento e baixo custo de produção, além da boa dispersão de cargas na matriz polimérica. A preparação de nanocompósitos, através da redução *in situ* de sais metálicos em suspensões aquosas de biopolímeros, tem sido estudada atualmente (HORISKOSHI; SERPONE, 2013). A redução *in situ* envolve normalmente a utilização de um sal metálico solúvel como precursor, e um agente estabilizante para evitar a aglomeração das partículas, com a vantagem da não utilização de um agente redutor externo. Os íons metálicos adsorvidos à matriz do biopolímero podem ser reduzidos às nanopartículas metálicas pelos grupos redutores presentes na própria matriz. As cadeias macromoleculares dos biopolímeros melhoram a distribuição no interior da matriz, evitam a formação de agregados e permitem a obtenção de nanopartículas metálicas com uma distribuição de tamanhos estreita e com forma bem definida (MANEERUNG *et al.*, 2008).

2.2.3 BREVE HISTÓRIA DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas metálicas (NPs) são utilizadas há muito tempo na humanidade, por exemplo, a famosa *Taça de Lycurgus* [composta de nanopartículas de prata (66,2%), ouro (31,2%) e cobre (2,6%) adicionadas ao vidro]. Em 1570, o iatroquímico *Paracelsus* sintetizou coloides de Au (ouro potável); *Valentinus*, 1677 preparou prata coloidal, denominada *lune potable*. O primeiro livro que mencionou Au no estado coloidal foi publicado pelo médico e filósofo *Francisci Antonii*. No livro é relatada a preparação de ouro solúvel a partir dos séculos IV e V a.C., no Egito e na

China. Do ponto de vista científico, a preparação de nanopartículas metálicas remonta ao século XIX, 1857, quando *Michael Faraday* descreveu a preparação de Au coloidal monodisperso por redução de íons $[\text{AuCl}_4]^-$ em solução aquosa, utilizando fósforo dissolvido em CS_2 (um sistema bifásico). Faraday foi o primeiro cientista a atribuir as propriedades diferenciadas do Au coloidal aos efeitos de tamanho de partículas com dimensões diminutas. Ele também investigou as propriedades ópticas de filmes finos preparados a partir secagem das soluções coloidais e observou a mudança reversível de coloração do filme, de púrpura para verde, quando este era submetido a uma compressão mecânica. A nanotecnologia era utilizada na produção de nanopartículas, fato muito evidente em várias igrejas antigas. Uma aplicação muito bem conhecida da “pré-nanotecnologia” é a cor vermelho rubi utilizada para a confecção de vitrais durante a Idade Média. Maravilhosos exemplos destas aplicações podem ser encontrados em janelas de vidro de muitas igrejas góticas europeias, por exemplos, a *Catedral de León*, na Espanha e, a *Cathédrale Notre-Dame*, na França (FIGURA 2.4).

FIGURA 2.4 – PERSONAGENS E REPRESENTAÇÕES QUE FAZEM PARTE DA HISTÓRIA DAS NANOPARTÍCULAS.



A produção industrial de nanopartículas teve início no século XX, por exemplo, na fabricação de pneus de borracha para automóveis eram utilizadas nanopartículas de negro de fumo. O método de combustão, a temperaturas elevadas, foi utilizado na produção de nanopartículas de dióxido de silício (SiO_2) e dióxido de titânio (TiO_2). (HORISKOSHI; SERPONE, 2013).

Desde o trabalho pioneiro de Faraday com nanopartículas até os dias atuais, ocorreu um grande desenvolvimento na síntese, modificação e caracterização destes sistemas. Atualmente existe uma ampla variedade de técnicas de preparação de nanopartículas, com distribuição de tamanho e morfologias diferentes, que determinam as propriedades dos materiais. Alterando-se as características das partículas, por exemplo, forma, estrutura cristalina, tamanho e auto-ordenamento, de um mesmo material e com idêntica composição, pode-se modificar completamente as características físicas e químicas do mesmo.

2.2.4 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E A BANDA *PLASMON*

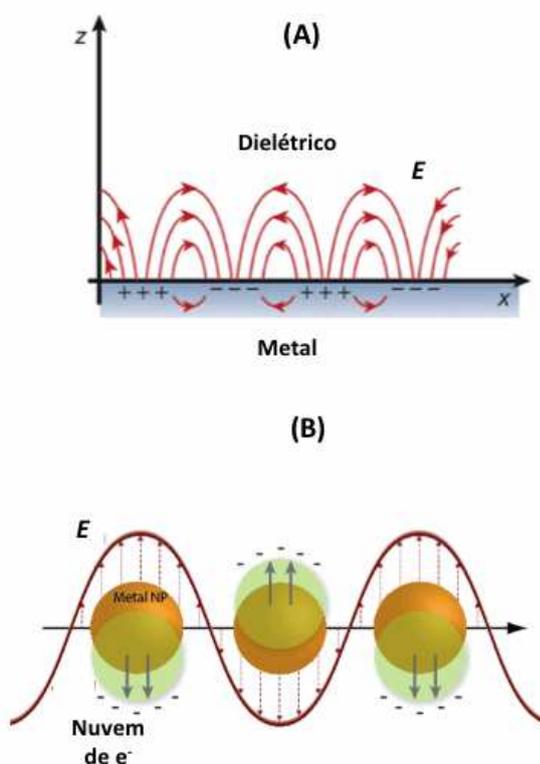
Nanopartículas metálicas apresentam, em relação ao “bulk” dos metais, propriedades físicas e químicas diferenciadas como, por exemplo, maiores áreas superficiais específicas, propriedades ópticas específicas, pontos de fusão mais baixos, resistências mecânicas e magnetizações específicas.

Um aspecto interessante das nanopartículas metálicas é o comportamento óptico observado em decorrência das alterações do tamanho e da forma das partículas. Nanopartículas metálicas apresentam absorções intrínsecas em regiões distintas do espectro visível, denominadas bandas *plasmon*, **ressonância de plasmon de superfície (surface plasmon resonance – SPR)**, ou mais especificamente de **ressonância plasmon de superfície localizada (localized surface plasmon resonance – LSPR)**. Esta ressonância é uma oscilação coerente dos elétrons de condução de superfície que foram excitados por radiação eletromagnética.

A Figura 2.5 ilustra a diferença entre um *plasmon de superfície propagado* e *localizado*. No caso das polarizações do *plasmon de superfície*, os *plasmons* propagam-se nas direções x e y ao longo da interface metal-dielétrico. A interação

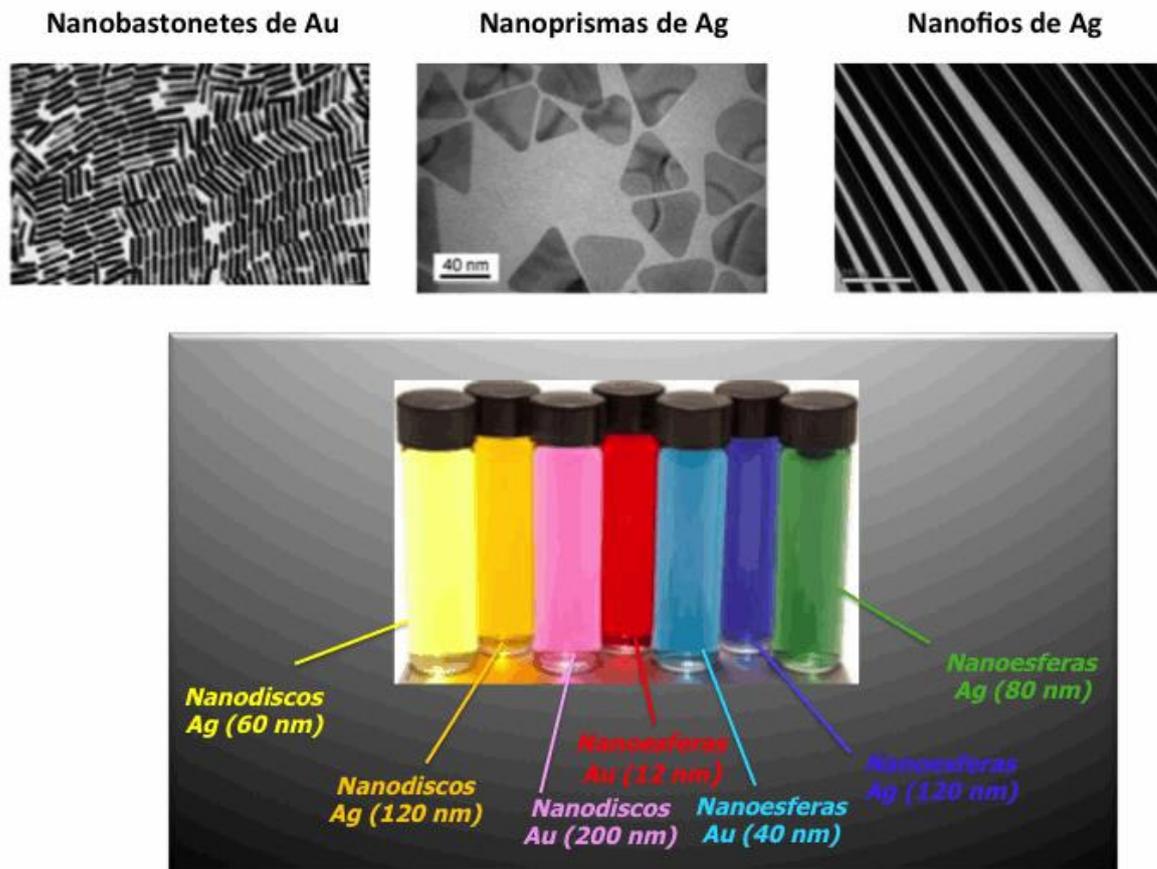
entre a onda da radiação eletromagnética, confinada na superfície metálica e uma camada superficial molecular de interesse, conduz às mudanças na condição da *ressonância de plasmon* e podem ser observadas de três maneiras distintas: (a) ângulo resolvido; (b) deslocamento de comprimento de onda e (c) imagem (MILLER; LAZARIDES, 2005). Nos dois primeiros modos é medida a refletividade da luz a partir da superfície do metal, em função do ângulo de incidência (comprimento de onda constante) ou do comprimento de onda (ângulo de incidência constante). O terceiro modo utiliza a luz, com comprimento de onda e ângulo de incidência constantes, para avaliar uma região bidimensional da amostra e mapear a refletividade da superfície em função da posição. Para o caso do *plasmon de superfície localizada*, a luz interage com partículas muito menores do que o comprimento de onda incidente. Isso conduz ao plasmon que oscila localmente ao redor da nanopartícula com uma frequência conhecida como *ressonância plasmon de superfície localizada (LSPR)*. De forma semelhante ao *SPR*, o *LSPR* é sensível às mudanças no ambiente dielétrico local (FIGURA 2.5) (BROCKMAN *et al.*, 2000).

FIGURA 2.5 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO (A) PLASMON DE SUPERFÍCIE POLARIZADO E (B) PLASMON DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO.



FONTE: Adaptado de BENSON (2011).

FIGURA 2.6 – DIFERENTES MORFOLOGIAS DE NANOPARTÍCULAS. VARIAÇÃO DA COR DA DISPERSÃO COLOIDAL EM FUNÇÃO DA MORFOLOGIA E TAMANHO.



FONTE: Adaptado de PEREZ-JUSTE *et al.* (2005).

A intensidade da banda *plasmon* e o comprimento de onda (λ) dependem de um grande número de fatores, por exemplo: distribuição de tamanho, tamanho e forma das nanopartículas (esferas, bastões, cubos ou triângulos) ou meio dispersante (viscosidade, constante dielétrica, moléculas ou íons ligados à superfície das nanopartículas) (FIGURA 2. 6).

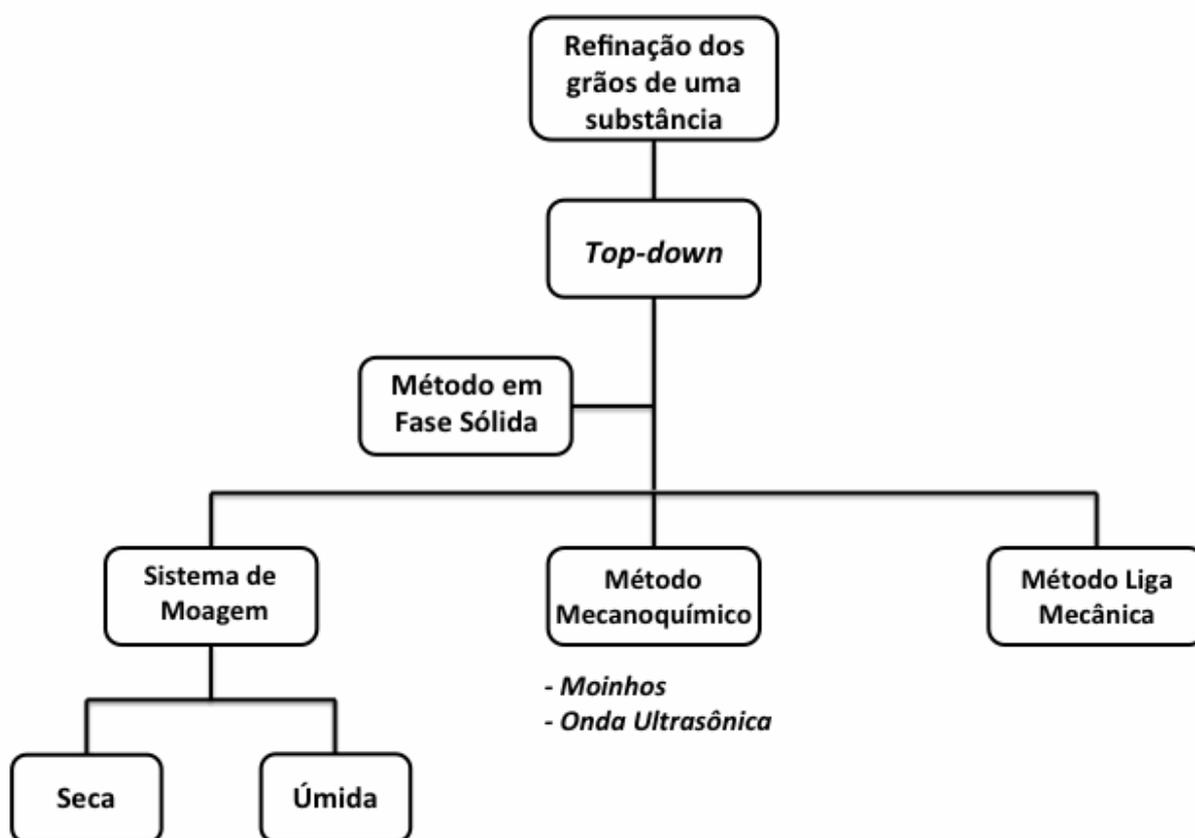
2.2.5 MÉTODO *TOP-DOWN* e MÉTODO *BOTTOM-UP*

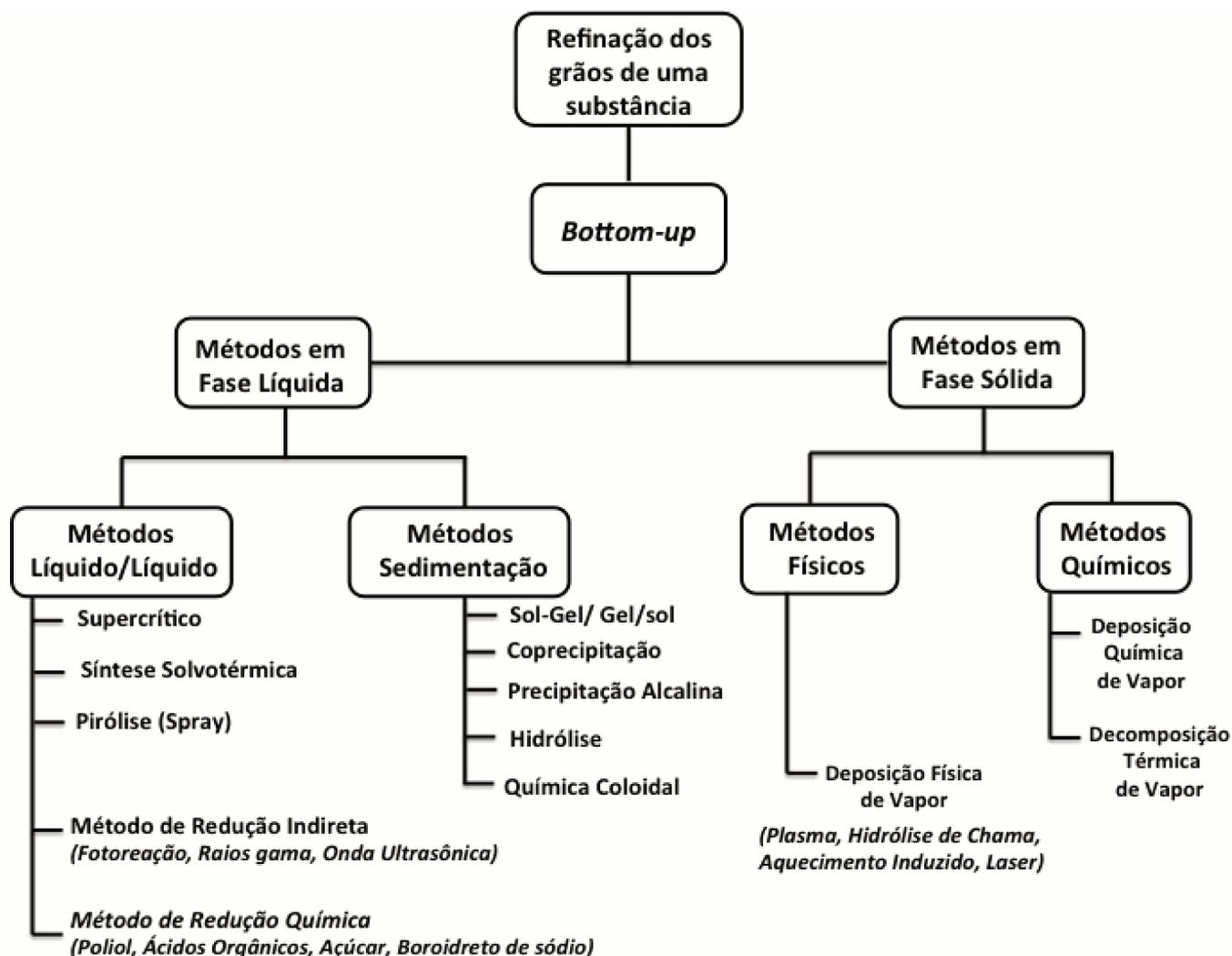
Os métodos utilizados na preparação de nanopartículas metálicas e, nanomateriais em geral, podem ser agrupados em dois métodos distintos: **Top-down** “de cima para baixo” ou **Bottom-up** “de baixo para cima”. Quebrar uma parede em seus componentes individuais seria um exemplo ilustrativo do método *Top-down* e, método *Bottom-up* é utilizado para se construir um tijolo, quando se

agrupa a argila, a areia, a cal virgem e a água. Em nanociências, o método *Top-down* se resume a utilizar materiais a granel e, por intermédio de processos mecânicos, físicos ou químicos, reduzi-los em nanopartículas. A preparação de nanopartículas pelo método *Bottom-up* envolve a construção das mesmas a partir dos átomos ou moléculas individuais.

A FIGURA 2.7 ilustra os principais métodos utilizados na síntese de nanopartículas (*Top-down* e método *Bottom-up*).

FIGURA 2.7 – PRINCIPAIS MÉTODOS UTILIZADOS NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS (*TOP-DOWN* E MÉTODO *BOTTOM-UP*).





FONTE: Adaptado de HORISKOSHI; SERPONE (2013).

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas na preparação de nanopartículas, porém em todos os métodos algumas características devem ser consideradas e obedecidas:

- maior reprodutibilidade;
- controle do tamanho de partícula, distribuição de tamanho, forma, estrutura cristalina e distribuição de composição química;
- melhoria da pureza das nanopartículas (menores impurezas);
- controle de agregação;
- estabilização de propriedades físicas, estruturas e reagentes.

2.2.6 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (*NPsAg*)

A forma coloidal da prata não é uma descoberta recente, a nanop prata (NP) já é conhecida há mais de 120 anos (VARNER, 2010). Em 1889, Lea MC sintetizou a partir de citrato nanopartículas de prata com estabilidade coloidal e diâmetro médio para as partículas entre 7 e 9 nm. A dimensão na escala nano e a estabilização por citrato são idênticos aos diversos artigos publicados nos últimos anos sobre a formação de NP utilizando prata e citrato. Além disso, a utilização de proteínas como agente estabilizador de NP já havia sido descrita em 1902. Um material denominado “Collargol”, uma espécie de NP com tamanho de partícula de 10 nm, foi produzida comercialmente e utilizada em aplicações médicas desde 1897. Nas décadas seguintes foram inventadas outras preparações com NP (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). Antes da descoberta da penicilina, em 1928, a prata coloidal era utilizada no tratamento de doenças e infecções (VARNER, 2010). Turkevich, em 1951, realizou a síntese de nanopartículas de ouro pela redução de ácido cloroáurico e citrato de sódio dissolvidos em água aquecida até a ebulição. As nanopartículas de ouro sintetizadas eram esféricas, com distribuição estreita de tamanho e diâmetro médio de 20 nm (KRUTYAKOV *et al.*, 2008). Mais tarde, o método de Turkevich foi utilizado na síntese de nanopartículas de prata (*NPsAg*) em água foi utilizado por Lee e Meisel, porém as nanopartículas obtidas apresentavam formas diferentes e diâmetro na faixa de 60 a 200nm. Apesar dessas duas consideráveis desvantagens, o método de síntese a partir do citrato foi amplamente utilizado na produção de *NPsAg*. O método de Turkevich apresenta a vantagem dos íons citrato atuarem como agente estabilizador das *NPsAg* e agente redutor simultaneamente (PACIONI *et al.*, 2015). Em 1953, *NPsAg* estabilizadas por gelatina foram patenteadas pela Moudry com diâmetro de partículas de prata entre 2-20 nm (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). Na década de 50 foram produzidas *NPsAg* impregnadas em carbono com diâmetro de partículas de prata abaixo de 25 nm. A NP foi registrada nos Estados Unidos como um biocida em 1954 e, por mais de 150 anos, este material tem sido utilizado para este fim. A produção da prata em escala nanométrica aumentou a sua eficácia no controle de vírus e bactérias, em decorrência da grande área superficial das nanopartículas e, conseqüentemente, maior contato com os microrganismos. O metabolismo celular, os sistemas de

transferência de elétrons e o transporte do substrato na membrana celular de uma célula microbiana são afetados pelas *NPsAg*. A multiplicação e o crescimento dos fungos e bactérias, que causam feridas, odor, coceira e infecção, são inibidos pelas *NPsAg* (VARNER, 2010). Nos últimos 100 anos, mesmo que as pesquisas sobre a prata não mencionem a terminologia “nano”, esta longa história da utilização racional e da fabricação de NP culminou em diversas pesquisas e muito conhecimento adquirido sobre essas nanopartículas (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

Com relação ao número de produtos, a nanopartícula é um dos nanomateriais com maior grau de comercialização. Atualmente, de todos os produtos registrados em banco de dados de produtos que contenham algum material nano, cerca de 30% apresentam a NP em sua composição (REIDY *et al.*, 2015). Além da crescente aplicação comercial, recentemente o número de publicações em revistas internacionais relacionados com nanopartículas metálicas cresceu exponencialmente. O número de publicações com estudos envolvendo *NPsAg* aumentou em 93% no intervalo de 2001 a 2011. Durante este período, em 2001 foram publicados 247 artigos, enquanto que em 2011 o número de artigos foi de 3603. O número de pedidos de patentes sobre nanocompósitos e síntese de *NPsAg* também aumentou consideravelmente nos últimos anos (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). Outro fator importante é a diversidade de áreas, uma vez que estes artigos foram publicados na área de química, física, engenharia, ciência dos materiais, ciência de polímeros, óptica, espectroscopia, eletroquímica e bioquímica molecular (HAIDER; KANG, 2015).

2.2.7 MÉTODOS DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (*NPsAg*)

O aumento substancial das aplicações envolvendo nanotecnologia é atribuído aos avanços nas técnicas de síntese de nanomateriais aprimoradas, sobretudo, nas últimas décadas.

O grande número de estudos, que envolvem os processos de síntese de nanopartículas, é decorrente da dificuldade do controle do tamanho, morfologia e a distribuição de tamanho das partículas, composição química e estrutura cristalina. Nos últimos anos, o número de artigos que descrevem as aplicações de

nanopartículas aumentou substancialmente, principalmente em áreas de pesquisa relacionadas com a utilização destes materiais em sistemas biológicos. O conhecimento dos métodos de síntese de nanomateriais de prata é fundamental, sobretudo, quando se deseja avaliar a influência destas nanopartículas em ecossistemas.

As *NPsAg* podem ser preparadas a partir de diversas rotas sintéticas. As propriedades das nanopartículas (ópticas, elétricas e magnéticas) dependem diretamente da forma, tamanho e composição. Todos os métodos de síntese reportados na literatura podem ser classificados e categorizados, uma vez que seguem abordagens comuns e as diferenças estão relacionadas e limitadas aos reagentes específicos utilizados nas sínteses e às condições das reações. Atualmente vários métodos de síntese de *NPsAg* têm sido descritos na literatura (HORISKOSHI; SERPONE 2013).

As rotas sintéticas de preparação de *NPsAg* podem ser classificadas em químicas, físicas, fotoquímicas e biológicas. As rotas sintéticas apresentam vantagens e desvantagens e estão associadas a alguns problemas intrínsecos aos métodos como, por exemplo, estabilidade, diâmetro das partículas e distribuição de tamanho para as *NPsAg*, custos e a impossibilidade do método de síntese ser utilizado na produção em escala industrial.

Métodos químicos são amplamente utilizados na síntese de *NPsAg*. Nas reações utilizadas nos métodos químicos, como qualquer reação redox, os valores dos potenciais padrões de redução (E^0) determinam os pares de reagentes adequados para que a conversão química ocorra de maneira satisfatória. Para a reação redox ocorrer, a energia livre de Gibbs deve ser negativa ($\Delta G^0 < 0$) e o potencial padrão da reação redox positivo ($\Delta E^0 > 0$). O potencial padrão de redução da prata em água é relativamente alto ($Ag^+ \rightarrow Ag^0$, $E^0 = + 0,799$ V), o que viabiliza a utilização de diversos agentes redutores. Os agentes redutores tipicamente utilizados incluem boroidreto de sódio ($NaBH_4$, $E^0 = - 0,481$ V), hidrazina (N_2H_4 , $E^0 = - 0,230$ V), hidroquinona ($C_6H_6O_2$, $E^0 = - 0,699$ V) e citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$, $E^0 = - 0,180$ V) (KRUTYAKOV et al., 2008) (PACIONI *et al.*, 2015).

Os métodos químicos de preparação de nanopartículas metálicas, embora produzam *NPsAg* puras, usualmente utilizam produtos químicos tóxicos, são métodos de síntese com custo elevado e potencialmente perigosos para o meio

ambiente. Em contraste aos métodos químicos, **métodos físicos** não utilizam substâncias químicas tóxicas e são comumente rápidos. Deposição física de vapor (*Physical Vapour Deposition* – PVC) e descarga de arco são os métodos físicos mais utilizados na preparação de nanopartículas metálicas (PACIONI *et al.*, 2015).

Nanopartículas de prata podem ser sintetizadas a partir de vários métodos de irradiação. **Métodos fotoquímicos** de preparação de nanopartículas de prata utilizam a fotorredução de um precursor ou de íons de prata, com a utilização de intermediários ativados fotoquimicamente, por exemplo, um radical. As vantagens da utilização de métodos fotoquímicos são a preparação de *NPsAg* com elevada pureza, fácil processamento, ampla faixa de meios reacionais que podem ser utilizados (vidro, polímeros, micelas, emulsões, etc.) (PACIONI *et al.*, 2015) (GHORBANI *et al.*, 2011).

A demanda crescente de nanopartículas deve ser acompanhada por métodos que utilizem a **síntese verde**. Vários países no mundo estão reduzindo os resíduos perigosos gerados e a **química verde** e os processos químicos estão, progressivamente, se integrando ao desenvolvimento da ciência e da indústria (LENARDÃO *et al.*, 2003). Doze princípios fundamentais, que regem a química verde, devem ser seguidos na implantação de processos sustentáveis:

- 1) Prevenção;
- 2) Economia de átomos;
- 3) Síntese de produtos menos perigosos.
- 4) Desenho de produtos seguros;
- 5) Solventes e auxiliares mais seguros;
- 6) Busca pela eficiência de energia;
- 7) Uso de fontes renováveis de matéria-prima;
- 8) Evitar a formação de derivados;
- 9) Catálise;
- 10) Desenho para a degradação
- 11) Análise em tempo real para a prevenção da poluição;
- 12) Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes.

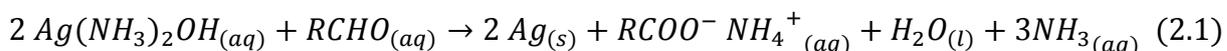
A síntese verde envolve três principais etapas, que devem ser avaliadas com base nas perspectivas da “química verde”:

- seleção do meio a ser utilizado como solvente;
- seleção de um agente redutor ecologicamente “correto”;
- seleção de substâncias não tóxicas que serão utilizadas na estabilização das *NPsAg* sintetizadas.

Dentre os métodos que utilizam a síntese verde podem ser citados: método polissacarídeo, método de *Tollens*, método de irradiação, método polyoxometalatos, método biológico.

No **método polissacarídeo** as *NPsAg* são preparadas utilizando água como solvente e polissacarídeos como agente redutor e, em alguns casos, o polissacarídeo atua como agente redutor e agente de “cobertura”. Por exemplo, a síntese de *NPsAg*/Amido foi efetuada utilizando o amido como agente de “cobertura” e β -D-glicose como agente redutor, em um sistema com aquecimento brando (RAVEENDRAN *et al.*, 2003). A utilização de amido na mistura reacional evita que a síntese seja efetuada em solventes tóxicos. Além disso, as interações entre o amido e as *NPsAg* são relativamente fracas e podem ser reversíveis em temperaturas elevadas, permitindo desta forma a separação das nanopartículas sintetizadas. *NPsAg* foram sintetizadas utilizando heparina carregada negativamente como agente redutor/estabilizador; a solução de heparina e AgNO_3 foi aquecida a 70°C durante 8 h. As nanopartículas ficaram estáveis e não foi observado sinais de agregação após dois meses da realização da síntese (HUANG, YANG, 2004). Em outro estudo *NPsAg* estáveis foram sintetizadas por autoclavagem de uma solução de AgNO_3 e amido. As condições experimentais foram pressão de 15 psi e temperatura de 121°C , durante 5 min (VIGNESHWARAN *et al.*, 2006). O tamanho de partícula das *NPsAg* foi entre 10 e 34 nm e as mesmas ficaram estáveis por um período de três meses. *NPsAg* menores, com tamanho de partícula menor que 10 nm, foram preparadas misturando-se uma solução de AgNO_3 e amido (agente de “cobertura” e soluções de NaOH e glicose como agente redutor (TAI *et al.*, 2008). A vantagem da utilização do amido com agente estabilizante é que as nanopartículas produzidas podem ser integradas em diversos sistemas para aplicações farmacêuticas e biológicas.

NPsAg com tamanho controlado podem ser sintetizadas pelo **método de Tollens**, em um processo que envolve uma única etapa. A reação química esquemática da redução da prata é mostrada na equação 2.1.



A reação de *Tollens* envolve a redução $Ag(NH_3)_2^+_{(aq)}$ (reagente de *Tollens*) por um aldeído, com a formação da prata metálica e um ácido carboxílico. Em um procedimento modificado a reação de Tollens foi processada utilizando sacarídeos, como agente redutor, em meio amoniacal. Neste procedimento foram obtidos filmes de *NPsAg* com tamanho de partícula entre 50 e 200 nm (SATO *et al.*, 2003). *NPsAg* foram sintetizadas pela redução de $Ag(NH_3)_2^+_{(aq)}$ com maltose e lactose (dois dissacarídeos) e glicose e galactose (dois monossacarídeos). Neste trabalho foi observado que as estruturas dos monossacarídeos e dissacarídeos influenciaram no tamanho da partícula formada, com partículas menores obtidas na síntese com os dissacarídeos e em pH 11,5. A maltose propiciou a formação de *NPsAg* com menor tamanho médio (25nm) e com a distribuição de tamanho mais estreita (PANACEK *et al.*, 2006). Um polímero, polivinilpirrolidona (PVP-360), e dois surfatantes, dodecil sulfato de sódio [sodium dodecyl (sulfate)-SDS] e momooleato de polioxietileno sorbitano (Tween-80) foram utilizados na estabilização das nanopartículas de prata sintetizadas (KVÍTEK *et al.*, 2008).

NPsAg podem ser sintetizadas utilizando **métodos de irradiação**. A irradiação a laser, de uma solução aquosa de um sal de prata e um surfatante, pode produzir nanopartículas com distribuição de tamanho e forma bem definidos. A técnica de fotossensibilização, com lâmpadas de mercúrio ou luz visível, também pode ser utilizada na síntese de *NPsAg*. A radiação por micro-ondas foi utilizada na preparação de *NPsAg* e nesta síntese aminoácidos foram utilizados como agentes redutores e amido solúvel como agente de estabilização. Radiação de pulso ionizante, radiação gama e radiólise também foram técnicas utilizadas na preparação de *NPsAg* (PACIONI *et al.*, 2015).

O **método do Polioximetálatos (POMs)** também pode ser utilizado na preparação de nanopartículas metálicas. O potencial de síntese dessas substâncias é atribuído a sua solubilidade em água, a capacidade de sofrer reações de oxidorredução multieletrônicas sem sofrer alterações em sua estrutura. Por exemplo, *NPsAg* foram sintetizadas pela iluminação de uma solução de aerada de $POM/S/Ag^+$,

onde POM = $[PW_{12}O_{40}]^{3-}$, S = propano-2-ol. Neste método o POM atua como agente redutor, estabilizante e fotocatalisador (TROUPIIS *et al.*, 2002).

Métodos convencionais de síntese de nanopartículas requerem precursores de prata, agentes redutores e estabilizadores/encapsulantes para evitar a aglomeração das *NPsAg*. Em detrimento disso, os **métodos biológicos** utilizam biomoléculas em substituição de agentes redutores/estabilizadores utilizados em outros métodos de preparação de nanopartículas. Organismos vivos como bactérias, fungos e plantas apresentam um grande potencial na produção de nanopartículas metálicas. A primeira síntese de *NPsAg* com a utilização de bactérias foi reportada em 2000; Joerger e colaboradores sintetizaram *NPsAg*, com tamanho inferior a 200 nm, a partir de *P. stutzeri* AG259. Em 2008, a biossíntese de nanocristais de prata foi efetuada com *Bacillus licheniformis*; a adição de solução aquosa de íons prata em biomassa de *B. Licheniformis* promoveu a redução desses íons e a formação de *NPsAg* (GHORBANI *et al.*, 2011). Em 2001, o fungo *Verticillium* foi utilizado em um novo método biológico de síntese de nanopartículas de prata. A interação entre o fungo e os íons prata, em solução aquosa, resultou na redução intracelular dos íons Ag^+ e a formação de nanopartículas com dimensões entre 13 e 37 nm. A redução dos íons prata deve ocorrer por um processo enzimático. Duran e colaboradores produziram nanopartículas metálicas, via síntese extracelular, com a utilização de fungos *Fusarium oxysporum* (DURAN *et al.*, 2005).

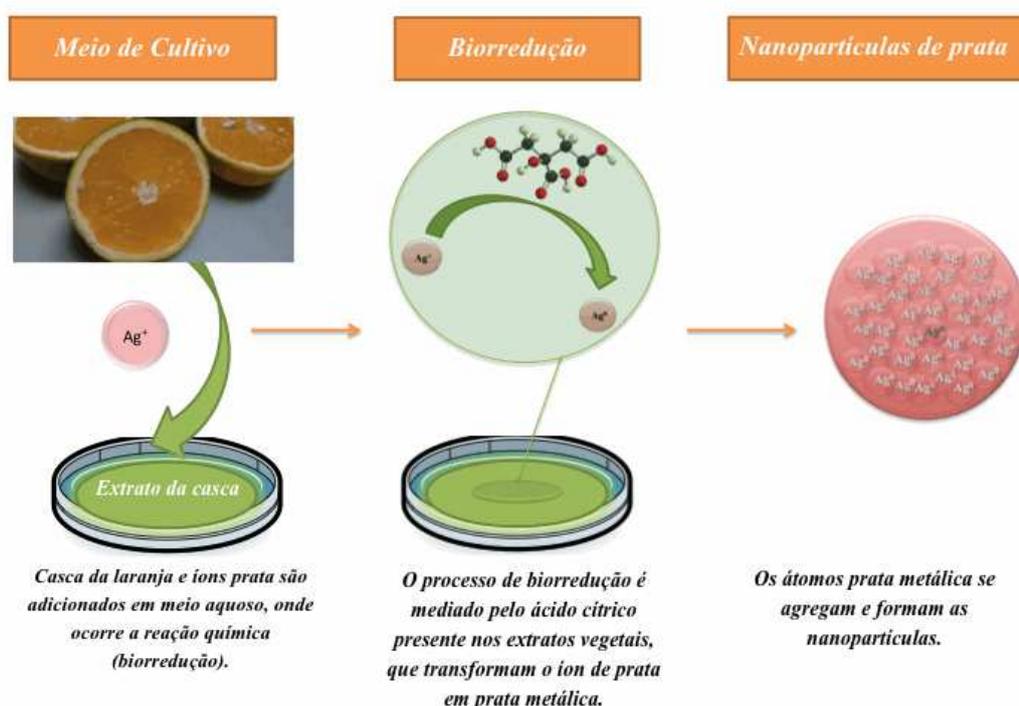
A fitossíntese, produção de nanopartículas de prata a partir de plantas, tem recebido muita atenção da comunidade científica na área de síntese de materiais devido a alguns fatores:

- rapidez de síntese;
- não patogênico;
- ecológico;
- protocolo econômico e em um único passo, que convergem para os processos verdes de síntese.

Biomoléculas como proteínas e enzimas, alcaloides, taninos, polifenólicos, polissacarídeos, saponinas, terpinóides e vitaminas presentes em extratos de plantas (caules, folhas, raízes e frutos) apresentam propriedades medicinais, são benéficas ao ambiente e suas estruturas químicas complexas são utilizadas na

síntese de nanopartículas de prata (FIGURA 2.8) (ROY; DAS, 2015). Diferentes partes de plantas como flores, sementes, frutos, caules, látex e raízes, bem como a biomassa seca e morta da planta, podem ser utilizados na síntese de nanopartículas metálicas com diferentes formas e distribuição de tamanho. Diversas plantas já foram utilizadas na produção de nanopartículas: Skunkvine (*Paederia foetida*) – planta ornamental nativa de Bangladesh e com forte odor de compostos de enxofre; Mamão Papaia – fruto do mamoeiro, árvore da espécie do gênero *Carica* (*Carica papaya*); Coentro (*Coriandrum sativum*) – planta com origem no Mediterrâneo e Oriente Médio, porém já era conhecida pelos egípcios que a utilizavam como planta medicinal; o Figo-da-Índia (*Opuntia ficus-indica*) – uma espécie de cacto muito comum em regiões semi-áridas; Árvore do Caril (*Murraya koenigii*) – planta originária da Índia, da família das Rutáceas. As nanopartículas metálicas sintetizadas pelo método fitossíntese são, de forma geral, esféricas. Os fatores importantes que envolvem este tipo de síntese são: o agente estabilizador, o meio de reação e o agente redutor (RAI, 2013).

FIGURA 2.8 – SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DE EXTRATOS VEGETAIS AQUOSOS DE CASCA DE LARANJA.



FONTE: Adaptado de ERENO (2014).

2.2.8 FIBROÍNA DE SEDA

A seda é um biopolímero proteico e insolúvel em água, produzida pelo bicho-da-seda domesticado (*Bombyx mori*). O casulo do bicho-da-seda apresenta em sua estrutura fibras constituídas de uma proteína – a fibroína – e uma proteína fibrosa que constitui de 25 a 30% da composição dos casulos, a sericina (FIGURA 9) (PAN *et al.*, 2012). A sericina é uma espécie de cola responsável pela união das fibras de fibroína, formando a estrutura do casulo.

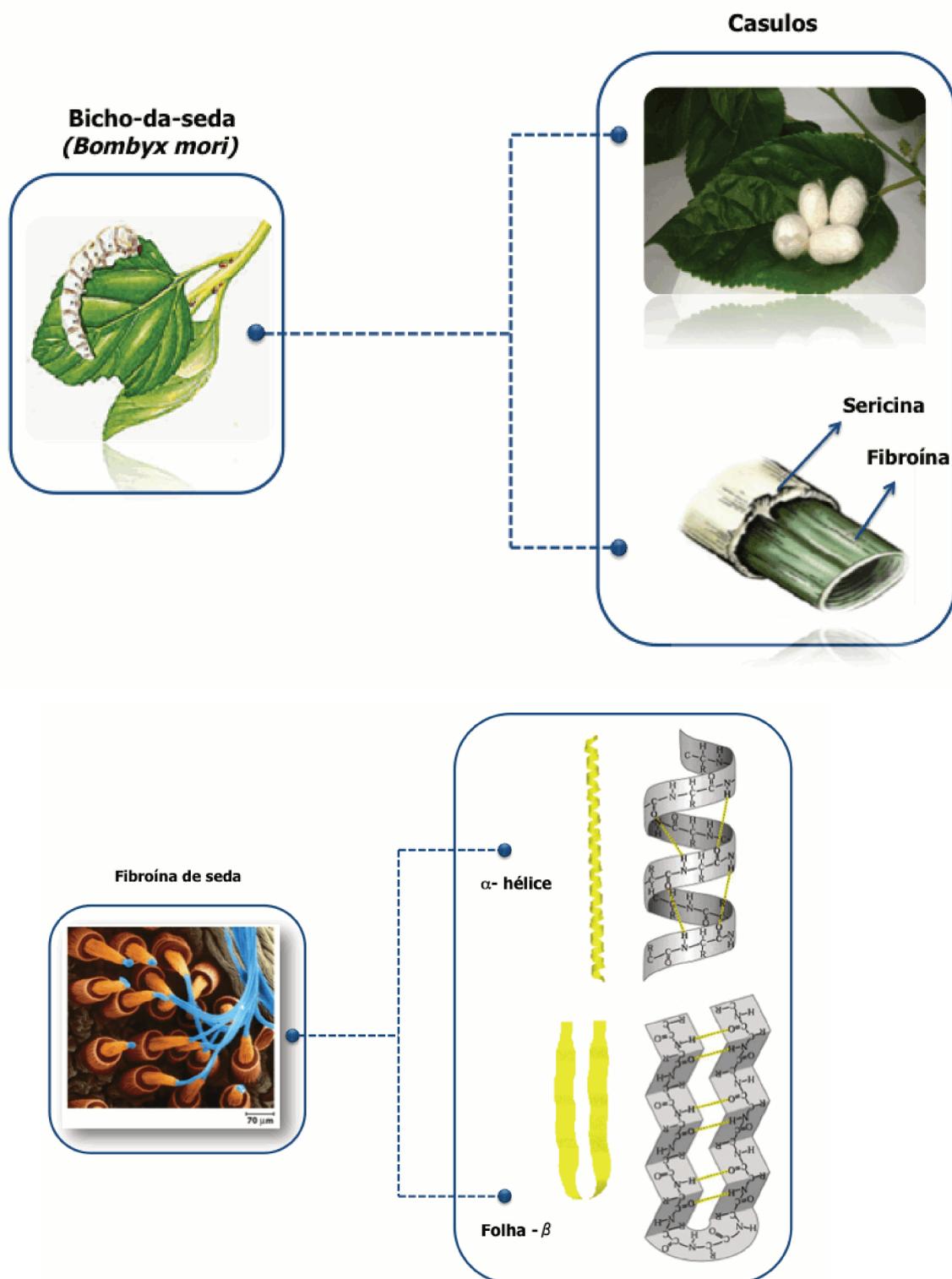
A fibroína de seda (*Silk Fibroin – SF*) derivada da *Bombyx mori* é um biopolímero formado a partir de 5507 aminoácidos e constitui de 70 a 80% da composição do casulo. A fibroína é constituída basicamente por três aminoácidos, glicina (Gly), alanina (Ala) e serina (Ser). Este biopolímero é composto de cadeias leves (25 kDa) e pesadas (350 kDa), que formam regiões cristalinas responsáveis pelas propriedades mecânicas e amorfas que conferem a higroscopicidade das fibras (PAN *et al.*, 2012).

A estrutura seda I é solúvel em água, metaestável, apresenta conformação estrutural do tipo α -hélice e pode ser convertida na estrutura seda II por ação de calor. A forma hidrofóbica e termodinamicamente estável da fibroína é a estrutura seda II, caracterizada por apresentar a conformação folha- β . Este tipo de estrutura apresenta conformação assimétrica, com o predomínio de cadeias laterais de hidrogênio decorrentes dos grupamentos glicina e, outro lado ocupado com cadeias laterais de grupos metil, provenientes das alaninas, que povoam esta região e conferem um domínio hidrofóbico. Fortes ligações de hidrogênio e forças de van der Waals geram uma estrutura termodinamicamente estável na conformação folha- β da fibroína (FIGURA 2.10) (VEPARI ; KAPLAN, 2007).

Durante séculos a fibroína de seda foi utilizada na confecção de tecidos, produção de suturas cirúrgicas e obras de arte (PAN *et al.*, 2012). Nos últimos anos, este polímero versátil tem sido empregado em cosméticos (HARDY; RÖMER; SCHEIBEL, 2008), melhoramento de superfícies de materiais (SRIUDOM *et al.*, 2015) e aplicações bioquímicas (KUNDU, 2013), dentre outras utilizações.

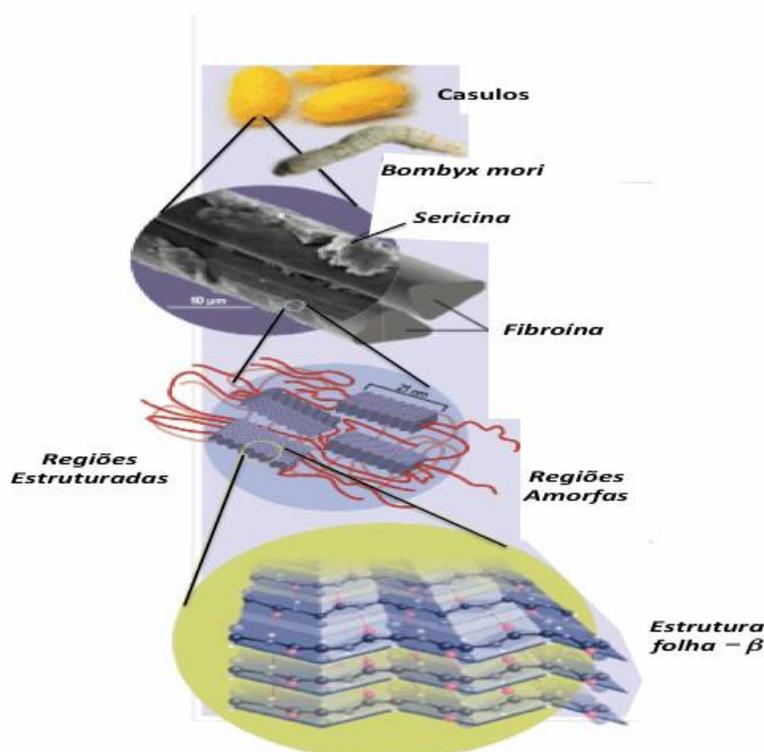
Dois tipos principais de estrutura secundária, denominados de seda I e seda II, estão presentes na fibroína (FIGURA 2.9).

FIGURA 2.9 – BICHO-DA-SEDA DOMESTICADO; CASULOS COM A FIBROÍNA E A SERICINA; ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA FIBROÍNA DE SEDA: α -HÉLICE E FOLHA - β .



FONTE: AUTOR (2016).

FIGURA 2.10 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS REGIÕES AMORFAS CRISTALINAS E ESTRUTURA FOLHA - β . DA FIBROÍNA DE SEDA.



FONTE: Adaptado de CALAFAT *et al.* (2011).

A fibroína de seda tem uma grande quantidade de proteínas com grupos amino ($-\text{NH}_2$) em sua composição, que podem ser explorados como sítios ativos para ligar nanopartículas metálicas e/ou para promover a redução de íons metálicos aos seus respectivos metais, além da estabilização das partículas formadas (SASHINA, 2009). Estas propriedades possibilitaram a utilização deste biopolímero na síntese de nanopartículas metálicas e obtenção de compósitos fibroína/metálico (SASHINA, 2009) (XIA; WANJ, 2011) (UTTAYARAT, 2012).

Na década de 90, foi verificado que a fibroína apresenta propriedades especiais para possíveis aplicações em alimentos, cosméticos, materiais para imobilização enzimática, meio de cultura celular, biossensor, músculo e pele artificial, membranas permeáveis e liberação controlada de fármacos. Em virtude dessas aplicações, a fibroína atraiu um grande interesse em muitos campos da ciência e tecnologia, por exemplo, polímeros, biologia, medicina, materiais, engenharia química e sericultura, etc., e resultou em um surto na pesquisa da proteína da seda. O início das pesquisas entre a fibroína da seda e íons metálicos remonta da década

de 90 e estava relacionada com diversos problemas, tais como a fibrilação da fibroína líquida durante o processo de fiação, fotodegradação, dissolução da fibroína em soluções aquosas de sais metálicos, desodorizante, antibacteriano, retardamento de chama, síntese assimétrica de aminoácidos e reações químicas induzidas por íons metálicos. Ao se avaliar a interação entre a proteína da seda e íons de metais nobres, foi verificado que a fibroína apresenta a propriedade única de propiciar a preparação de partículas metálicas nanocoloidais. As nanopartículas foram preparadas em solução de fibroína por redução *in situ*, à temperatura ambiente, sem a utilização de agentes de redução. A fibroína atuou como agente redutor e estabilizador das nanopartículas formadas. (CHEN *et al.*, 2003).

Aglomerados de nanocristais de prata, que consistiam em grãos policristalinos com diâmetro de 5 nm, foram preparados em fibras de fibroína de seda. Neste trabalho foi utilizada a fibroína como um biotemplate e a redução ocorreu *in situ* à temperatura ambiente. (DONG; SU; ZHANG, 2005).

Em 2008 foi desenvolvida uma técnica biogênica para sintetizar nanopartículas de prata. Estes pesquisadores utilizaram como biotemplate as fibras de fibroína de seda purificada (degumada) e, simultaneamente, obtiveram um nanocompósito de prata/fibroína. A sinergia entre os biotemplates e os materiais inorgânicos representou um avanço significativo, em relação aos outros processos de fabricação, que dependiam da fabricação sequencial para incorporar a funcionalidade em templates pré-organizados, além da utilização de diversos reagentes químicos. Além disso, este novo processo de síntese utilizou a abordagem química verde em todas as etapas de fabricação (DONG *et al.*, 2008).

Um novo tipo de composto híbrido foi produzido com materiais totalmente naturais, biocompatíveis e robustos. Este biomaterial foi obtido a partir da integração de nanoplacas inorgânicas funcionais (argila e nanoplacas de prata) e uma matriz constituída de fibroína de seda, com a utilização da técnica *Layer-by-Layer (LbL)*. O nanocompósito ordenado de fibroína de seda e nanofolhas de argila (montmorilonita) foi utilizado na confecção de filmes em escala nanométrica com alta transparência, propriedades mecânicas com significativa melhora (força, resistência e módulo de elasticidade) em comparação com a fibroína pura. Além disso, a substituição das nanoplacas de argila por nanoplacas de prata ocasionou um aumento nas propriedades mecânicas e a possibilidade de se obter filmes flexíveis nanométricos

refletores, que ofereceu uma nova perspectiva para a fabricação de nanocompósitos biocompatíveis flexíveis para a utilização em fotônica e a exploração óptica desses nanobiocompósitos híbridos (KHARLAMPIEVA *et al.*, 2010).

A biomacromolécula de fibroína de seda foi utilizada na síntese de nanoestruturas de prata dendrítica com a utilização de uma etapa de reação, sem a utilização de outros agentes redutores ou templates. A morfologia e estrutura dos nanodendritos de prata recém-preparados foram caracterizadas e a sua aplicação em Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy – SERS*) foi também investigada. Neste estudo, foi verificado que a morfologia do nanodendrito de prata depende totalmente do tempo de reação e não está relacionada com a concentração dos íons prata. O estudo de *SERS* mostrou que o nanocompósito de prata aumentou a intensidade do espalhamento Raman quando piridina foi utilizada como molécula sonda. Estes resultados mostraram que a fibroína apresentou dupla função: atuou como agente redutor e orientou a formação da estrutura, dirigindo os íons para produzir nanoestruturas com formas organizadas e elevado rendimento (XIA; WANJ, 2011).

A síntese de uma nanoestrutura dendrítica de prata em fase sólida foi efetuada utilizando fibroína de seda como redutor. As nanopartículas de prata produzidas foram depositadas na superfície do vidro para formar um filme 3D (*silvernanodendrite@glass*). Os ânions NO_3^- , Cl^- e SO_4^{2-} foram adicionados no processo de formação do filme para avaliar a influência destas partículas na atividade Raman. O íon Cl^- apresentou o melhor resultado, com a intensificação do espalhamento Raman. A superioridade deste íon foi testada na prática com a análise por *SERS* do princípio ativo Sildenafil, principal componente do Viagra[®]. Além disso, foi analisado o mecanismo de adsorção da glutathione (GSH) sobre o filme através do monitoramento da ligação peptídica (LV *et al.*, 2012).

Fibroína de seda foi utilizada como um biotemplate na síntese de nanopartículas de prata *in situ*, à temperatura ambiente, sob luz incandescente. Como a fibroína, um polímero natural, proporcionou a redução dos íons prata e a estabilização das partículas, não foram utilizados outros reagentes químicos e a luz foi a fonte de energia, essa rota sintética de nanopartículas de prata é muito favorável ao meio ambiente e proporciona economia de energia. O nanocompósito de prata/fibroína preparado por este método mostrou ser bastante estável à

temperatura ambiente e exposição à luz, durante um mês. Este nanobiocomposto apresentou também atividade antibacteriana, mostrando muito eficiência contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ao inibir a formação do biofilme causada pela bactéria (FEI *et al.*, 2013).

Um método simples, baseado em química verde, foi utilizado para a síntese de nanopartículas de metais nobres (ouro, prata, paládio e platina) com fibroína de seda modificada com tiol (SF-SH). A incorporação dos grupamentos tiol na fibroína produziu nanopartículas metálicas monodispersas e com boa estabilidade coloidal. Os scaffolds produzidos a partir de fibroína modificada com tiol e ouro (Au-SF-SH) foram eficientes na reação de redução catalítica do p-nitrofenol na presença de NaBH_4 (catálise heterogênea). O filme de fibroína modificada com tiol e prata (Ag-SF-SH) apresentou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* (*E. coli*) (DAS; DHAR, 2014).

Atualmente, a fabricação de nanopartículas de prata (*NPsAg*) em seda modificada para aplicação antibacteriana é um dos tópicos mais importantes na pesquisa de materiais têxteis. No entanto, a síntese de *NPsAg* em fibras de seda com a fibroína atuando como agente redutor e matriz 3D ainda não havia sido realizada. Uma fácil rota de preparação, eficiente e com a utilização dos princípios de química verde foi utilizada no crescimento, *in situ*, de *NPsAg* em fibroína de seda funcionalizada com polidopamina (PDA). As *NPsAg* exibiram estruturas cúbicas de face centrada cristalinas, com tamanho de partícula entre 30-90 nm e alta densidade de nanopartículas distribuídas sobre a fibroína. As nanopartículas inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), na fibroína funcionalizada com polidopamina, mesmo a um longo período de tempo (252 h) (LU *et al.*, 2015).

Nanopartículas de prata foram sintetizadas *in situ*, à temperatura ambiente e com radiação gama, em solução aquosa de fibroína de seda obtida a partir de casulos do bico-da-seda domesticado *Bombyx mori*. A formação das nanopartículas foi confirmada pela banda plasmon característica em 424 nm, observado no espectro UV-visível obtido para as mesmas. Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering – DLS*) indicaram que o tamanho da partícula formada em solução depende da dose de radiação gama utilizada na síntese. Imagens das *NPsAg*, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron*

Microscopy – TEM), mostraram que as nanopartículas apresentavam formas esféricas. Análises de difração de raios-X confirmaram a fase nanocristalina da prata com estrutura cristalina de fase centrada (FCC). Neste estudo foi observado também que ocorreu a diminuição do tamanho da partícula formada e o aumento da velocidade de redução com o aumento da dose de radiação. O ajuste da dose de radiação gama pode controlar o tamanho das nanopartículas de prata sintetizadas (MADHU *et al.*, 2015).

Layer-by-Layer (LbL) é uma técnica versátil para a preparação de filmes poliméricos em camadas, porém não é utilizada na fabricação de filmes de fibroína com nanopartículas de prata reduzidas *in situ*. Os polímeros poli(ácido acrílico) (PAA)/poli(cloreto de dimetildialilamônio) (PADA) foram depositados sobre a fibroína de seda por LbL e, posteriormente, este material atuou como matriz 3D para a síntese *in situ* de *NPsAg*. Após 8 ciclos de deposição *LbL*, a fibroína de seda foi totalmente recoberta com uma camada de filme polimérica e, *NPsAg* com estruturas cristalinas foram sintetizadas *in situ*. Este novo material apresentou atividade antimicrobiana e, conseqüentemente, torna-se viável a sua potencial aplicação na indústria têxtil (MENG *et. al.*, 2016).

Nanodendritos de prata foram sintetizados a partir de fibroína de seda e as partículas obtidas foram aplicadas como substrato em Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy - SERS*) (XIA; WANJ, 2011). A preparação de um compósito de nanopartículas de prata (***NPsAg***) suportada em uma matriz de fibroína e a atividade antimicrobiana deste material na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi relatada na literatura anteriormente (UTTAYARAT, 2012).

Apesar da síntese do compósito fibroína/prata já ter sido efetuada anteriormente, existem poucos estudos que exploram a relação entre as propriedades deste material, por exemplo, as propriedades plasmônicas e os parâmetros de síntese (pH, agitação e temperatura). Esta relação é uma importante questão, uma vez que a fibroína de seda pode apresentar diferenças em suas propriedades mecânicas e os grupos constituintes da composição química dependentes da sua origem têm sido relatados na literatura anteriormente (COLOMBAN, 2012).

O presente trabalho foi focado em investigar as propriedades plasmônicas do compósito fibroína/prata e a sua dependência sobre os parâmetros experimentais de síntese. Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-vis) foi a técnica experimental utilizada para investigar a evolução da banda *plasmon*. Além disso, as morfologias e composições químicas dos compósitos fibroína/prata foram investigadas, respectivamente, por Microscopia Eletrônica de Varredura (*Scanning Electron Microscopy – SEM*) e Espectroscopia de Raios-X de Energia Dispersiva (*Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy – EDS* ou *EDX*). Outro foco do trabalho foi a preparação de um bionanocompósito gelatina/prata. A banda *plasmon* foi investigada por Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-vis), as morfologias por Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy – TEM*). A atividade antimicrobiana do compósito gelatina/NPsAg foi investigada na bactéria *B. subtilis* e em *E. coli*.

2.2.9 GELATINA

A gelatina é um biopolímero natural extraído a partir da hidrólise do colágeno e apresenta boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. Gelatina e colágeno são formas diferentes da mesma macromolécula; podendo-se descrever a gelatina como colágeno hidrolisado (VASIREDDY *et al.*, 2012).

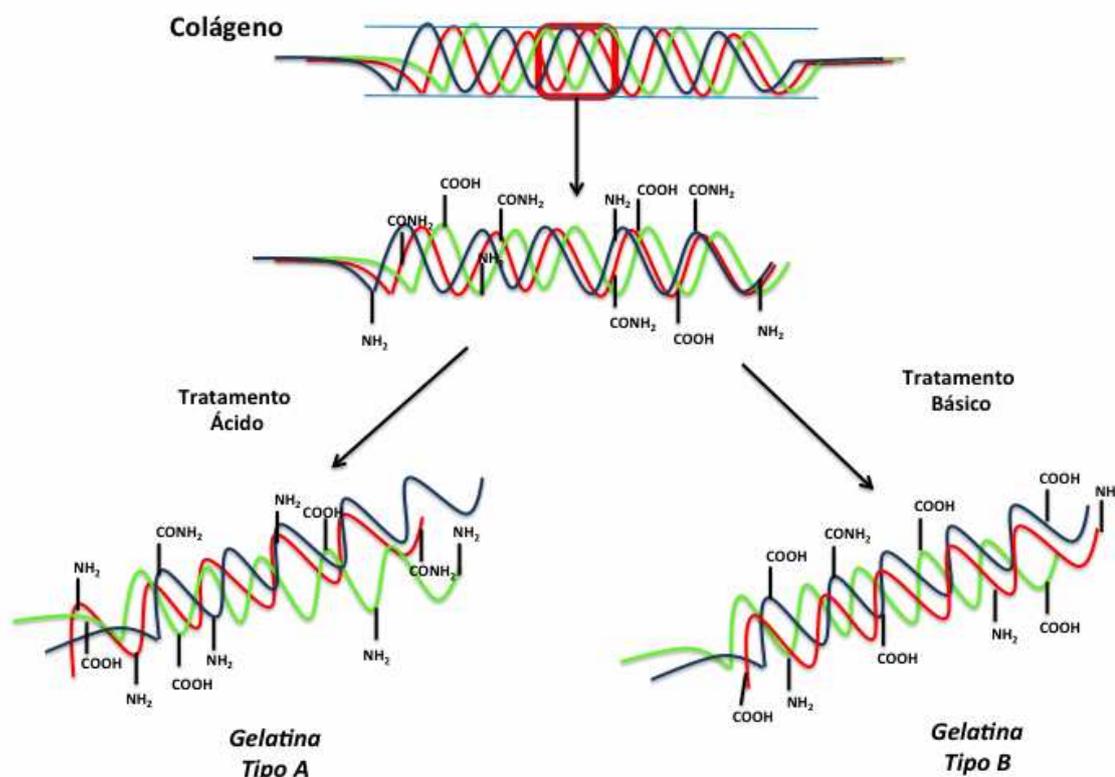
A composição da gelatina é de 50,5% de carbono, 6,8% de hidrogênio, 17% de nitrogênio e 25,2% de oxigênio. A gelatina é um biopolímero derivado de colágeno – uma proteína fibrosa insolúvel – e a composição química do colágeno varia de acordo com a sua origem. O colágeno é obtido, por denaturação química, a partir de ossos, pele e tecido conjuntivo. No colágeno as moléculas são dispostas em fibras, com uma estrutura rígida parecida com uma “barra”, interconectadas por ligações covalentes. Estas moléculas têm três cadeias polipeptídicas dispostas em uma tripla hélice e estabilizadas por ligações de hidrogênio. A particular estrutura da tripla hélice é decorrente da repetição da sequência: Gly – X – Y (Glicina – Prolina – Hidroprolina (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

Dois tipos de gelatina são vendidas comercialmente, gelatina tipo A (ponto isoelétrico em pH ~ 8-9) e gelatina tipo B (ponto isoelétrico em pH ~ 4-5). O

procedimento de pré-tratamento utilizado na preparação industrial é que determina o tipo de gelatina obtida, tipo A em condições de pré-tratamento ácidas e tipo B, em condições básicas (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

O pré-tratamento ácido ou alcalino da matéria-prima envolve a hidrólise controlada da estrutura organizada do colágeno na obtenção da gelatina solúvel; seguida da desnaturação térmica do material. Alguns fatores, por exemplo, aumento de temperatura, mudança de pH e utilização de substâncias químicas podem causar a desnaturação da fibroína. A desnaturação é um processo que causa a destruição da estrutura tridimensional da proteína. Na desnaturação térmica o colágeno é quebrado em diversos fragmentos e as triplas hélices são separadas, devido à destruição das ligações de hidrogênio. O tamanho das cadeias polipeptídicas e as propriedades funcionais da gelatina podem ser influenciados pelos parâmetros de extração e o tipo de pré-tratamento químico utilizado (HANANI *et al.*, 2014).

FIGURA 2.11 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA EXTRAÇÃO DA GELATINA A PARTIR DO COLÁGENO.



FONTE: Adaptado de MEDGADGET (2015).

A gelatina é amplamente utilizada em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos em decorrência de suas propriedades funcionais intrínsecas. Na indústria alimentícia a gelatina é utilizada para proporcionar gelificação, texturização, estabilização e emulsificação em diversos produtos. No setor farmacêutico, a gelatina é utilizada na confecção de cápsulas duras e moles, expansores de plasma, curativos e emulsões.

A utilização de gelatina como agente de “cobertura” e glicose como agente redutor na preparação de soluções aquosas de nanopartículas de prata é muito interessante por dois aspectos, não utiliza solventes orgânicos na síntese e não gera substâncias tóxicas poluentes como produtos da reação. Além disso, as *NPsAg* produzidas na matriz de gelatina são biologicamente compatíveis. Esses aspectos tornam a preparação de *NPsAg* em matriz de gelatina uma síntese verde muito interessante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No Capítulo 3 são apresentados os materiais utilizados em toda a pesquisa. Além disso, a purificação da fibroína e as síntese dos bionanocompósitos de fibroína/NPsAg e gelatina/NPsAg são descritas, bem como os métodos empregados na caracterização dos nanocompósitos produzidos. Finalmente são apresentados os ensaios de atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata.

3.1 MATERIAIS

Nitrato de prata [AgNO₃] (grau ACS), carbonato de sódio anidro [Na₂CO₃] (99%), cloreto de cálcio [CaCl₂] (93%), etanol [H₃C-CH₂OH] (grau ACS) e Glicose (grau ACS) foram adquiridos da Sigma Aldrich e utilizados sem purificação prévia.

Fibroína da seda foi extraída a partir de casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori* (fibroína virgem). As amostras de casulos foram gentilmente doadas pela Fiação Bratac (Bastos, Brasil).

Gelatina comercial. Hidróxido de sódio [NaOH] foi adquirido da Synth. Todas as soluções aquosas foram preparadas em água com ultrapureza, produzida em um sistema de filtração de água Millipore Milli-Q™ (18,2 MΩ).

Sulfato de magnésio [MgSO₄ (2 mol.L⁻¹)], bicarbonato de sódio [NaHCO₃ (4 mol.L⁻¹)], cloreto de potássio [KCl (0,5 mol.L⁻¹)], cloreto de cálcio [CaCl₂ (1,27 mol.L⁻¹)], cloreto de sódio [NaCl (0,07 mol.L⁻¹)], hidrogenofosfato de sódio [Na₂HPO₄ (47 mol.L⁻¹)] e diidrogenofosfato de potássio [KH₂PO₄ (0,04 mol.L⁻¹)] adquiridos da Synth.

Para as medidas de Atividade antimicrobiana foi utilizado o meio de Mueller Hinton (Sigma Aldrich) e Streptomina.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 FIBROÍNA DE SEDA

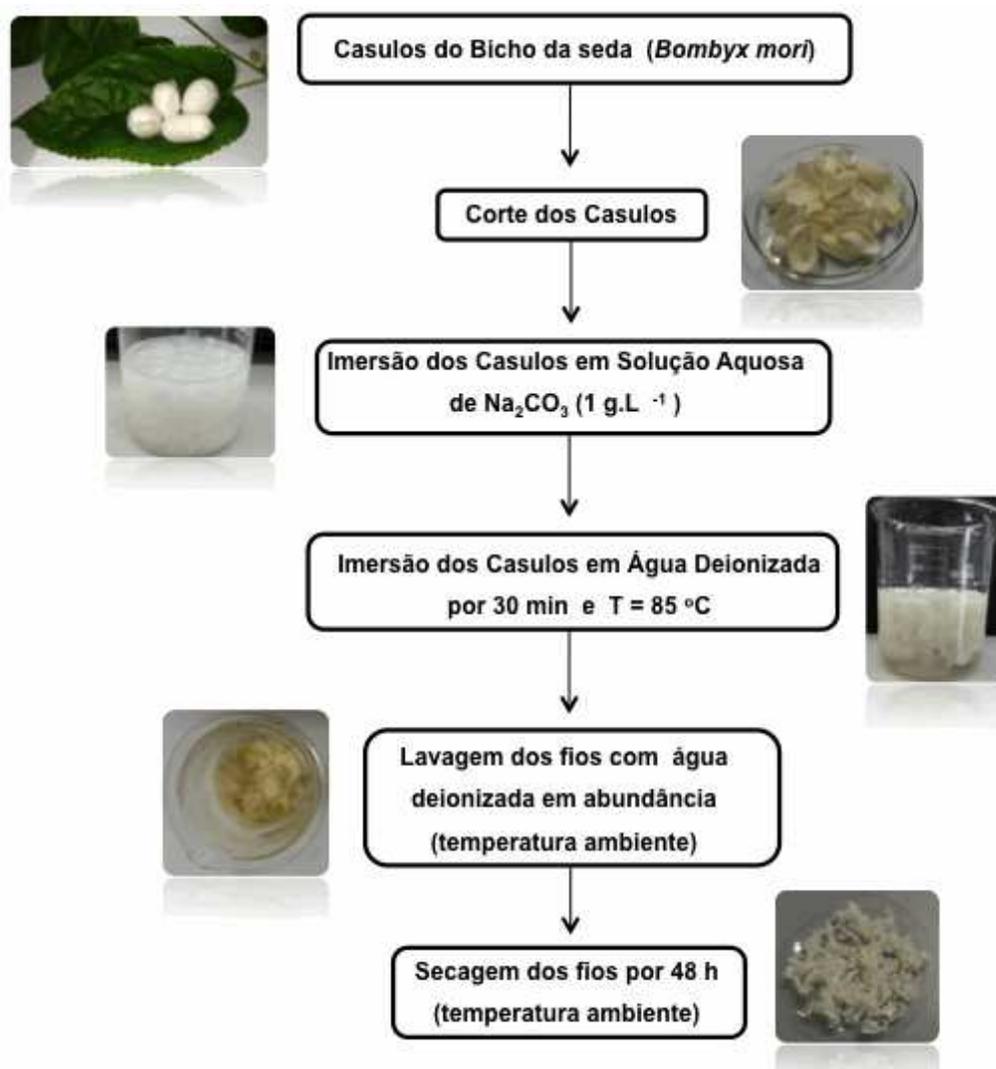
3.2.2 PREPARAÇÃO DOS CASULOS DO BICHO-DA-SEDA *Bombyx mori*

Fibroína da seda foi extraída a partir de casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori* (fibroína virgem). As impurezas que estavam dentro dos casulos (restos do bicho-da-seda) foram removidas com um pinça e, em seguida, os mesmos foram cortados em pedaços de 2 x 2 cm.

3.2.3 REMOÇÃO DA SERICINA

Os casulos do bicho-da-seda foram colocados em um Béquer e lavados com água destilada para a remoção de impurezas. Em seguida, 50 g de casulos foram pesados e adicionados em 600 mL de solução aquosa de Na_2CO_3 (1 g.L^{-1}), a 85°C e por um período de 30 minutos. Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes e, ao final, os fios foram lavados abundantemente com água destilada. O excesso de água foi removido manualmente com a torsão dos fios e, com o auxílio de uma pinça, os mesmos foram esticados. Para a secagem os fios foram acondicionados em vidros de relógio e secos à temperatura ambiente ($25\text{-}28^\circ\text{C}$) por 48 h (LI *et al.*, 2002). O esquema que mostra todo o processo de remoção da sericina é mostrado na FIGURA 3.1.

FIGURA 3.1 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE REMOÇÃO DA SERICINA.



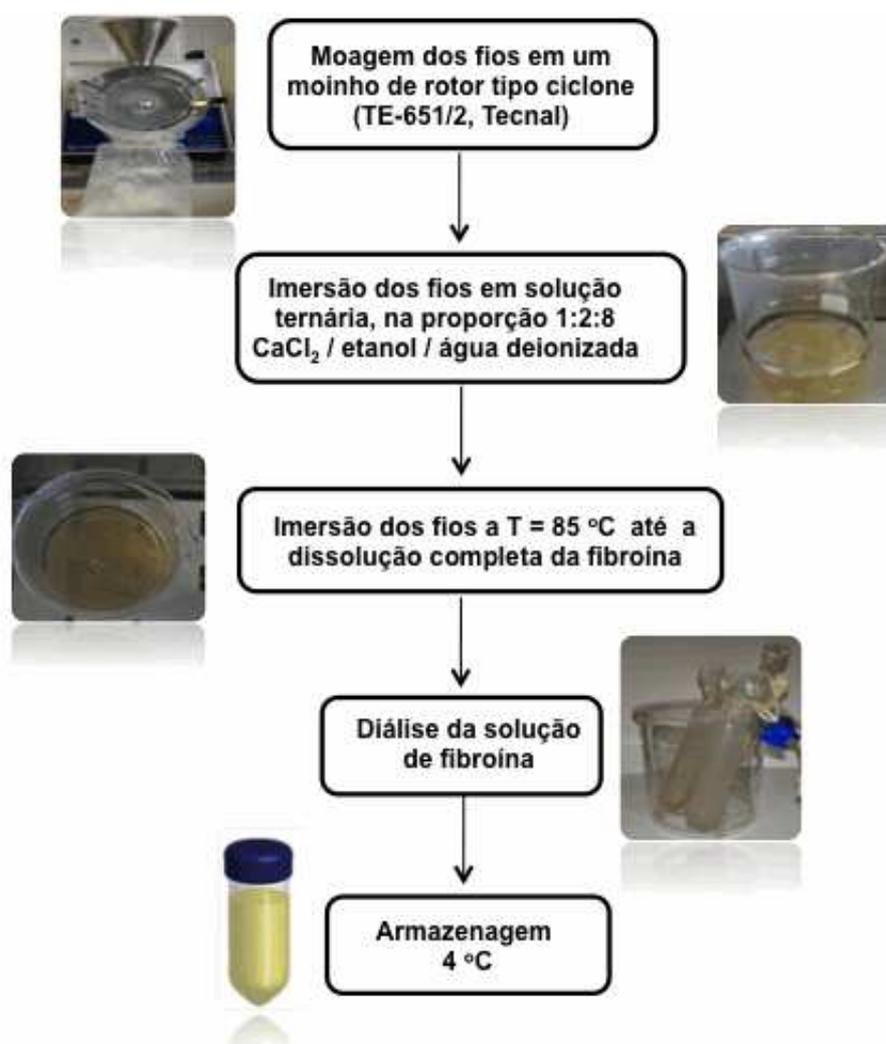
FONTE: AUTOR (2016).

3.2.4 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AQUOSA DE FIBROÍNA DE SEDA

As fibras secas e livres de sericina foram moídas em um moinho de facas com rotor tipo ciclone (modelo TE-651/2, Tecnal) e peneira com mesh nº10 (partícula de 2 mm de diâmetro). Após a moagem foram obtidas microfibras de fibroína padronizadas, que facilitaram a dispersão em solução aquosa. A cada 10 g de fios moídos foram adicionados 100 mL de solução ternária de CaCl_2 / $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$ / H_2O na proporção 1:2:8 mol.L⁻¹. A dispersão salina de fibroína foi dialisada em água deionizada por 72h com membranas de celulose (3500 MWCO) de 16 mm de

espessura. O sistema de diálise foi mantido na geladeira a 8°C, e a água de diálise foi trocada a cada 24h, na proporção volumétrica 1:15 (v/v) fibroína/água deionizada. A suspensão resultante foi mantida à temperatura de 85 °C, em banho termostático, até a completa dissolução dos fios da seda (tempo de 1h:30min). A solução foi esfriada até temperatura ambiente e armazenada em geladeira (LI et al, 2002). O esquema que mostra todo o processo de dissolução da fibroína da seda é mostrado na FIGURA 3.2.

FIGURA 3.2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE DISSOLUÇÃO DA FIBROÍNA DE SEDA.



FONTE: AUTOR (2016).

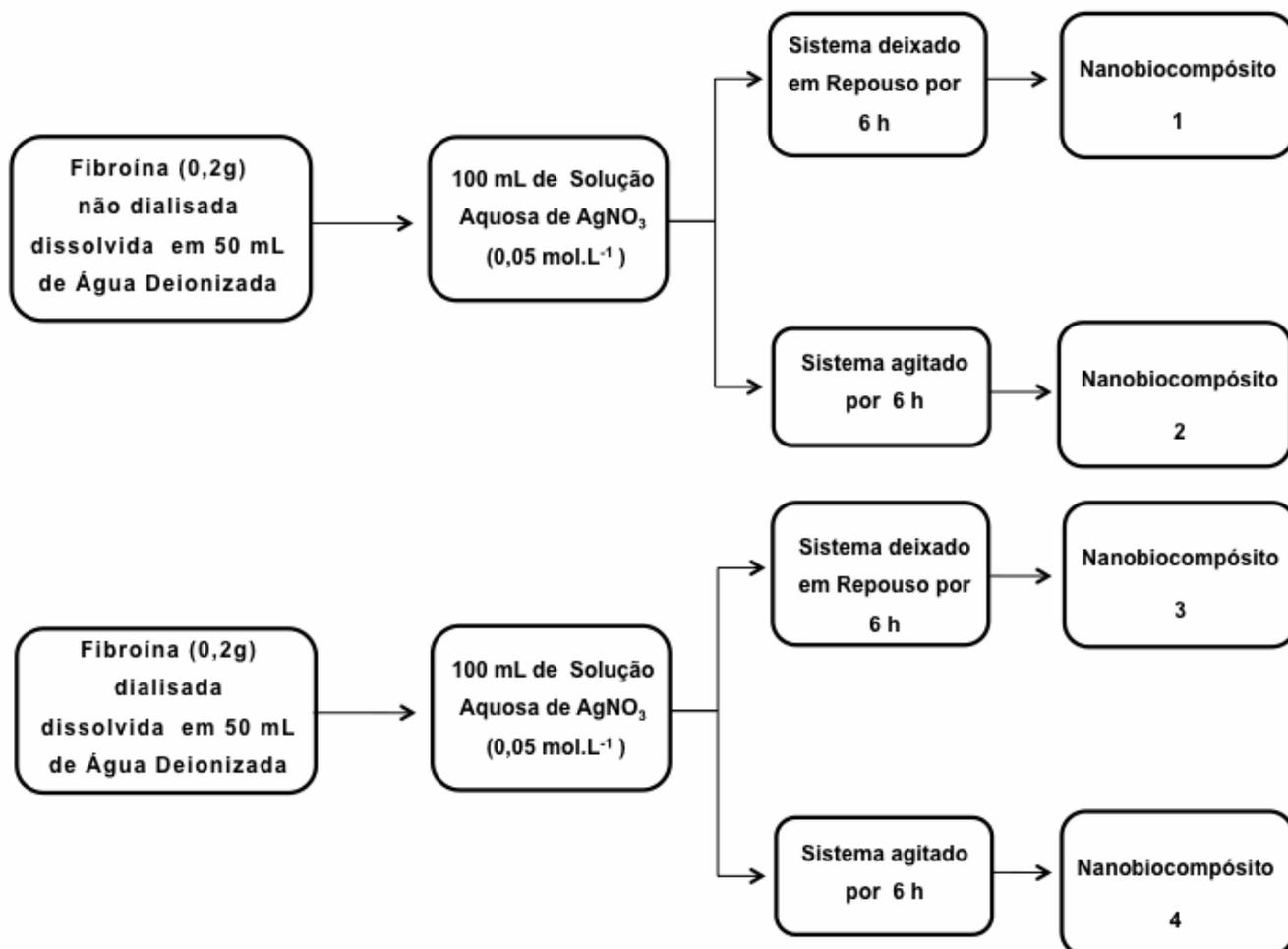
3.2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FIBROÍNA DE SEDA

A solução estoque de albumina bovina (1 mg.mL^{-1}) foi preparada em tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline – PBS*) (pH 7,4). A partir da solução estoque foram preparadas por diluição, as seguintes concentrações: $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foram coletados $5 \mu\text{L}$ de cada solução de Albumina de Soro Bovina (*Bovine Serum Albumin – BSA*) e adicionados (em triplicatas) à microplaca. Para o branco foi adicionado $5 \mu\text{L}$ de tampão fosfato salino. Em seguida $250 \mu\text{L}$ do Reagente de Bradford foram adicionados em cada poço da microplaca. As amostras (branco e fibroína de seda) foram incubadas à temperatura ambiente por um período de 15 minutos e as medidas das absorbâncias das soluções foram efetuadas em um Espectrofotômetro de Microplacas Thermo Scientific Multiskan GO™ (comprimento de onda de 595 nm).

3.2.6 SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/NPsAg

O bionanocompósito fibroína-*NPsAg* foi sintetizado de acordo com o procedimento publicado previamente, porém com algumas modificações, por exemplo, diálise e agitação (XIA; WANJ, 2011). As etapas empregadas na síntese das amostras do bionanocompósito estão representadas na FIGURA 3.3.

FIGURA 3.3 – FLUXOGRAMA COM OS PARÂMETROS E ETAPAS EMPREGADAS NA SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO



FONTE: AUTOR (2016).

3.2.7 CARACTERIZAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/NPsAg

Medidas Raman foram efetuadas em um *Espectrômetro Raman Confocal Jobin-Yvon T64000*, resfriado com N₂ líquido, acoplado a um detector CCD e um microscópio. A fonte de excitação foi um laser a 633 nm. A potência do laser na superfície da amostra foi cerca de 1,0 mW. O laser foi focalizado com lente objetiva focal 100x para o spot de 1 μm. Todos os espectros Raman foram coletados utilizando um tempo de exposição ao laser de 60 s, com duas acumulações.

Um *Espectrofotômetro Agilent Cary probe 50* foi utilizado na obtenção de espectros ultravioleta-visível (UV-Vis) dos coloides fibroína/NPsAg. Imagens dos

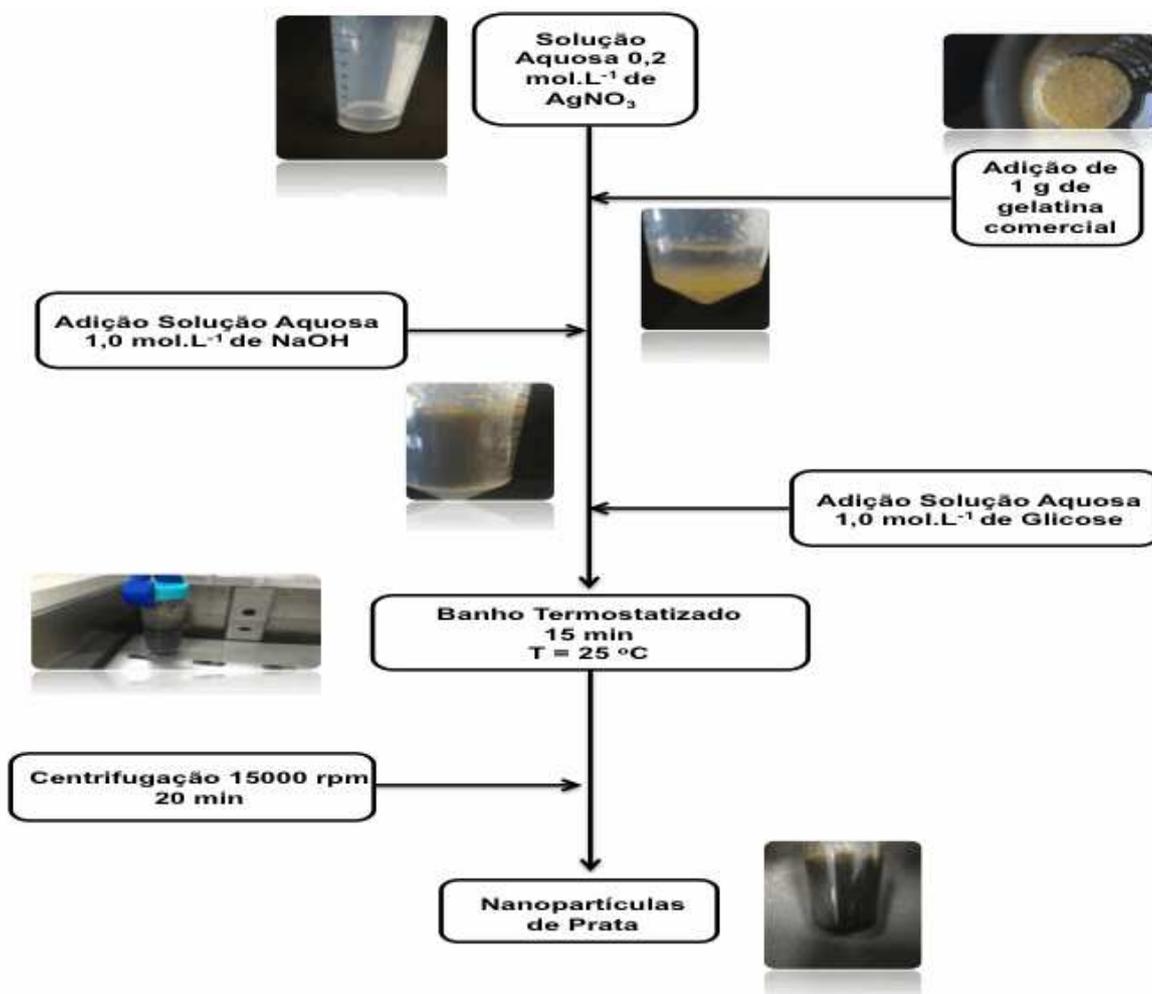
nanocompósitos foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (*Scanning Electron Microscopy – SEM*). Um microscópio Modelo *Inspect*, com Emissão de Campo, foi utilizado na obtenção das imagens de *SEM* com voltagem de aceleração de 15 kV. Antes das análises, as amostras foram depositadas em slides de vidro, utilizados como suportes, e coberta com uma fina película de carbono. A Espectroscopia de Raios-X de Energia Dispersiva (*Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy – EDS*) foi utilizada em análises elementares de amostras do bionanocompósito Fibroína/*NPsAg*.

3.2.8 SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/*NPsAg*

Em um tubo Falcon foram adicionados 10 mL de uma solução aquosa de AgNO_3 ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) e 1g de gelatina. Em seguida, neste mesmo tubo foram adicionados 10 mL de uma solução aquosa de NaOH ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$). O tubo Falcon foi mantido em banho termostatizado a uma temperatura de 25°C e foram adicionados 10 mL de solução aquosa de glicose ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$). A reação ocorreu por um período de 15 min. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 15000 rpm em uma centrífuga Sorvall™ RC 6 Plus Centrifuge, por um intervalo de tempo de 20 min.

O fluxograma da síntese do bionanocompósito gelatina/*NPsAg* é mostrado na FIGURA 3.4.

FIGURA 3.4 – FLUXOGRAMA COM OS PARÂMETROS E ETAPAS EMPREGADAS NA SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/NPsAg.



FONTE: AUTOR (2016).

3.2.9 CARACTERIZAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/NPsAg

Um *Espectrofotômetro de Microplacas Thermo Scientific Multiskan GO™* foi utilizado na obtenção de espectros ultravioleta-visível (UV-vis) dos bionanocompósito gelatina/NPsAg.

A estabilidade coloidal das NPsAg foi avaliada com medidas de espalhamento de luz (*Dynamic Light Scattering – DLS*) e para isso foi utilizado um equipamento ZetaSizer Nano ZS. O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersidade foram medidos no início e no final do ensaio por DLS. Para assegurar a reprodutibilidade e a homogeneidade das medidas de DLS foram

efetuadas três medidas independentes, com três repetições consecutivas, considerando os critérios de qualidade: atenuador, taxa de contagem, correlograma e variação entre as medidas. As medidas de Potencial Zeta (*Zeta Potencial – ZP*) foram efetuadas por espalhamento de luz eletroforético (*Electrophoretic Light Scattering – ELS*). Nas medidas de DLS e ELS, as concentrações e tempos de medidas foram adequados aos ensaios de toxicidade. Para essas medidas foram preparadas as seguintes soluções: **GNG** (Gelatina/NaOH/Glicose), **G** (Gelatina) e **G/NPsAg** (nanopartículas de prata/Gelatina). Todas as soluções foram preparadas com diluições de 10 vezes, em água com ultrapureza (Milli-Q™) e, as medidas foram efetuadas em triplicatas.

O Diâmetro Hidrodinâmico e o Potencial Zeta das *NPsAg*, em meio de cultura para embriões de Zebrafish (*Danio rerio*), foi também avaliada com medidas de espalhamento de luz (*Dynamic Light Scattering – DLS*). O meio de cultura foi preparado com a adição dos seguintes sais em água ultrapura (Milli-Q™): sulfato de magnésio [MgSO_4 (2 mol.L⁻¹)], bicarbonato de sódio [NaHCO_3 (4 mol.L⁻¹)], cloreto de potássio [KCl (0,5 mol.L⁻¹)], cloreto de cálcio [CaCl_2 (1,27 mol.L⁻¹)], cloreto de sódio [NaCl (0,07 mol.L⁻¹)], hidrogenofosfato de sódio [Na_2HPO_4 (47 mol.L⁻¹)] e dihidrogenofosfato de potássio [KH_2PO_4 (0,04 mol.L⁻¹)]. Essa solução é denominada água reconstituída (*Moderately Hard Reconstituted Water – MHRW*).

O tamanho das nanopartículas de prata sintetizadas foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy – TEM*).

As amostras foram preparadas em grades de cobre – *Ultrathin Carbon on a Lacey Carbon Type A 400 mesh copper grid* (TedPella, USA). As amostras foram submetidas ao procedimento de GlowDischarge em um equipamento EasiGlow (Pelco, USA) com os seguintes parâmetros experimentais: 15 mA de corrente elétrica; carga negativa e 25 segundos de descarga. Cerca de 3 µL da amostra de *NPsAg* (diluída 10 vezes) foi aplicada na grade de cobre e após 60 segundos, o excesso de amostra foi removido com papel de filtro convencional.

As imagens das *NPsAg* foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1400 PLUS (JEOL, Japão), operando a 120 kV com filamento de LaB6, utilizando uma câmera CCD Gatan MultiScan (1k x 1k pixels).

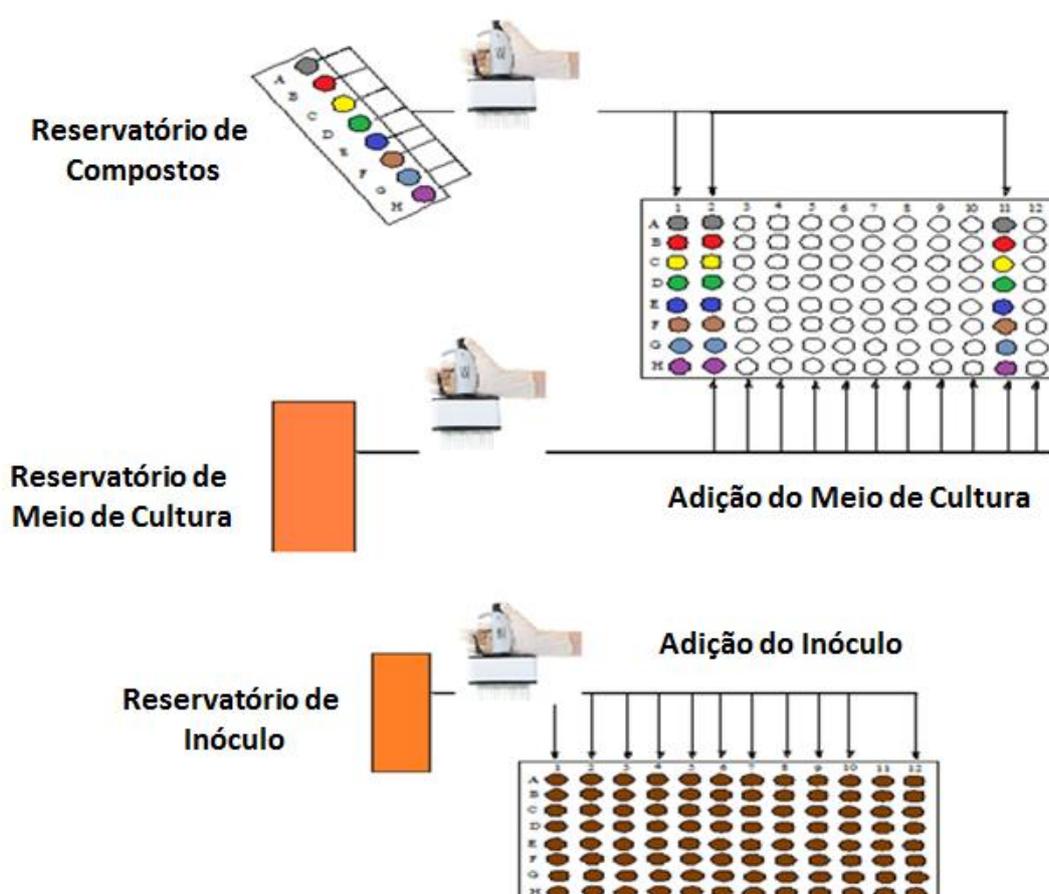
3.2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/NPsAg

3.2.10.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A atividade antimicrobiana dos compostos obtidos foi determinada utilizando o método de microdiluição seriada conforme as normas padronizadas pela *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007)*.

As microplacas de 96 poços, fundo chato, foram divididos em 12 colunas e 8 linhas (A-H) e reservatório de armazenamento de compostos, conforme mostrado na FIGURA 3.5.

FIGURA 3.5 – ESQUEMA DAS MICROPLACAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.



Nas colunas 1, 2 e 11 foram adicionados 100 μL da solução das *NPsAg* (linhas A a F), 100 μL de Streptomicina, na concentração de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, na linha G e 100 μL do controle de solvente (água em meio CAMHB/RPMI) na linha H. Após esta distribuição foi adicionado mais 100 μL de meio de cultura em todas as colunas, com exceção da coluna 1 (FIGURA 3.5). Desta forma foi processada a diluição seriada iniciando na coluna 2. Cada poço foi homogeneizado, retirando 100 μL e transferindo este volume para a coluna 3. Após homogeneização, 100 μL foram novamente transferidos para a coluna 4, e assim sucessivamente até a coluna 10, que após homogeneização, foram descartados 100 μL . Foi adicionado 100 μL de inóculo em todas as colunas, com exceção da coluna 11 (controle negativo do teste) (FIGURA 3.5). As microplacas foram vedadas, homogeneizadas e incubadas a 35 $^{\circ}\text{C}$, por 18 a 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.2.10.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para preparação do inóculo foram escolhidas cinco colônias de bactérias, com diâmetro aproximado de 1 mm, após cultura de 24 horas em meio de cultura apropriado para seu crescimento. As colônias foram colhidas com o auxílio de *swab* estéril, suspensas em 4 mL de *caldo Mueller-Hinton com ajuste de cátions (CAMHB)* e agitada por 15 segundos em agitador tipo vórtex.

Sua densidade celular foi ajustada com espectrofotômetro UV-vis por acréscimo de meio *CAMHB* suficiente para obter-se transmitância equivalente à solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 625 nm. Esta suspensão apresenta concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC mL^{-1} como preconizada pela norma M100-S17 da CLSI (CLSI, 2007).

Cerca de 1,0 mL desta suspensão foi transferida para um frasco contendo 99,0 mL de solução fisiológica esterilizada, com barra magnética e pérolas de vidro esterilizados, gerando uma suspensão de concentração $1,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} . A mistura foi agitada por 15 minutos e 1,0 mL desta suspensão foi transferida para um frasco contendo 99,0 mL de meio CAMHB, com barra magnética e pérolas de vidro esterilizados, gerando suspensão de $1,0 \times 10^4$ UFC mL^{-1} . Esta suspensão foi mantida em agitação por 15 minutos e, posteriormente utilizada nos ensaios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste Capítulo são apresentados e discutidos os resultados da síntese da nanopartículas na fibroína de seda e na gelatina. Inicialmente é apresentada a síntese e caracterização do bionanocompósito fibroína/NPsAg e, em seguida, a síntese, caracterização e atividade antimicrobiana do bionanocompósito fibroína/NPsAg.

4.1 SÍNTESE DAS NPsAg EM SOLUÇÃO AQUOSA DE FIBROÍNA DE SEDA

A eficiência do processo de purificação (remoção da sericina) dos casulos da fibroína de seda (processo de degomagem) foi avaliada através do cálculo da **taxa de degomagem (D_r)** e para isso foi utilizada a equação 4.1.

$$D_r = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (4.1)$$

onde: M_i = massa iniciais das amostras (antes da remoção da sericina); M_f = massas das fibras de casulo (após a remoção de sericina).

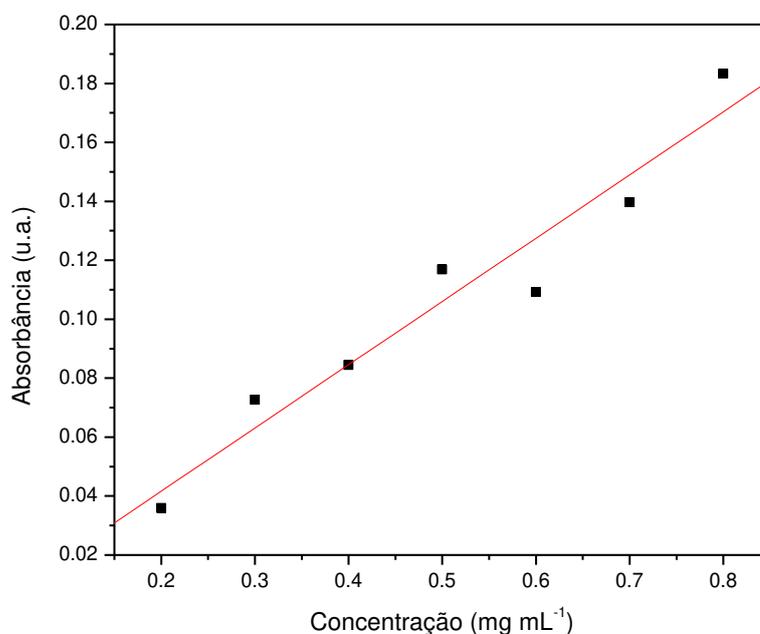
Os casulos submetidos aos tratamentos de remoção da sericina apresentaram porcentagens de purificação (taxas de degomagem) de 25%.

A solução de fibroína de seda apresentou um aspecto viscoso após o tratamento com a solução ternária. A solução de fibroína de seda aquosa dialisada (solução de fibroína de seda regenerada dialisada contra água deionizada) ficou estável até 1 semana (armazenada a 4 ° C). A estabilidade da solução de fibroína é diretamente proporcional à concentração de proteínas e também às condições de armazenamento, por exemplo: temperatura, pH, sonicação, etc.

A concentração da solução aquosa de fibroína de seda foi determinada pelo Método de Bradford, um ensaio colorimétrico para a determinação total de proteína. Este método baseia-se na mudança de absorbância do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 que se ligou à fibroína, mais especificamente aos seus resíduos de aminoácidos e às bases aromáticas. A ligação do corante à fibroína induziu a conversão do corante para uma forma estável não protonada, de coloração azul e com máximo de absorção a 595nm. Esta forma desprotonada foi detectada

espectrofotometricamente e a concentração da fibroína foi determinada através da construção da curva de calibração mostrada na Figura 4.1.

FIGURA 4.1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FIBROÍNA.



A regressão linear da curva mostra da acima forneceu a seguinte equação:

$$y = -0,00129 + 0,21462 \cdot X \quad (4.2)$$

A partir da equação 4.2 foi determinada a concentração da fibroína, obtendo-se um valor de 0,71 mg.mL⁻¹.

A fibroína da seda é composta de 18 tipos de aminoácidos, dentre eles a glicina (*Gly*, 44,60%, em mol), a alanina (*Ala*, 29,40%, em mol) e a serina (*Ser*, 12,10%, em mol). Eles se arranjam em segmentos da cadeia relativamente ordenados e segundo certas sequências, e a maioria destas cadeias estão localizadas na região cristalina da fibroína. Por outro lado, a tirosina (*Tyr*, 5,17%, em mol), a fenilalanina (*Phe*, 29,40%, em mol) e o triptofano (*Trp*, 29,40%, em mol) estão localizados em regiões não cristalinas. Os resíduos *Tyr* atuam como agentes redutores dos íons Ag⁺ e, embora os resíduos de serina contenham grupos – OH, eles participam na redução de partículas metálicas apenas em temperaturas elevadas (YU *et al.*, 2012).

Os aminoácidos constituintes da fibroína da seda não apresentam grupos polares ativos carboxila ($-COOH$), amino ($-NH_2$) e tiol ($-SH$) nas suas cadeias laterais e a sua interação com a superfície da nanopartículas de prata é relativamente fraca. Consequentemente não é possível ocorrer a adsorção eficaz da fibroína na superfície das *NPsAg*, efetuar o controle da velocidade de crescimento do cristal e da agregação das nanopartículas. O aumento da densidade de grupos hidroxila ($-OH$) na fibroína aumenta a atividade de redução das moléculas de proteína. Isto sugere que a tirosina e a serina são agentes redutores suaves, em detrimento do ácido L-ascórbico ($C_6H_8O_6$), boroidreto ($NaHB_4$) e hidrazina (N_2H_4), que são agentes redutores fortes e tornam difícil o controle da velocidade de redução. A oxidação dos grupos $-OH$ conduz à formação de grupamentos carboxílicos ($-COOH$) responsáveis pelo aumento da interação entre a fibroína e as *NPsAg*. Portanto, a síntese das *NPsAg* utilizando a própria fibroína como agente redutor é fundamental para o crescimento e estabilização das partículas, que foi um dos objetivos deste trabalho.

Na síntese das *NPsAg* o pH da mistura reacional foi mantido em 8,5. O meio reacional alcalino auxiliou a reação prevenindo a agregação da fibroína. Além disso, o pH básico aumentou o poder de redução do resíduo de tirosina presente na fibroína; a fração fenólica da tirosina ficou na forma ionizada e proporcionou uma maior densidade de eletrônica para a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do resíduo de tirosina. Essa maior densidade eletrônica resultou em uma transferência de elétrons energeticamente favorável da tirosina para o íon metálico.

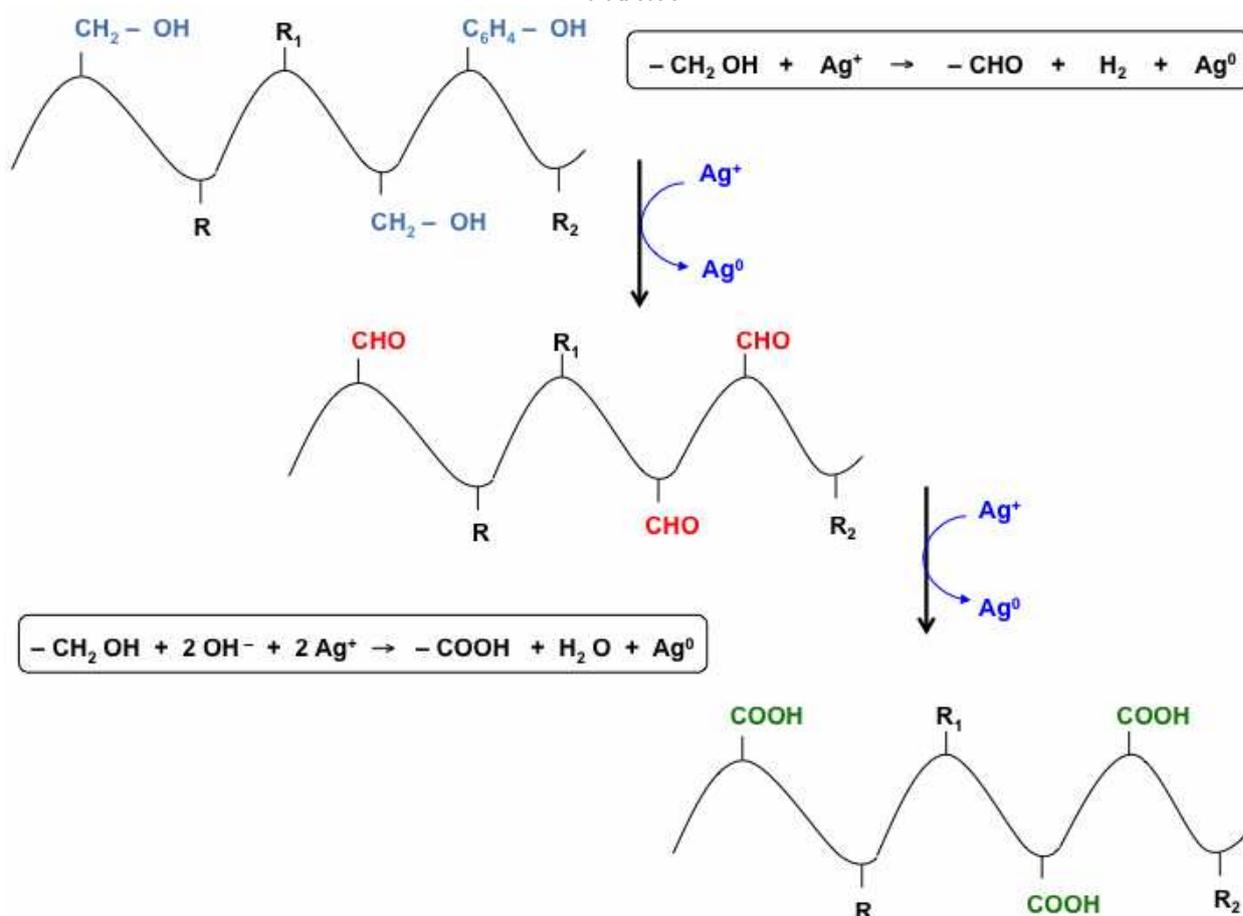
Durante a síntese das *NPsAg* a cor da mistura reacional mudou gradualmente de incolor para amarelo claro e, posteriormente, a solução tornou-se avermelhada, indicando a formação das nanopartículas de prata e a redução do sal de Ag^{+1} pela tirosina. Após três horas de reação nenhuma mudança na coloração foi observada e isto sugeriu que a reação estava completa.

Durante o processo de redução a tirosina, a serina (grupo $-OH$, metanólico) e a cisteína (grupo $-SH$), presentes na estrutura peptídica da fibroína, desempenharam um papel crucial e possivelmente as sequências peptídicas na fibroína favoreceram o processo de redução do precursor de prata por um caminho enzimático. A interação entre o precursor metálico e a fibroína é do tipo ácido/base de Lewis, onde o íon metálico Ag^+ atua como ácido e os pares de elétrons livres nos

aminoácidos presentes na constituição da fibroína atuaram como bases de Lewis. Associado a isso, o parâmetro de dureza (η) para o íon Ag^+ é de 6,8, que torna essa espécie um ácido “soft” de Lewis, e favoreceu a sua interação com a porção básica dos aminoácidos. Essa maior interação tornou viável a aproximação do centro metálico com o centro redutor da tirosina, serina, etc., diminuiu a energia de ativação da reação e tornou o processo de transferência de elétrons mais rápido (DAS; DHAR, 2014).

O processo de redução da prata na fibroína de seda é mostrado na FIGURA 4.2. Os grupamentos hidroxila foram oxidados e ocorreu a formação de aldeídos, que posteriormente foram oxidados aos ácidos carboxílicos e reduziram os íons prata (Ag^+). A Ag^+ atua como um forte agente oxidante para compostos orgânicos; os íons Ag^+ atacaram as ligações peptídicas da cadeia da fibroína (YU *et al.*, 2012).

FIGURA 4.2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE REDUÇÃO DA PRATA

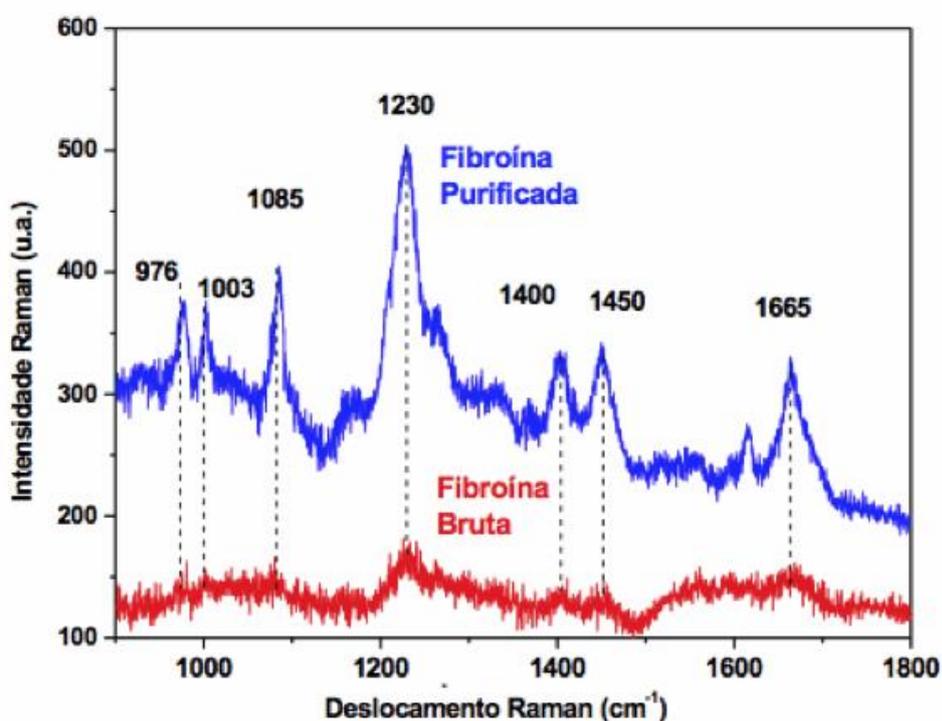


FONTE: Adaptado de YU *et al.* (2012).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/NPsAg

A **Espectroscopia de Raman** é uma potente técnica não destrutiva utilizada para analisar diferentes tipos de materiais incluindo os biopolímeros, por exemplo, a fibroína de seda. Como pode ser observado na FIGURA 4.3, o espectro Raman de fibroína purificada apresenta uma definição melhor que o espectro da fibroína bruta. Esta diferença pode estar relacionada com a presença de sericina na fibroína pura, que é um composto orgânico gelatinoso que mantém as fibras de seda natural unidas. Este composto foi removido e obteve-se a fibroína purificada, com grupos funcionais livres para serem caracterizados e explorados em posteriores aplicações do biomaterial.

FIGURA 4.3 – ESPECTROS RAMAN DA FIBROÍNA BRUTA E FIBROÍNA PURIFICADA.



As bandas conformacionais características da fibroína bruta e purificada ocorrem, para a **amida I**, na faixa de 1650 - 1667 cm^{-1} e para o complexo **amida III** em 1241-1279 cm^{-1} . No espectro Raman da fibroína purificada ocorre a dominância de bandas mais fortes, atribuídas às ligações peptídicas, incluindo-se a amida I com

vibração em 1665 cm^{-1} (vibração de alongamento C = O, enovelamento aleatório), a vibração amida III em 1230 cm^{-1} (principalmente no plano de flexão NH e vibrações de alongamento CN, folha- β) e a vibração de alongamento $C^\alpha - C$ em 1085 cm^{-1} . Estas bandas bem definidas fornecem uma clara indicação de mudanças em estruturas secundárias da forma aleatória para a folha- β . A fibroína purificada também mostrou bandas de absorção nestes comprimentos de onda. Alterações espectrais significativas não foram observadas, indicando que a conformação da fibroína foi mantida inalterada durante o processo de purificação.

As intensidades de outras bandas no espectro Raman podem ser originárias de diferentes contribuições e podem ser dependentes das orientações das fibras. Por exemplo, a banda 1400 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações do estiramento simétrico – COO^- , para a combinação da vibração de alongamento $C^\alpha - C$ e de vibração “wagging” – $\text{CH}_2 -$, e os modos de flexão H^α . Um estudo mais detalhado com medidas de Espectroscopia Raman Polarizada é necessário para uma melhor atribuição das bandas, que vai além do objetivo do presente trabalho.

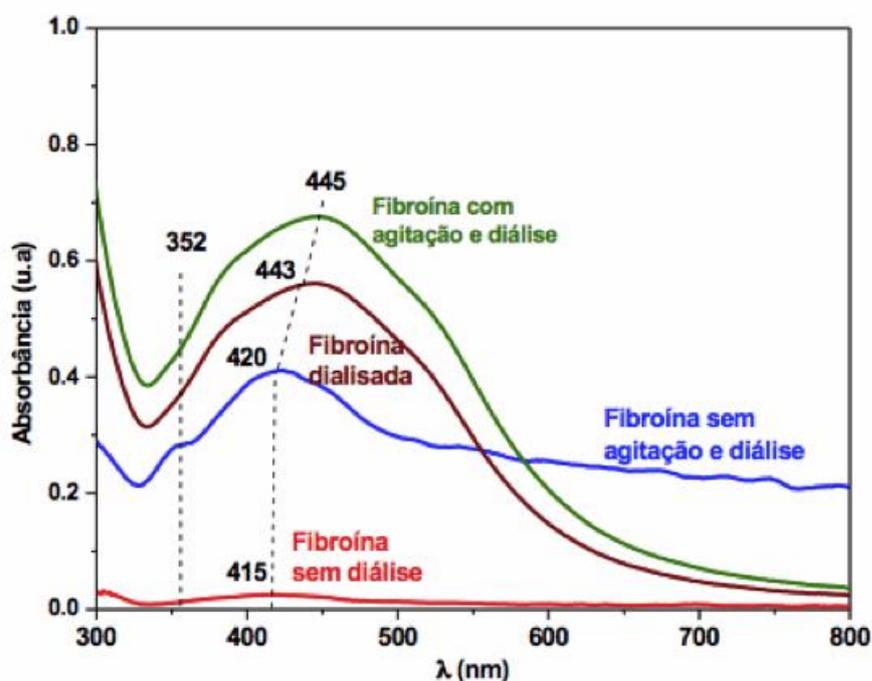
Os espectros de absorção UV-vis dos quatro coloides fibroína-Ag exibiram bandas com intensidades diferentes e em posições entre 415-445 nm. Estas bandas correspondem à **ressonância de plasma de superfície localizada (*Localized Surface Plasmon Resonance – LSPR*)** ou **ressonância plasmon**, como pode ser observado na FIGURA 4.4. A intensidade da banda de LSPR e a sua posição são dependentes das condições experimentais utilizadas para a síntese do compósito Fibroína/*NPsAg*. Este resultado sugere que a solução dialisada e a agitação são parâmetros fundamentais na síntese, se o objetivo é a obtenção de um nanocompósito com elevada concentração de prata. A solução de fibroína não dialisada apresenta uma grande concentração de íons Na^+ e Ca^{2+} , utilizados na extração da fibroína. Estes íons podem competir com íons Ag^+ por sítios de adsorção das fibras e interferir significativamente no processo de redução Ag^+ para Ag^0 . Conseqüentemente, esta interferência conduz à formação de um nanocompósito Fibroína/*NPsAg* com baixa concentração de nanopartículas de prata.

Além disso, pode-se concluir que a agitação também é um parâmetro importante para esta abordagem sintética. A banda de LSPR aumenta significativamente a sua intensidade para soluções mantidas sob agitação, até

mesmo para a solução não submetida à diálise, como pode ser observado na FIGURA 4.4.

A análise da forma e posição das bandas LSPR, na FIGURA 4.4, leva à conclusão que elas apresentam formas esféricas semelhantes às estruturas das nanopartículas de prata reportadas na literatura, sugerindo a formação deste tipo de nanoestrutura. A banda em 352 nm, com a formação de um ombro no espectro UV-visível da FIGURA 4.4, pode ser atribuída ao modo vibracional quadrupolar, normalmente observado para nanopartículas de prata assimétricas.

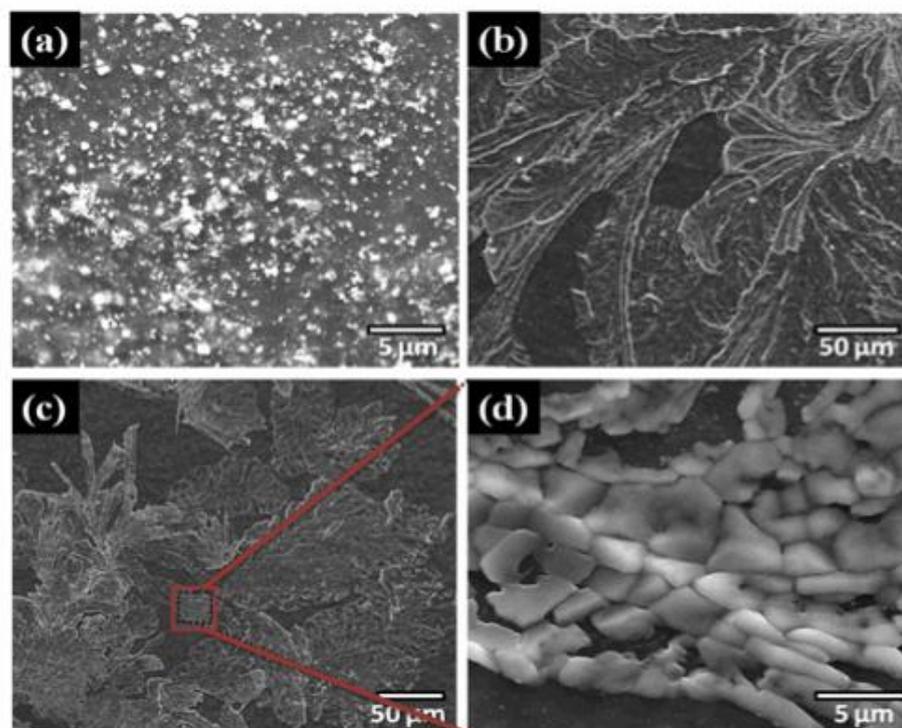
FIGURA 4.4 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VISÍVEL DAS QUATRO DISPERSÕES COLOIDAIS PREPARADAS DO BIONANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/NPsAg.



Pode-se concluir que a diálise e agitação são parâmetros essenciais e, as melhores condições de síntese do nanocompósito Fibroína/NPsAg, com a maior concentração de prata. A partir disso, apenas as amostras do nanocompósito preparadas com fibroína dialisada foram utilizadas em análises de microscopia (SEM). A FIGURA 4.5 mostra a imagem de SEM da mistura nitrato de prata-fibroína, depositado sobre um substrato de vidro, onde pode ser observada apenas a presença de grãos de fibras de fibroína. Entretanto, após 6h de reação, o nanocompósito Fibroína/NPsAg exibe uma forma morfológica dendrítica para ambos

os coloides preparados com e sem agitação. Como pode ser observado na FIGURA 4.5, estas estruturas hiper ramificadas são formadas pela ligação de pequenas partes micrométricas de Fibroína/*NPsAg*, as quais são agregadas hierarquicamente.

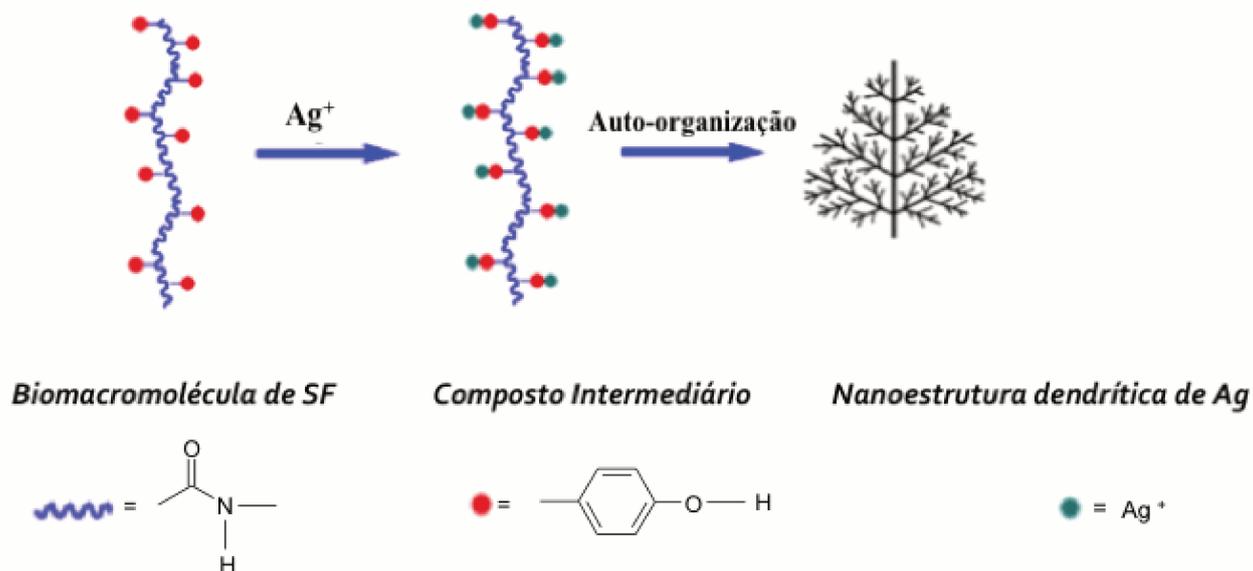
FIGURA 4.5 – IMAGENS DE SEM: ^(a) MISTURA DE FIBROÍNA E AgNO_3 ; ^(b) NANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/*NPsAg*, SEM AGITAÇÃO; ^(c) NANOCOMPÓSITO FIBROÍNA/*NPsAg* COM AGITAÇÃO; ^(d) IMAGEM DE SEM COM AMPLIAÇÃO DA HASTE DO NANOCOMPÓSITO *NPsAg*.



A forma da estrutura da cadeia e a presença de alguns grupos funcionais, na biomacromolécula da fibroína da seda, desempenham um importante papel na formação dos nanodendritos de prata e na sua preparação. Geralmente, à temperatura ambiente, o resíduo de tirosina (Tyr) na biomacromolécula de fibroína da seda é responsável pelo processo de redução entre os íons de metais nobres e a biomacromolécula da fibroína. Um mecanismo possível para a formação de nanodendritos de prata pode ser observado na FIGURA 4.6.

FIGURA 4.6 – ^(a) EQUAÇÃO QUÍMICA COM A OXIDAÇÃO DA *Tyr* E REDUÇÃO DOS ÍONS Ag^+ ; ^(b) FORMAÇÃO DA ESTRUTURA DENDRÍTICA.

(a) Mecanismo de formação do dendrito



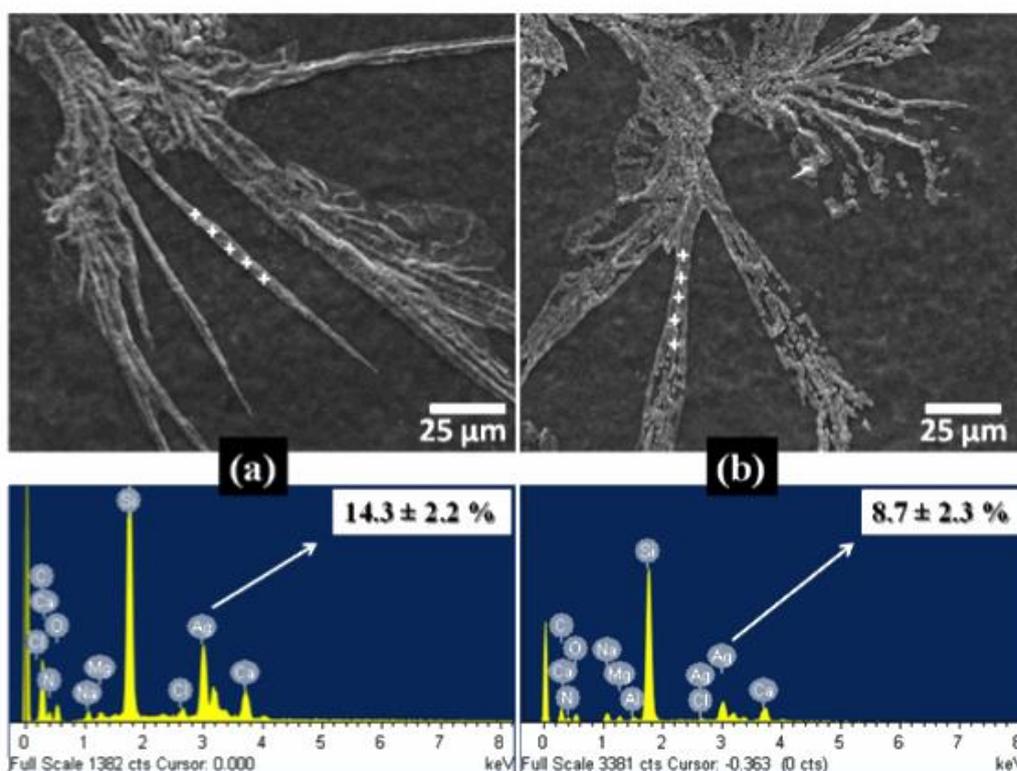
(b) Equação Química



A primeira etapa do mecanismo de formação dos nanodendritos de prata foi a complexação entre os grupos hidroxila, presentes nos resíduos de *Tyr*, da cadeia principal da biomacromolécula de fibroína da seda e os íons Ag^+ , como pode ser observado na FIGURA 4.6 (b). A próxima etapa consistiu da redução dos íons Ag^+ a Ag^0 , com a formação dos núcleos de prata, enquanto que os grupamentos fenol foram oxidados às semiquinonas. A equação química que representa a redução dos íons Ag^+ e a oxidação do fenol são mostradas na FIGURA 4.6 (b). Na etapa subsequente ocorreu o crescimento dos núcleos de prata e a biomacromolécula de fibroína da seda, além de atuar como agente redutor desempenhou um importante papel na redução da energia superficial do plano 111 por meio da interação direta com a superfície da prata, resultando em um crescimento muito lento ao longo deste plano de orientação FIGURA 4.6 (b), de maneira similar ao observado em outros estudos (XIA; WANJ, 2011).

Na FIGURA 4.7, uma análise mais detalhada de SEM/EDS é mostrada para os nanocompósitos Fibroína/*NPsAg* após a diálise. Como podem ser observadas na FIGURA 4.7 (a) e FIGURA 4.7 (b), as estruturas hiper-ramificadas do nanocompósito exibem uma quantidade significativa de prata na sua composição. A presença de outros elementos, por exemplo, cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e sódio (Na) pode ser oriunda da lâmina de vidro (utilizada como suporte) e/ou de resíduos de sais não removidos na diálise.

FIGURA 4.7 – (a) IMAGEM DE SEM E ESPECTRO EDS DO COMPÓSITO FIBROÍNA/*NPsAg* SINTETIZADOS SEM AGITAÇÃO; (b) IMAGEM DE SEM E ESPECTRO EDS DO COMPÓSITO COM AGITAÇÃO



Os resultados apresentados acima mostram a capacidade de ajustar a banda *LSPR* do nanocompósito Fibroína/*NPsAg*. Este ajuste está relacionado aos parâmetros experimentais, tais como a diálise da solução de fibroína antes da síntese e a agitação da mistura reacional fibroína- AgNO_3 . Outros parâmetros de síntese, por exemplo, temperatura e concentração dos reagentes devem ser interessantes para investigar e otimizar a metodologia utilizada na biossíntese de

nanobiocompósitos de fibroína. Além disso, para aplicações plasmônicas, a adição de outros metais para promover a formação de estruturas bimetálicas pode constituir um caminho importante para deslocar a banda de *LSPR* na região do visível.

Portanto, pode-se observar que a biomacromolécula de fibroína da seda apresenta duas funções: reduzir os íons Ag^+ a Ag^0 e atuar como força dirigente na construção da estrutura, no mecanismo de formação dos nanodendritos de prata.

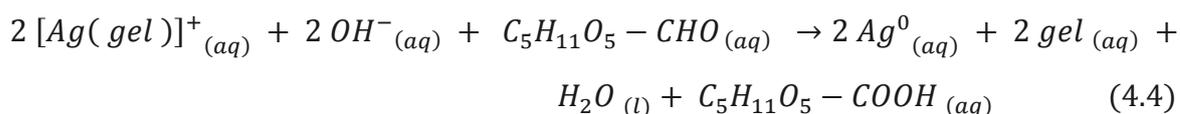
4.3 SÍNTESE DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/*NPsAg*

Os polímeros naturais, por exemplo, a gelatina, quitosana e a fibroína, são materiais interessantes para aplicações médicas, porque são biodegradáveis, bioabsorvíveis e os produtos de degradação não são tóxicos. A gelatina tem sido utilizada como matriz ou agente estabilizador em nanocompósitos, fornecendo a estabilidade para as nanopartículas metálicas contra processos como oxidação, aglomeração e precipitação.

As reações químicas de formação das nanopartículas de prata são mostradas nas equações 4.3 e 4.4. A equação 4.3 mostra a ocorrência da dispersão dos íons de prata (Ag^+) na matriz polimérica de gelatina. A gelatina reagiu com os íons Ag^+ e formou um complexo gelatinoso estável, $[Ag(gel)]^+$.



Em seguida, o complexo $[Ag(gel)]^+$ reagiu com os íons hidroxila (OH^-), oxidou a glicose a ácido glucônico e reduziu os íons prata, o que conduziu à formação das *NPsAg*, como mostrado na equação 4.4.



A eletroquímica da reação de formação das *NPsAg* é a combinação das equações 4.5 (semirreação de oxidação), 4.6 (semirreação de oxidação) e 4.7 (equação global). O potencial padrão da equação global é 0,750V e, portanto, a

reação tem Energia Livre de Gibbs negativa ($\Delta G < 0$) e o processo de formação das *NPsAg* é termodinamicamente espontâneo.



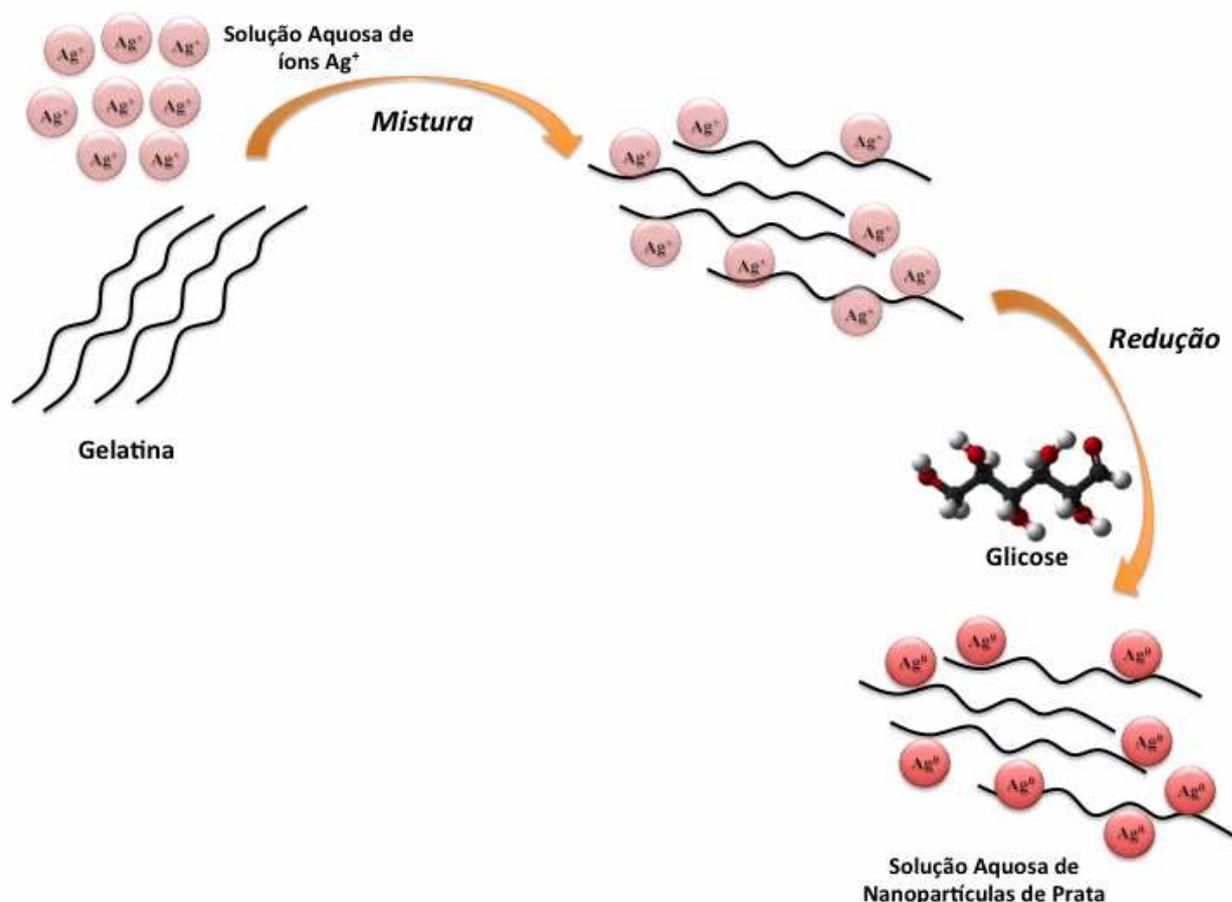
Inicialmente ocorreu a redução dos íons Ag^+ a Ag^0 que, em seguida, se agregaram e formaram *clusters oligoméricos*. Estes clusters levaram à formação de partículas coloidais de Ag^0 .

Estudos anteriores mostraram que a utilização de agentes redutores fortes, por exemplo, boroidreto de sódio, resultou na formação de partículas pequenas e monodispersas, porém era difícil o controle de partículas maiores. A utilização de agentes redutores mais fracos, por exemplo, a glicose resulta em uma velocidade de redução mais lenta e em uma faixa de tamanho mais larga (JEONG; PARK, 2014).

As sínteses de *NPsAg* pelo método da redução química exige a presença de um estabilizador para evitar a aglomeração indesejada das nanopartículas. As soluções aquosas de *NPsAg* não são estáveis e podem sofrer o processo de aglomeração rapidamente, em decorrência da alta reatividade das nanopartículas (JEONG; PARK, 2014). No entanto, esta aglomeração foi significativamente reduzida pela utilização da gelatina e a lixiviação (aglomeração) das nanopartículas foi observada somente após 4 meses da realização da síntese. A gelatina não protege as *NPsAg* apenas da agregação, mas também desempenham um papel crucial na morfologia, tamanho e biocompatibilidade das nanopartículas. Portanto, a gelatina foi utilizada não apenas como um estabilizador para as *NPsAg* sintetizadas, mas também pode modificar o crescimento das *NPsAg* através da sua forte interação com a superfície das nanopartículas no início da sua formação. Os íons hidroxila tiveram a função principal de acelerar a síntese das nanopartículas metálicas, porém podem também determinar o tamanho das partículas formadas (VASIREDDY *et al.*, 2012). Imediatamente após a síntese a solução apresentou pH ~ 12 e, após a diálise, as nanopartículas estavam em pH neutro.

Na FIGURA 4.8 é mostrado o diagrama esquemático do processo de formação das *NPsAg* na matriz gelatina.

FIGURA 4.8 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/*NPsAg*.



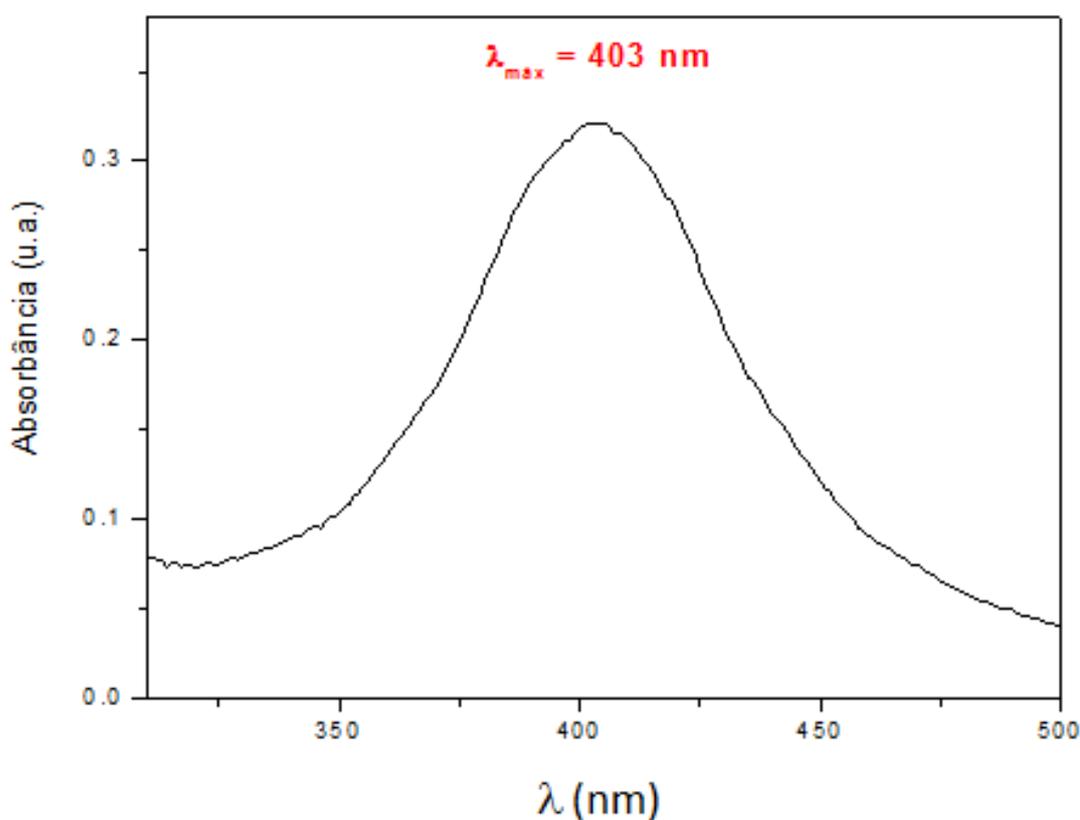
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/*NPsAg*

A cor da solução gelatina/*NPsAg* mudou de incolor para castanho claro e, finalmente castanho escuro, indicando a formação das nanopartículas de prata na solução que continha a gelatina como agente estabilizante. A formação das *NPsAg* foi investigada por espectroscopia UV-vis, que mostrou ser um método analítico eficaz na detecção das nanopartículas metálicas. As *NPsAg* apresentam uma intrínseca absorção de **ressonância de plasma de superfície localizada** (**Localized Surface Plasmon Resonance – LSPR**) na região UV-visível, com uma

banda ao redor de 400 nm. A banda em torno de 400 nm é atribuída à densidade eletrônica de superfície (**banda plasmon**), como pode ser observado na FIGURA 4.9 (JEONG; PARK, 2014). A banda *LSPR* surgiu em decorrência dos elétrons livres na banda de condução das partículas metálicas com pequeno tamanho. A forma da banda plasmon dependeu do tamanho das *NPsAg*, do ambiente químico proporcionado pela gelatina e pelo íons hidroxila, das *NPsAs* adsorvidas na superfície da gelatina e da constante dielétrica do meio.

Após o processo de centrifugação e diálise, a amostra apresentou uma coloração amarelada. Essa coloração ocorreu porque as partículas coloidais são muito menores que o comprimento de onda da luz visível, o que fez com que a solução apresentasse a cor amarela. A absorção máxima em 403 nm corrobora com a Teoria de Mie, que prevê uma banda com máximo de absorção entre 380 e 420nm, como pode ser observado na FIGURA 4.9.

FIGURA 4.9 – ESPECTRO DE UV-vis DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/*NPsAg*.



A solução aquosa das *NPsAg* apresentou uma banda de absorção próximo a 391 nm, uma banda de absorção típica de nanopartículas de prata com morfologia

esféricas e, que apresentam o **plasmon de superfície** nessa região do espectro. Para a obtenção do espectro de absorção da FIGURA 4.9 a solução concentrada das *NPsAg* foi diluída 10 vezes. O espectro de absorção dessa solução diluída apresenta características espectrais (forma, alargamento de banda) idênticas ao espectro das soluções mais concentradas, indicando a estabilidade da solução “estoque”. Essa constatação mostra que as *NPsAg* não sofreram dimerização ou aglomeração de várias partículas, o que resultaria em uma nova banda de absorção em ~ 391 nm decorrente desses processos. Todas as dispersões de *NPsAg* preparadas apresentaram um pico de *plasmon* muito intenso em ~ 410 nm, que é característico de *NPsAg* com diâmetro de partícula em ~100 nm.

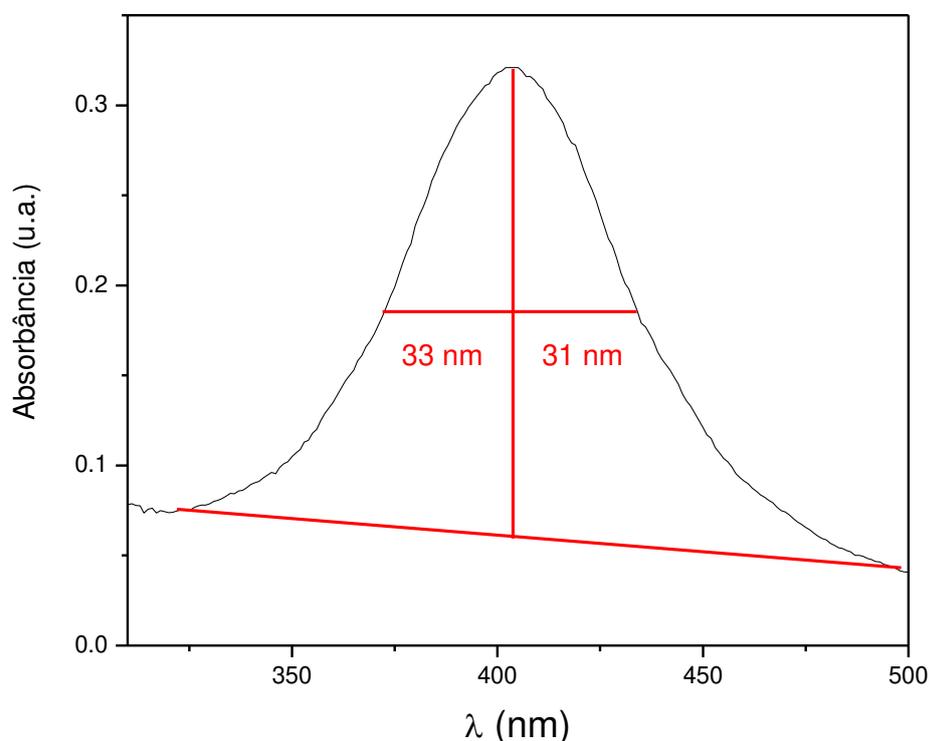
O alargamento da banda *plasmon* ocorreu possivelmente pela agregação ou presença de nanopartículas com tamanhos variados, porém na FIGURA 4.9 pode ser verificado que o espectro apresenta um afunilamento na banda de absorção máxima.

Na FIGURA 4.10 foi efetuado o **cálculo da largura à meia altura (FWHM – Full Width at Half Maximum)** – um parâmetro da curva referente ao seu “abaulamento” – e foi obtido o valor de 64 nm. Os valores de 33 nm e 31 nm, quase simétricos, indicaram que as *NPsAg* apresentam superfícies regulares e distribuição de tamanho de partícula dentro de uma faixa estreita de valores, corroborando com os dados de DLS.

A caracterização do bionanocompósito foi efetuada também através de medidas de DLS e Potencial Zeta.

O tamanho das *NPsAg* sintetizadas foi determinado por **Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS)**. Em métodos baseados na dispersão de luz, o tamanho é calculado com base na dispersão da luz pelas partículas. O *DLS* é amplamente utilizado na avaliação do tamanho hidrodinâmico e no comportamento de nanopartículas (aglomeração e dissolução) em solventes

FIGURA 4.10 – CÁLCULO DA FWHM EFETUADO NO ESPECTRO DE UV-vis DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO BIONANOCOMPOSTO GELATINA/NPsAg.



Os resultados de **Diâmetro Hidrodinâmico**, **Índice de Polidispersidade** e **Potencial Zeta** das soluções aquosas de **GNG** (Gelatina/NaOH/Glicose), **G** (Gelatina) e **G/NPsAg** (nanopartículas de prata/Gelatina). são mostrados na TABELA 2.

TABELA 2 - DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DH), ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE (IP) POTENCIAL ZETA (ζ) E O DESVIO PADRÃO (*SD – STANDARD DESVIATION*) DAS SOLUÇÕES DE GELATINA/NaOH/GLICOSE, (GELATINA) E GELATINA/ NANOPARTÍCULAS DE PRATA.

SOLUÇÃO	DH (nm \pm SD)	IP	ζ (mV \pm SD)
GNG	67,05 \pm 5,99	1,000 \pm 0,000	- 24,77 \pm 3,34
G	38,92 \pm 2,23	0,540 \pm 0,020	- 5,15 \pm 1,46
G/NPsAg	100,59 \pm 7,35	0,462 \pm 0,025	- 30,43 \pm 0,81

Os dados de diâmetro hidrodinâmico mostrados na TABELA 2 foram significativamente dependentes não apenas do agente redutor (glicose), utilizado na

síntese das nanopartículas, mas também do agente estabilizante (gelatina). Os resultados mostram que o valor de DH para as nanopartículas de prata (100,59 nm) em gelatina é maior que o da gelatina, indicando que as nanopartículas de prata foram formadas e adsorveram na superfície da gelatina, em estruturas maiores que a gelatina individual, corroborando com o mecanismo proposto na FIGURA 4.8.

Os diâmetros hidrodinâmicos foram afetados pelo ambiente que envolveu a nanopartícula e foram calculados partindo-se de uma partícula esférica isotrópica. Portanto, esses dados representam o diâmetro da partícula e não o tamanho real da partícula que deve ser determinado por outras técnicas, por exemplo, **Microscopia Eletrônica de Transmissão de (*Transmission Electron Microscopy – TEM*)**.

O resultado de *DLS* fornece também informações a respeito da distribuição de tamanho das nanopartículas e o índice de polidispersidade. No entanto, misturas heterogêneas, amostras polidispersas ou nanopartículas na presença de outras substâncias nanodimensionais (clusters de proteína), tornam as medidas difíceis ou mesmo impossíveis de serem realizadas.

O índice de polidispersidade (IP) é um parâmetro utilizado na avaliação da distribuição de tamanho das nanopartículas. Um valor de $IP > 0,7$ significa uma alta distribuição de tamanho de partícula. Para o sistema Gelatina/NaOH/Glicose a polidispersidade foi muito elevada (1,000), indicando que as nanopartículas não são homogêneas. A gelatina em solução aquosa apresentou um índice de polidispersidade em torno de 0,5. Essas partículas são mais homogêneas, porém não totalmente, o que é esperado para uma amostra comercial não fracionada. O menor IP foi para o bionanocompósito Gelatina/*NPsAg* ($IP = 0,462 \pm 0,025$), que apresentou nanopartículas mais homogêneas, corroborando como cálculo da FWHM efetuado no espectro de absorção UV-vis que indicou *NPsAg* com superfícies regulares e distribuição de tamanho de partícula dentro de uma faixa estreita de valores.

O **Potencial Zeta (ζ)** foi utilizado para avaliar a estabilidade das nanopartículas. As medidas de **Potencial Zeta (*Zeta Potencial – ZP*)** foram efetuadas por espalhamento de luz eletroforético (***Electrophoretic Light Scattering – ELS***).

A maioria das partículas, quando em contato com um líquido, adquire uma carga elétrica na sua superfície e esse potencial é denominado de Potencial Zeta (ζ).

A “carga” da partícula coloidal é na verdade uma carga efetiva, resultante do balanço carga de íons e contra íons. O Potencial Zeta se correlaciona com a repulsão eletrostática entre as partículas e com a estabilidade dos sistemas coloidais e, quanto maior o valor do ζ , mais estável será o coloide. Quando o valor do Potencial Zeta for menor que -30 mV ou maior igual a $+30$ mV, a partícula será estável (DUMAN; TUNÇ, 2009).

A dispersão coloidal de gelatina em água apresentou o menor valor de Potencial Zeta ($-5,15 \pm 1,46$ mV). A baixa estabilidade da gelatina na água pode estar relacionada com o excesso de cargas presentes nos aminoácidos, que provocou a diminuição do Potencial Zeta abaixo do denominado ponto crítico e resultou na formação de agregados. A velocidade de formação dos agregados aumenta à medida que mais próximo de zero esteja o Potencial Zeta.

Para o sistema Gelatina/NaOH/Glicose o valor do Potencial Zeta foi de $-24,77 \pm 3,34$ mV. O NaOH é um eletrólito forte, estava em excesso na solução e, por isso a sua presença provocou a diminuição do Potencial Zeta abaixo do ponto crítico. Essa diminuição deveria promover a agregação das partículas. Porém o NaOH atuou nos grupamentos ácidos da gelatina, desprotonou-os e aumentou as cargas (carga líquida negativa) e a estabilidade das partículas na dispersão coloidal. Isso está de acordo com a **Teoria de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (Teoria DLVO)**, quanto maior o Potencial Zeta, mais provável que a dispersão coloidal seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera as Forças Intermoleculares (**Forças de van der Waals**), as quais são responsáveis pela agregação (SUSHKO; SHLUGER, 2007).

O bionanocompósito Gelatina/*NPsAg* apresentou o valor de Potencial Zeta mais negativo ($-30,43 \pm 0,81$ mV) e, portanto, é o sistema mais estável. A nanopartícula metálica tem um potencial eletrostático (Ψ_0) muito pequeno e, de acordo com a Teoria DLVO, proporcionaria a agregação das partículas. A adição da gelatina como agente estabilizante protegeu as *NPsAg* (estabilização estérica) e aumentou a sua estabilidade em água. A estabilidade das *NPsAg* em solução aquosa ocorre porque a macromolécula adsorve sobre a superfície das nanopartículas formadas e proporciona a repulsão estérica.

Os resultados de Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta das **G/*NPsAg*** (nanopartículas de prata/Gelatina) em água ultrapura

(Milli-Q™) e água reconstituída para embrião de Zebrafish (*Moderately Hard Reconstituted Water – MHRW*) são mostrados na TABELA 3.

TABELA 3 - DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DH), ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE (IP) POTENCIAL ZETA (ζ) E O DESVIO PADRÃO (*STANDARD DESVIATION – SD*) DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/NANOPARTÍCULAS DE PRATA/ EM ÁGUA ULTRAPURA (Milli-Q™) E ÁGUA RECONSTITUÍDA (*MHRW*).

SOLVENTE	DH (nm \pm SD)	IP	ζ (mV \pm SD)
Água Milli-Q	100,59 \pm 7,35	0,462 \pm 0,025	- 30,43 \pm 0,81
Água MHRW	138,20 \pm 8,20	0,478 \pm 0,072	- 21,00 \pm 2,60

Os dados de diâmetro hidrodinâmico das *NPsAg*/Gelatina mostrados na TABELA 3 foram significativamente dependentes do solvente. O resultado de DH do bionanocompósito gelatina/*NPsAg* em água reconstituída é maior que em água ultrapura. Isso pode ser resultado da aglomeração das nanopartículas (atração eletrostática) em decorrência da grande força iônica do meio. A carga líquida na superfície da nanopartícula afeta a distribuição de íons ao seu redor, aumentando a concentração de contra íons junto à superfície. Desta forma ocorre a formação de uma dupla camada elétrica na interface da nanopartícula/solvente, que facilita a agregação.

Os valores dos índices de polidispersidade (IP) das soluções de gelatina/*NPsAg* em água ultrapura (0,462 \pm 0,025) e reconstituída (0,478 \pm 0,072) foram idênticos, indicando que as nanopartículas são homogêneas.

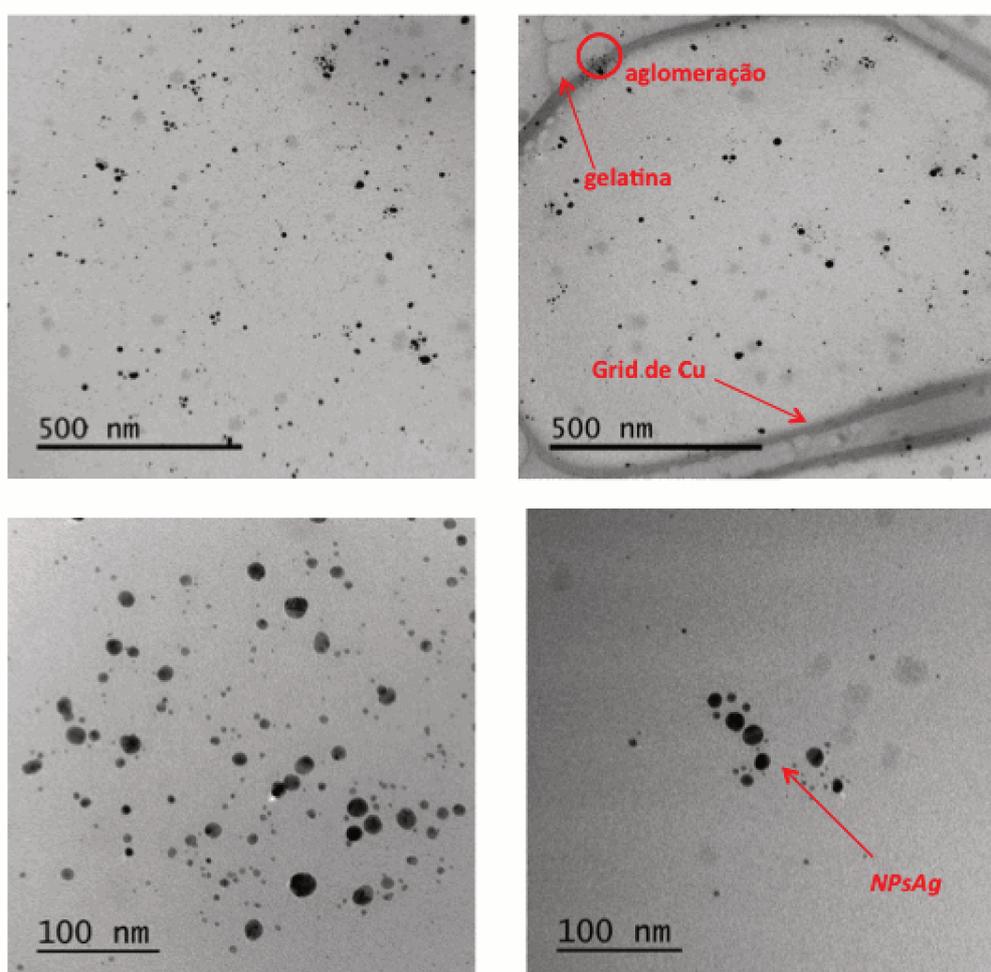
O valor do Potencial Zeta do bionanocompósito gelatina/*NPsAg* em água reconstituída foi de - 21,00 \pm 2,60 mV. A maior concentração de eletrólitos na água reconstituída e a presença de íons com valências maiores (Ca^{2+}) diminuíram a distância na qual ainda existe **potencial eletrostático (Ψ)** significativo e, portanto, tornou mais favorável a agregação das partículas.

A presença de vários eletrólitos fortes (*NaCl*, *KCl*) e a alta concentração de alguns sais {[*MgSO*₄ (2 mol.L⁻¹)], [*NaHCO*₃ (4 mol.L⁻¹)], [*CaCl*₂ (1,27 mol.L⁻¹)], [*Na*₂*HPO*₄ (47 mol.L⁻¹)]}, na água reconstituída, provocou a diminuição do Potencial Zeta abaixo do ponto crítico. Essa diminuição favoreceria a agregação das partículas. Porém, a presença da gelatina como agente estabilizante, manteve as

nanopartículas estáveis na solução de água reconstituída. Na água reconstituída a estabilidade das *NPsAg* é explicada pela adsorção da macromolécula sobre a superfície das nanopartículas formadas, proporcionando a repulsão estérica.

A caracterização do tamanho das *NPsAg* foi efetuada por **Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy – TEM*)**. As imagens obtidas por microscopia das nanopartículas dispersas sobre o grid de cobre do Microscópio Eletrônico de Transmissão são mostradas na FIGURA 4.11.

FIGURA 4.11 – IMAGENS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA DISPERSAS SOBRE O GRID DE COBRE E OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.



A partir das imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão pode-se observar que as nanopartículas de prata apresentam a forma esférica, porém com uma distribuição variada de tamanho. A polidispersidade das nanopartículas de prata já havia sido observada nas medidas de DLS. A forma esférica das

nanopartículas também já era esperada, pois a solução aquosa diluída das *NPsAg* apresentou uma banda de absorção máxima próximo a 391 nm, como mostrado na FIGURA 4.9, e essa banda de absorção é atribuída às nanopartículas de prata esféricas, decorrente do seu *plasmon de superfície*.

Não foi observada aglomeração ou dimerização das nanopartículas nas imagens da FIGURA 4.11. A ausência de aglomerados e dímeros foi confirmada também pela banda *plasmon* de absorção (FIGURA 4.9), pois caso esses fenômenos ocorressem uma nova banda *plasmon de superfície localizada* estaria presente, resultado da interação de duas ou mais nanopartículas de prata juntas e em contato. A pequena aglomeração de partículas que aparece na FIGURA 4.10 foi atribuída ao processo de secagem da água no grid de cobre e presença da gelatina, que propiciou a coalescência das nanopartículas.

As nanopartículas apresentam uma distribuição de tamanho, com o valor médio em 20 nm, porém com algumas partículas na faixa de 4 nm. Embora não seja uma regra, a atividade antimicrobiana das nanopartículas depende do tamanho da das *NPsAg* preparadas. Estudos sugerem que quanto menor o tamanho da partícula, maior a sua citotoxicidade. As nanopartículas preparadas na faixa de tamanho de 20 nm têm maior facilidade de absorção, mais fácil dissolução e a liberação dos íons prata ocorre mais lentamente quando em contato com micro-organismos (YEN *et al.*, 2009). Todos esses fatores são decorrentes do aumento da área superficial das partículas. A modificação superficial das *NPsAg* com a gelatina aumentou também a sua dissolução e as nanopartículas ficaram estáveis por um período de tempo maior (aumento da estabilidade das *NPsAg*), confirmado através das medidas de Potencial Zeta.

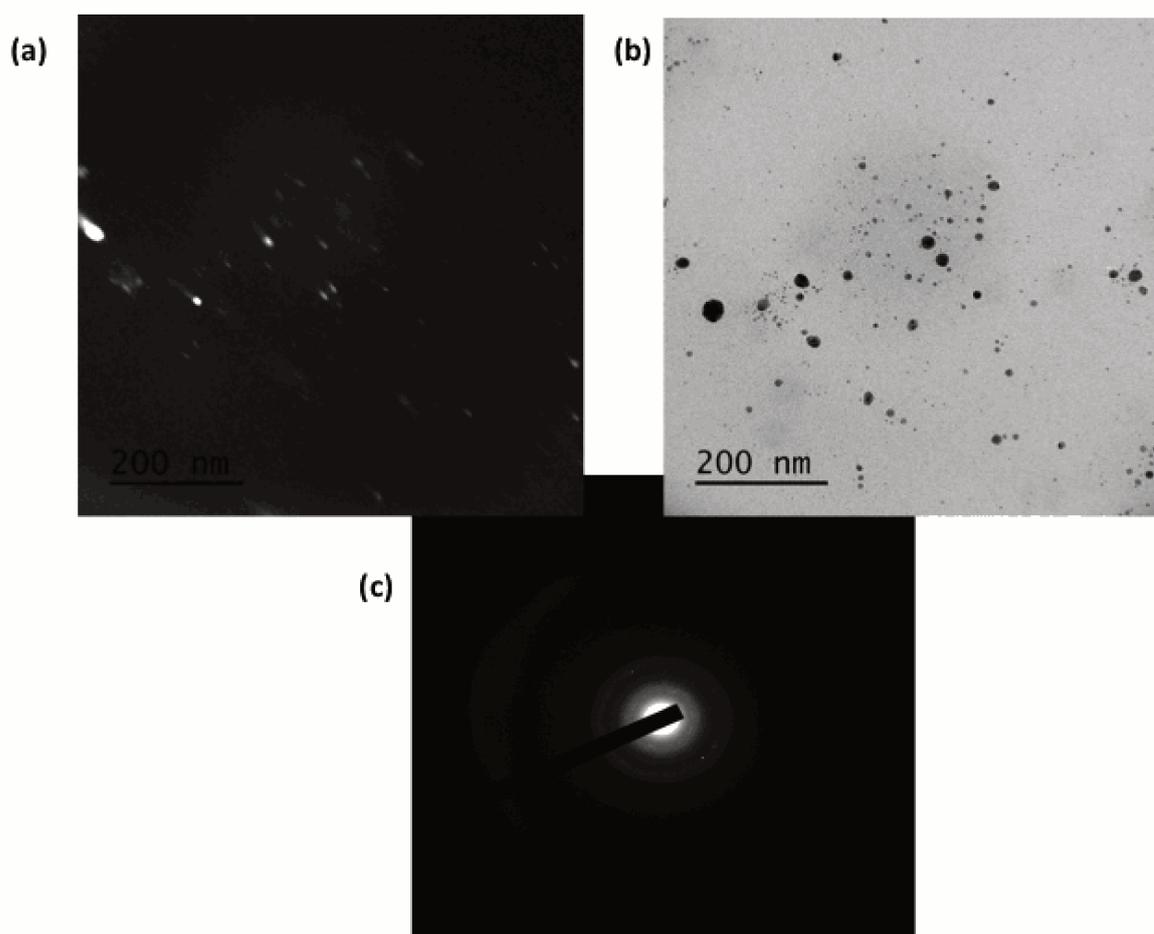
A forma, o tamanho e a área superficial das nanopartículas de prata preparadas em gelatina são fatores determinantes na citotoxicidade destas nanopartículas. Para a avaliação desses fatores é fundamental a utilização de técnicas de caracterização específicas como espalhamento de luz (DLS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A técnica *bright-field* é uma técnica de iluminação utilizada em microscopia. As *NPsAg* foram iluminadas por baixo e o contraste de luz branca na amostra foi causado pela absorção de parte da luz transmitida em áreas mais densas das partículas. A aparência típica de uma imagem de microscopia obtida pela técnica

bright-field é mostrada na FIGURA 4.12 (b), onde as nanopartículas de prata representam as partes escuras sobre um fundo claro. O modo *dark-field* também foi utilizado nas imagens das nanopartículas de prata. Neste modo existe uma abertura na lente e, a escolha de feixes diferentes difratados, revelam novas imagens FIGURA 4.12 (a).

Nas imagens de microscopia da FIGURA 4.12 foram utilizadas as técnicas de ***bright-field***, ***dark-field*** e **difratometria**. As nanopartículas apresentaram forma esférica e com distribuição de tamanho, quando foram utilizadas as técnicas de *bright-field* e *dark-field*. A difração dos elétrons revelou o caráter policristalino das nanopartículas de prata.

FIGURA 4.12 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE ^(a) *DARK-FIELD*, ^(b) *BRIGHT-FIELD* E ^(c) DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS.



4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO BIONANOCOMPÓSITO GELATINA/NPsAg

O efeito antimicrobiano da prata e especialmente das nanopartículas de prata *NPsAg*, independentemente do tipo de bactéria, é conhecido em toda a comunidade científica mundial. Porém, as interações entre nanomateriais e células, a internalização celular e a resposta tóxica da célula estão entre as questões mais cruciais relacionadas à toxicidade induzida por *NPsAg*.

O mecanismo definitivo da ação antibacteriana das nanopartículas de prata ainda não é conhecido, porém pode estar relacionado com o mecanismo de ação dos íons prata (Ag^+), onde ocorre a acumulação das *NPsAg* e saturação de enzimas e proteínas. O mecanismo proposto em alguns trabalhos sugere que a mudança causada na parede celular e nuclear (DNA/RNA) pela nanopartícula é a principal causa pelo retardamento do crescimento de células bacterianas. Três possíveis mecanismos que podem ser a causa da morte de células bacterianas por *NPsAg* são listados a seguir (Li *et al*, 2008):

1. O crescimento e proliferação das células bacterianas são inibidos pela adesão das *NPsAg* (devido ao pequeno tamanho das partículas) na parede celular das bactérias e, conseqüentemente, alterações na parede celular com a formação de “pits”.
2. As nanopartículas de prata penetram através da parede celular bacteriana, causam danos ao DNA e a morte da célula (REIDY *et al.*, 2013).
3. Os íons Ag^+ interagem com o enxofre de proteínas presentes na parede celular das bactérias, levando ao mau funcionamento da parede celular bacteriana.

O efeito antimicrobiano do bionanocompósito gelatina/*NPsAg* foi avaliado contra bactéria *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), que foram tratadas com diferentes porcentagens de nanopartículas de prata em placas com meio de Mueller Hinton.

Os valores obtidos para a concentração inibitória mínima são mostrados na TABELA 4.

TABELA 4 – RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PARA AS *NPsAg*.

BACTÉRIA	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (%)
<i>B. subtilis</i>	3,12 – 1,56
<i>E. coli</i>	6,25 – 3,12

Comparando-se com o controle positivo, a Estreptomicina, as *NPsAg* apresentam CIM em concentrações baixas e atividade antimicrobiana contra uma bactéria gram-positiva (*B. subtilis*) e uma gram-negativa (*E. coli*). Porém, as nanopartículas de prata foram mais eficazes contra a bactéria *B. subtilis*. Além disso, não foi observada atividade antimicrobiana em soluções que não apresentavam as nanopartículas (controle), mostrando que a atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com as *NPsAg*.

As *NPsAg* por apresentarem pequeno tamanho de partícula podem aderir e atravessar a parede celular das bactérias *B. subtilis* e *E. coli*. Em seguida, as *NPsAg* podem ser oxidadas e formar íons metálicos Ag^+ , um ácido “soft” de Lewis ($\eta = 6,8$) que tem a tendência natural em reagir com bases. As células são compostas por átomos de enxofre e fósforo, que são bases “soft” de Lewis. Portanto, a interação entre os íons metálicos Ag^+ e os aminoácidos presentes nas células das bactérias *B. subtilis* e *E. coli* foram do tipo ácido/base de Lewis. Essa forte interação acarretou danos às células e a morte celular.

Outro fator a ser considerado é a presença de enxofre e fósforo na constituição do DNA; os íons Ag^+ também podem ter interagido com essas bases “soft” de Lewis e destruído o DNA, o que teria causado a morte celular. A interação entre a prata e os átomos de enxofre/fósforo presentes no DNA podem levar à problemas na replicação do DNA das bactérias *B. subtilis* e *E. coli* e ocasionar a morte desses micro-organismos.

A interação das nanopartículas com a parede celular das bactérias, DNA e enzimas pode causar um desequilíbrio no metabolismo celular, ocasionando a indução de elevado nível de espécies reativas de oxigênio (ROS),

conseqüentemente, na morte nas bactérias (QUINTEROS *et al.*, 2016). Contudo, a presença da gelatina nas nanopartículas pode influenciar neste processo de interação com a superfície das bactérias, assim, a influência desta bionanointerface na toxicidade precisa ser elucidada (DURÁN *et al.*, 2015).

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. CONCLUSÃO

O nanocompósito Fibroína/*NPsAg* foi preparado por um método que utiliza o conceito de química verde, sem a necessidade da utilização de agentes de redução (ácido L-ascórbico, boroidreto e hidrazina) ou tensoativos, como é efetuada normalmente em síntese coloidal. Os resíduos de tirosina presentes na fibroína foram responsáveis pela redução da prata *in situ*.

A intensidade e posição da banda *LSPR* do nanocompósito Fibroína/*NPsAg* são dependentes das condições experimentais. O perfil da banda *LSPR* é uma evidência forte da formação de nanopartículas de prata imersas em estruturas hiper-ramificadas, que aparecem entre 415-445 nm.

A etapa da diálise e a agitação da mistura reacional afetam diretamente a qualidade do nanocompósito Fibroína/*NPsAg*, bem como o rendimento da reação. Este resultado indica a possibilidade de se ajustar a banda *LSPR* com a alteração dos parâmetros experimentais.

A facilidade no método de preparação e as propriedades plasmônicas, na região do visível, são parâmetros que tornam o método e o compósito Fibroína/*NPsAg* atrativos e passíveis de futuras aplicações.

NPsAg foram sintetizadas também via síntese verde pela redução de AgNO_3 com glicose. A gelatina funcionou como um excelente agente estabilizador das nanopartículas metálicas, pois as dispersões das *NPsAg* modificadas com a gelatina permaneceram estáveis por um período de 4 meses. A espectroscopia UV-vis mostrou uma banda *plasmon* característica em 403 nm para as *NPsAg* na matriz de gelatina.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão mostraram nanopartículas de prata esféricas (valor médio em 20 nm), porém com uma distribuição variada de tamanho de partícula.

O bionanocompósito gelatina/*NPsAg* apresentou uma atividade antimicrobiana pronunciada em relação à bactéria gram-positiva *B. subtilis* e uma bactéria gram-negativa (*E. coli*), apresentando valores de 3,12% – 1,56% e 6,25% – 3,12%, respectivamente. Conseqüentemente, esse bionanocompósito é um material

que pode ser utilizado na concepção de novos antissépticos solúveis em água, na formulação de revestimentos e materiais (lacas, corantes, plásticos antimicrobianos) e hidrogéis antimicrobianos.

As nanopartículas revestidas com gelatina podem também ser utilizadas em dispositivos de biossensores e materiais híbridos, uma vez que o revestimento de gelatina pode ajudar a sua ligação aos sistemas biológicos.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos com os bionanocompósitos, e levando-se em conta o grande potencial de aplicação das nanopartículas metálicas em sistemas biocompatíveis, a seguir são propostas algumas sugestões de trabalhos futuros:

– Preparação de partículas bimetálicas, efetuar a síntese das *NPsAg* na presença de outros metais, por exemplo, ouro (Au) ou platina (Pt).

– Síntese via química verde das *NPsAg* em outros biopolímeros como celulose e quitosana; utilização de outros agentes redutores na síntese das *NPsAg*, frutose, lactose, sacarose e amido.

– Utilização dos compósitos fibroína/*NPsAg* e gelatina/*NPsAg* na preparação de filmes e avaliação da atividade antimicrobiana desses materiais em bactérias e fungos.

– Preparação de filmes de fibroína/*NPsAg* e efetuar tratamentos de superfície ou incorporar outros materiais, por exemplo a adição de nanotubos de carbono, de maneira a melhorar propriedades mecânicas do material.

– Realização de estudos de degradação das *NPsAg* para elucidar mecanismos e interações químicas ocorridas durante processos de agregação/precipitação das partículas metálicas.

– Avaliar a seletividade e sensibilidade do sistema glicose/gelatina/*NPsAg* na presença de íons metálicos, monitorando alterações no comportamento da banda *plasmon* após a adição desses íons. Como íons metálicos poderiam ser utilizados: Fe^{2+} ou Fe^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , Na^+ e K^+ .

– Preparação de um material compósito gelatina/*NPsAg*/ TiO_2 ou gelatina/*NPsAg*/ SiO_2 em solução ou sólido para ser utilizado em atividades fotocatalíticas.

REFERÊNCIAS

ANNABI, N. *et al.* 25th Anniversary Article: Rational design and applications of hydrogels in medicine regenerative. **Advanced Materials**, v. 26, n. 3, p. 85-124, 2014.

BAYINDIR, M.; **Nanotechnology: Engineering a Better Future – A Key to Sustainable Development**, Wief Forum, Kuala Lumpur, Malaysia. Disponível em: slideplayer.com/slide/5764939. Acesso em: 10 ago. 2016.

BENSON, O. Assembly of hybrid photonic architectures from nanophotonic constituents. **Nature**, 480, p. 193-199, 2011.

BROCKMAN, J.M.; NELSON, B.P.; CORN, R.M. Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films. **Annual Review Physical Chemistry**, 51, pg. 41-63, 2000.

CALAFAT, M.E.; TORTUERO, G.V.G.; RIGUEIRO, J. P.; BAONZA, G.R.P. Usos médicos de la seda. **Investigación y Ciencia**, p. 28-35, 2011.

CHEN, W.; WU, W.; CHEN, H.; SHEN, Z. Preparation and characterization of noble metal nanocolloids by silk fibroin in situ reduction. **Science in China (Series B)**, v. 46, n.4, p.330-338, 2003.

COLOMBAN, P.; DINH, H. M.; BUNSELL, A.; MAUCHAMP, B. Origin of the variability of the mechanical properties of silk fibers: 1 – The relationship between disorder, hydration and stress/strain behaviour. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 43, p. 425-432, 2012.

COLOMBAN, P.; DINH, H. M.; TOURINÉ, V.; JAUZEIN, V. Origin of the variability of the mechanical properties of silk fibers: 3 – Order and macromolecule orientation in Bombyx mori bave, hand-strtched strings and Nephila madagascarensis spider fibres. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 43, p. 1042-1048, 2012.

DARDER, M.; ARANDA, P.; RUIZ-HITZKY, E. Bionanocomposites: A new concept of ecological, bioinspired, and functional hybrid materials. **Advanced Materials**, v. 19, p. 1309-1319, 2007.

DAS, S.; DHAR, B.B. Green synthesis of noble metal nanoparticles using cysteine-modified silk fibroin: catalysis and antibacterial activity. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 4, p. 46285-46292. 2014.

DONG, Q; SU, H.; CAO, W.; HAN, J.; ZHANG, D; GUO, Q. Biogenic snthesis of hierarchical hybrid nanocomposites and patterning of silver nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 110, p. 160-165, 2008.

DONG, Q; SU, H.; ZHANG, D. In situ depositing silver nanoclusters on silk fibroin fibers supports by a novel biotemplate redox technique at room temperature. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 17429-17434, 2005.

DUMAN, O. TUNÇ, S. Electrokinetic and rheological properties of Na-bentonite in some electrolyte solutions. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 117, p. 331-338.

DURÁN, N.; MARCAYO, P.D.; ALVES, O.L.; DESOUZA, G.L.H., ESPOSITO, E. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, p. 8, 2005.

DURÁN, N.; SILVEIRA, C.P.; DURÁN, M.; MARTINEZ, D.S.T. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. **Journal of Nanobiotechnology**, v.13 (55), p. 1-17, 2015.

EIGLER, M.; SCHWEIZER, E.K. "Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope" **Nature**, 334, p.524-526,1990.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2011 Disponível em: <https://global.britannica.com/technology/biotechnology>. Acesso em: 20 ago. 2016.

ERENO, D. Nanopartículas verdes. **Revista Fapesp**, 223, p. 70-73, 2014.

ESTEVES, A.C.C.; BARROS-TIMMONS, A. TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, p. 798-806, 2004.

FEI, X.; JIA, M.; DU, X.; YANG, Y.; ZHANG, R.; SHAO, Z.; ZHAO, X.; CHEN, X. Green Synthesis of Silk Fibroin-Silver Nanoparticle Composites with Effective Antibacterial and Biofilm-Disrupting Properties. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 4483-4488, 2013.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. An invitation to enter a new field of physics **Engineering and Science, California Institute of Technology**, 1960. Disponível em: <http://calteches.library.caltech.edu/47/3/ES.23.5.1960.0.pdf>. Acesso em: 08 fev. 2016.

GHORBANI, H.R.; SAFEKORDI, A.A.; ATTAR, H.; SORKHABADI, S.M.R. Biological and non-biological methods for silver nanoparticles synthesis. **Chemical Biochemical Engineering Q**, v. 25, p. 317-326, 2011.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatina from alternative sources: a review. **Food Hydrocolloids**, p. 1813-1827, 2011.

GOMEZ-ROMERO, P. Hybrid organic-inorganic materials - In search of synergic activity. **Advanced Materials**, v.13, n. 3, p. 163-174, 2001.

GROSS, S.; CAMOZZO, D.; DI NOTO, V.; ARMELAO, L; TONDELLO, E. PMMA: A key macromolecular component for dielectric low-kappa hybrid inorganic-organic polymer films. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 673-696, 2007.

HABIBI, Y.; LUCIA, L.A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3479-3500, 2010.

HAIDER, A.; KANG, I.K. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review. In: RAUWEL, P. et.al (Ed.). **Advances in Materials Science and Engineering, Silver Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications**, Hindawi Publishing Corporation, 2015. p. 1-16. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/amse/2015/165257/>. Acesso em: 20 de maio. 2015.

HANANI, Z.A.; ROOS, Y.H.; KERRY, J.P. Use and application of gelatin as potencial biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 71, p. 94-102, 2014.

HARDY, J.G.; RÖMER, L.M.; SCHEIBEL, T. R. Polymeric materials based on silk proteins. **Polymer**, v. 49, p. 4309-4327, 2008.

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Introduction to Nanoparticles. In: HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. (Ed.). **Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications**. Wiley Online Library, 2013, p. 1-24. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527648122>. Acesso em: 20 nov. 2015.

HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. **Carbohydrate Research**, 339 (15), p. 2627-2631, 2004.

JEONG, L.; PARK, W.H. Preparation and characterization of gelatina nanofibers containing silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 6857-6879, 2014.

JIN, R.; CAO, Y.; MIRKIN, C.A.; KELLY, K.L.; SCHATZ, G.C.; ZHENG, J.G. **Science**, 294, p.1901-1903, 2001.

JOACHIM, C.; PLÉVERT, L. **Nanociências: A revolução invisível**. Tradução de André Telles. Rio de Janeiro: Jorge Ed. Zahar, 2009.

JOHNSON-MCDANIEL D. ; BARRETT, C.A.; SHARAFI, A; SALGUERO, T.T. Nanoscience of na Ancient Pigment. **Journal of Americal Chemical Society**, 135 (5), p1677-1679, 2013.

KHARLAMPPIEVA, E.; KOZLOVSKAYA, V.; GUNAWIDJAJA, R.; SHEVCHENKO, V.V.; VAIA, R.; NAIK, R.R.; KAPLAN, D.L.; TSUKRUK, V.V. Flexible Silk–Inorganic Nanocomposites: From Transparent to Highly Reflective **Advanced Functional Materials**, v. 20, p. 840–846, 2010.

KIM, U.J.; PARK, J.; KIM, H. J.; WADA, M.; KAPLAN, D. L. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. **Biomaterials**, v. 26, p. 2775-2785, 2005.

KOMARNEMI, S. Nanocomposites. **Journal of Materials Chemistry**, p. 1219-1230, 1992.

KRUTYAKOV, Y.A.; KUDRINSKIY, A.A.; OLENIN, A.Y.; LISICHKIN, G.V. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. **Russian Chemical Reviews**, v. 77, n.3, p. 233-257, 2008.

KUNDU, B.; RAJKHOWA, R.; KUNDU, S. C.; WANG, X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 457-470, 2013.

KVÍTEK, L.; PANACEK, A.; SOUKUPOVÁ, J.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PRUCEK, R.; HOLECOVÁ, M.; ZBORIL, R. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). **Journal of Physical Chemistry C**, 112 (15), p. 5825-5834, 2008.

LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C.C. "Green Chemistry" – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26 (1), p. 123-129, 2003.

LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D.Y.; BRUNET, L.; LIGA, M.V.; LI, D.; ALVAREZ, P.J.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potencial applications and implications. *Water Research*, v. 42 (18), p. 4591-4602, 2008.

LI, M.; LU, S.; WU, Z; TAN, K.; MINOURA, N.; KUGA, S. Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 89-94, 2002.

LIU, T.B.; BURGER, C.; CHU, B. Nanofabrication in polymer matrices. **Progress Polymer Science**, v. 28, p. 5-26, 2003.

LU, Z; XIAO, J.; WANG, Y.; MENG, M. In situ synthesis of silver nanoparticles uniformly distributed on polydopamine-coated silk fibers for antibacterial application. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 452, p. 8-14, 2015.

LV, M.; GU, H.; YUAN, X.; GAO, J.; CAI, T. Investigation of 3D silvernanodendrite@glass as surface-enhanced Raman scattering substrate for the detection of Sildenafil and GSH. **Journal of Molecular Structure**, v. 1029, p. 75-80, 2012.

MADHU, R. K.; RAO, B. L.; ASHA, S.; NARAYANA, B.; BYRAPPA, K.; WANG, Y.; YAO, D.; Y. SANGAPPA, Y. Gamma radiation assisted biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Advanced Materials Letters**, v. 6(12), p.1088-1093, 2015.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymer**, v. 72, p. 43-51, 2008.

MEDGADGET. **Collagen peptide and gelatin – customized building blocks of body proteins**. Disponível em: www.Medgadget.com/2015/11/collagen-customized-building-blocks-of-body-proteins-2.html. Acesso em: 09 jan. 2017.

MENG, M.; HE, H.; XIAO, J.; ZHAO, P.; XIE, J.; LU, Z. Controllable in situ synthesis of silver nanoparticles on multilayered film-coated silk fibers for antibacterial application. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 369-375, 2016.

MILLER, M.M.; LAZARIDES, A.A. Sensitivity of metal nanoparticle surface plasmon resonance to the dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, 109, pg. 21556-21565, 2005.

NANO.GOV, NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. Disponível em: <http://www.nano.gov/timeline>. Acesso em: 07 fev. 2016.

NOWACK, B.; KRUG, H.F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 1177-1183, 2011.

PACIONI, N.L.; BORSARELLI, C.D.; REY, V.; VEGLIA, A.V. Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles: A Mechanistic Perspective. In: ALARCON, E. I. et al. (Ed.), **Silver Nanoparticle Applications, Engineering Materials**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015, p.13-46.

PAN, H.; ZHANG, Y.; HANG, Y.; SHAO, H.; HU, X.; XU, Y.; FENG, C. Significantly reinforced composite fibers electrospun from silk fibroin/carbon nanotube aqueous solutions. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2859-2867, 2012.

PANACEK, A.; KVÍTEK, L.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZÚROVA, N.; SHARMA, V.K.; NEVECNA, T.; ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **Journal of Physical Chemistry B**, 110 (33), p. 16248-16253, 2006.

PAUL, D.R.; ROBENSON, L.M. Polymer Nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187-3204, 2008.

PEREZ-JUSTE, J.; PASTORIZA-SANTOS, I.; LIZ-MARZAN, L.M.; MULVANEY, P. **Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications**. Coordination Chemistry Reviews, v. 249, p. 1870-1901, 2005.

POMOGAILO, A.D.; KESTELMAN, V.N. Metallopolymer Nanocomposites. In: HULL, R. et al. (Ed.), **Springer Series in Materials Science**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, p.133-141; p. 375-383.

QUINTEROS, M.A.; ARISTIZÁBAL, C.; DALMASSO, P.R.; PARAJE, M.G.; PÁEZ, P.L. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacteria genera and its relationship with the antimicrobial activity. **Toxicology in Vitro**, v. 36, p. 216-223, 2016.

RAI, M. Nanotecnologia verde: biossínteses de Nanopartículas metálicas e suas aplicações como Nanoantimicrobianos. Tradução de Germana Barata e Diego Stéfani. São Paulo: **Cienc. Cult.**, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013.

RAVEENDRAN, P.; Fu, J.; Wallen, S.L. Completely “Green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. **Journal of American Chemical Society**. 125, p.13940-13941, 2003.

REIBOLD, M.; PAUFLER, P.; LEVIN, A.A.; KOCHMANN, W.; PATZKE, N.; MEYER, D.C. Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. **Nature**, 444, p. 286, 2006.

REIDY, B.; HAASE, A.; LUCH, A.; DAWSON, K.; LYNCH, I. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. **Materials**, v. 6, p. 2295-2350, 2013.

ROCO, M.C.; **Nanotechnology Tomorrow**, NCN Meeting, Phoenix, Arizona. Disponível em: nanohug.org/resources/21226/download/2014.04.10-01-Roco-USERCONF.pdf. Acesso em: 27 dez. 2016.

ROY, S.; DAS, T.K. Plant Mediated Green Synthesis of Silver nanoparticles – A Review. **International Journal of Plant Biology Research**, v.3, p. 1044-1056, 2015.

SABA, N.; TAHIR, P.M.; JAWAID, M. A review on potentiality of nano filler/natural fiber filled polymer hybrid composites. **Polymer**, v. 6, n. 8, p. 2247-2273, 2014.

SANCHES, C.; ARRIBART, H.; GUILLE, M.M.G. Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. **Nature Materials**, v. 4, p. 277-288, 2005.

SANCHES, C.; BELLEVILLE, P.; POPALL, M.; NICOLE, L. Applications of advanced hybrid organic-inorganic nanomaterials: from laboratory to market. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 696-753, 2011.

SANCHES, C.; JULIÁN, B.; BELLEVILLE, P.; POPALL, M. Application of hybrid organic-inorganic nanocomposites. **Journal of Materials**, v. 35, n. 15, p. 3559-3592, 2005.

SANCHES, C.; SOLER-ILLIA G.; RIBOT, F.; LALOT, T.; MAYER, C.R.; CABUIL, V. Designed hybrid organic-inorganic nanocomposites from functional nanobuilding blocks. **Chemistry Materials**, v.13, p. 3061-3083, 2001.

SASHINA, E. S.; DUBKOVA, O. I.; NOVOSELOV, N. P.; GORALSKY, J. J.; SZYNKOWSKA, M.I.; LESNIEWSKA, E.; MANIUKIEWICZ, W.; STROBIN, G. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 82, p. 974-980, 2009.

SATO, Y.; WANG, J.J.; BATCHELDER, D.N.; Smith, D.A. Simple chemical method for forming silver surfaces with controlled grain sizes for surface plasmon experiments. **Langmuir**, v.19 (17), p. 6857-6861, 2003.

SRIUDOM, S.; NIAMSUP, H.; SAIPANYA, R.; WATANESK, R.; WATANESK, S. Role of silk fibroin and rice starch on some physical properties of hydroxyapatite-based composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 42722-42731, 2015.

SU, P.; WANG, C.; YANG, X.; CHEN, X.; GAO, C.; FENG, X.; CHEN, J.; YE, J.; GOU, Z. Electrospinning of chitosan nanofibers: The favourable effect of metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 239-246, 2011.

SUSHKO, M.L.; SHLUGER, A.L. DLVO theory for like-charged polyelectrolyte and surfasse interactions. **Materials Science and Engineering**, 27,p. 1090-1095, 2007.

TAI, C.; WANG, Y-H; LIU, H.S. A green process for preparing silver nanoparticles using spinning disk reactor. **AIChE J**, 54 (2), p.445-452, 2008.

TROUPIS, A.; HISKIA, A.; PAPAConstantinou, E. Synthesis of metal nanoparticles by using polyoxometalates as photocatalysts and stabilizers. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 1809-1972, 2002.

TXCHNOLOGIST. **3-D Printed synthetic boné displays future for composite materials**. Disponível em: txchnologist.com/post/54506899743/3-d-printed-synthetic-bone-displays-future-for. Acesso em: 12 dez. 2014.

UTTAYARAT, P; JETTAWATTANA, S.; SUWANMALA, P.; EAMSIRI, J.; TANGTHONG, T.; PONGPAT, S. Antimicrobial electrospun silk fibroin mats with silver nanoparticles for wound dressing application. **Fibers and Polymer**, v. 13, p. 999-1006, 2012.

VASIREDDY, R.; PAUL, R.; MITRA, A. Green synthesis of silver nanoparticles and the study of optical properties. **Nanomaterials, Nanotechnology**, v.2, p. 1-6, 2012.

VARNER, K. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development. **State of the science literature review: everything nanosilver and more. Scientific, technical, research, engineering and modeling support final report**. Washington (DC), 2010. Disponível em: <http://www.epa.gov/chemical-research/research-evaluating-nanomaterials-chemical-safety> . Acesso em: 12 dez. 2014.

VEPARI, C.; KAPLAN, D.L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p.991-1007, 2007.

VIGNESHWARAN, N.; NACHANE, R.P.; BALASUBRAMANYA, R.H.; VARADARAJAN, P.V. A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. **Carbohydrate Research**, 341 (12), p. 2012-2018, 2006.

WHITESIDES, G.M. Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. **Small**, v.1, n. 2, p. 172-179, 2005.

XIA, Y.; WANJ, J. Hierarchical silver nanodendrites: One-step preparation and application for SERS. **Materials Chemistry and Physics**, v. 125, p. 267-270, 2011.

YANG, K.K.; WANG, X.L.; WANG, Y.Z. Progress in nanocomposite of biodegradable polymer. **Journal of Industrial Engineering Chemical**, v. 13, p. 485-500, 2007.

YARRIS, L. **The evolutionary road to biofuels**. Disponível em: <http://www2.lbl.gov/Publications/YOS/feb/> . Acesso em: 29 dez. 2016.

YEN, H.J.; HSU, S.H.; TSAI, C.L. Cytotoxicity and immunological response of a gold and silver nanoparticles of diferente sizes. **Small**, v. 5 (13), p. 1553-1561, 2009.

YI, B.; CHEN, X.; GUO, K.; XU, L.; CHEN, C.; YAN, H. CHEN, J. High-performance carbon nanotube-implanted mesoporous carbon spheres for supercapacitors with low series resistance. **Materials Research Letters**, v. 46, p. 2168-2172, 2011.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1133-1174, 2015.

YU, W.; KUZUYA, T.; HIRAI, S.; TAMADA, Y.; SAWADA, K.; IWASA, T. Preparation of Ag nanoparticle dispersed silk fibroin compact. **Applied Surface Science**, v. 262, p. 212-217, 2012.

YUAN, J.; MULLER, A. H. E. One-dimensional organic-inorganic hybrid nanomaterials. **Polymer**, v. 51, p. 4015-4036, 2010.