

ROBERTO ANGELO DE OLIVEIRA

ESTUDO SOBRE A CONVERSÃO, FORMAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PELO  
MÉTODO DE TURKEVICH MODIFICADO

São Paulo  
2013

ROBERTO ANGELO  
DE OLIVEIRA

Estudo sobre a conversão, formação e desenvolvimento de  
nanopartículas de prata pelo método de Turkevich modificado

2013

ROBERTO ANGELO DE OLIVEIRA

ESTUDO SOBRE A CONVERSÃO, FORMAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PELO  
MÉTODO DE TURKEVICH MODIFICADO

Dissertação apresentada à Escola  
Politécnica da universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Engenharia

São Paulo  
2013

ROBERTO ANGELO DE OLIVEIRA

ESTUDO SOBRE A CONVERSÃO, FORMAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PELO  
MÉTODO DE TURKEVICH MODIFICADO

Dissertação apresentada à Escola  
Politécnica da universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Engenharia

Área de Concentração:  
Engenharia Química

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Marcelo Martins  
Seckler

São Paulo  
2013

**Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.**

**São Paulo,      de agosto de 2013.**

**Assinatura do autor** \_\_\_\_\_

**Assinatura do orientador** \_\_\_\_\_

#### **FICHA CATALOGRÁFICA**

**Oliveira, Roberto Angelo de**

**Estudo sobre a conversão, formação e desenvolvimento de nanopartículas de prata pelo método de Turkevich modificado / R.A. de Oliveira. -- versão corr. -- São Paulo, 2013.**

**109 p.**

**Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.**

**1.Nanotecnologia 2.Nanopartículas (Síntese) 3. Prata 4.Caracterização morfológica I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa, Vanessa.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Marcelo Martins Seckler, pela orientação, pelo estímulo, e principalmente, pela paciência durante todo o trabalho.

Aos amigos Luiz, André, Elisangela, Vinícius pelas conversas e descontrações.

À minha irmã, Monik, e ao Delmar, pela força e ajuda que sempre me deram.

À minha esposa, Vanessa, por estar sempre ao meu lado, me ajudando sempre que foi possível.

Transportai um punhado de terra todos  
os dias e fareis uma montanha.

(Confúcio)



## RESUMO

Pretendeu-se, com este trabalho, estudar a síntese e o desenvolvimento de nanopartículas de prata, utilizando o método de Turkevich com algumas modificações. Dada a importância dessas nanopartículas no atual desenvolvimento científico, é de grande valia o melhor entendimento dos mecanismos que regem a síntese e desenvolvimento das nanopartículas de prata. Neste método, nitrato de prata sofre redução pelo citrato de sódio, numa mistura aquecida e bem agitada, para formar as nanopartículas. Amostras dessa mistura foram coletadas em vários intervalos de tempo, e reservadas para análises de concentração de prata por ICP-AES, absorvância UV-Vis, imagens de MEV e distribuição de tamanhos por DLS. Com essas análises, foi possível estabelecer uma relação direta entre os valores de absorvância e os de conversão de prata. Também foi possível propor uma rota de desenvolvimento das nanopartículas, mostrando que, durante esse desenvolvimento, as partículas apresentam diferentes morfologias, tamanhos e tendência a formar aglomerados. Dependendo da aplicação das nanopartículas de prata, é possível interromper a reação quando elas apresentarem as características mais favoráveis.

Palavras-chave: Síntese. Nanopartícula de Prata. Mecanismo de crescimento. Conversão.

## **ABSTRACT**

It was intended, with this work, to study the synthesis and development of silver nanoparticles using the Turkevich method with some modifications. Given the importance of these nanoparticles in the current scientific development, it is of great value the better understanding of the mechanisms governing the synthesis and growth of silver nanoparticles. In this method, silver nitrate is reduced by sodium citrate, in a well-stirred and heated mixture to form nanoparticles. Samples of this mixture were taken at various time intervals, and reserved for analysis of silver concentration by ICP-AES, UV-Vis absorbance, SEM images and size distribution by DLS. With these analyzes, it was possible to establish a direct relationship between the absorbance values and the conversion of silver. It was also possible to propose a synthesis and growth pathway of the silver nanoparticles, showing that during this development, the particles have different morphologies, sizes and tendencies to form agglomerates. Depending on the application of silver nanoparticles, it is possible to stop the reaction when they have the most favorable characteristics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de oxidação do citrato em dicarboxilcetona.....	19
Figura 2 - Grau de ionização dos íons de citrato, em função do pH.....	21
Figura 3 – Esquema mostrando os possíveis mecanismos de atuação da prata. ....	23
Figura 4 (AshaRani et al., 2009) - Bactérias antes (a) e depois (b) do ataque de nanopartículas de prata.....	26
Figura 5 - Reator encamisado em funcionamento .....	28
Figura 6 - Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo, do experimento realizado a 90 °C e pH 9 – ensaio 24. ....	34
Figura 7 - Absorbância ao longo do tempo, pH 9 e temperaturas de 85, 90 e 95 °C	35
Figura 8 - Absorbância ao longo do tempo, pH 7 e temperaturas de 85, 90 e 95 °C. ....	36
Figura 9 - Curvas comparativas de absorbância a 95 °C e valores de pH 7 e 9. ....	36
Figura 10 - Distribuição de tamanhos por DLS das partículas do experimento 3, em pH 8 e 85 °C, ao final da reação .....	37
Figura 11 - Nanopartículas no estágio inicial da reação, geradas a 90 °C e pH 7, 20 minutos de reação.....	41
Figura 12 - Nanopartículas no estágio inicial da reação, geradas a 85 °C e pH 7, 20 minutos de reação.....	41
Figura 13 - Nanopartículas em estágio intermediário da reação, geradas a 95 °C e pH 7, 40 minutos de reação. ....	42
Figura 14 - Nanopartículas em estágio intermediário da reação, geradas a 90 °C e pH 9, 20 minutos de reação. ....	42
Figura 15 - Nanopartículas no estágio final da reação, geradas a 95 °C e pH 9, 40 minutos de reação.....	43

Figura 16 - Nanopartículas no estágio final da reação, geradas a 85 °C e pH 8, 40 minutos de reação.....	43
Figura 17 - Nanopartículas no estágio final da reação, geradas a 95 °C e pH 8, 40 minutos de reação - Nota-se a presença de alguns bastonetes e triângulos. ....	44
Figura 18 – Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 10 minutos de reação.....	46
Figura 19 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 15 minutos de reação. ....	47
Figura 20 – Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 20 minutos de reação.....	48
Figura 21 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 40 minutos de reação. ....	49
Figura 22 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 60 minutos de reação. ....	50
Figura 23 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 80 minutos de reação. ....	51
Figura 24 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 120 minutos de reação. ....	52
Figura 25 - Concentrações de prata iônica e total ao longo do tempo para ensaio a pH 8 e 90 °C. ....	54
Figura 26 - Evolução da conversão em 3 experimentos de diferentes condições. ...	55
Figura 27 - Mecanismo de nucleação e crescimento das partículas. $k_g$ é a constante de crescimento (growth) e $k_{OR}$ é a constante do amadurecimento de Ostwald (Ostwald Ripening). ....	57
Figura 28 - Conversão e absorvância ao longo do tempo, a 95 °C e pH 7. ....	58
Figura 29 - Conversão e absorvância ao longo do tempo, a 90 °C e pH 8. ....	58
Figura 30 - Conversão e absorvância ao longo do tempo, a 95 °C e pH 9. ....	59
Figura 31 - Evolução da absorvância em 3 experimentos de diferentes condições. ....	60
Figura 32 - Evolução da conversão e da absorvância relativa ao longo do tempo, em pH 7 e 95 °C. ....	61

Figura 33 - Evolução da conversão e da absorbância relativa ao longo do tempo, em pH 8 e 90 °C. ....	61
Figura 34 - Evolução da conversão e da absorbância relativa ao longo do tempo, em pH 9 e 95 °C. ....	62
Figura 35 - Relação entre Conversão e Absorbância Relativa, em pH 7 e 95 °C.....	63
Figura 36 - Relação entre Conversão e Absorbância Relativa, em pH 8 e 90 °C.....	63
Figura 37 - Relação entre Conversão e Absorbância Relativa, em pH 9 e 95 °C.....	64
Figura 38 - Correlação entre conversão e absorbância relativa dos 3 ensaios. ....	64
Figura A 1 - 85 °C, pH 7, aos 10 minutos de reação.....	75
Figura A 2 - 85 °C, pH 7, aos 20 minutos de reação.....	76
Figura A 3 - 85 °C, pH 7, aos 30 minutos de reação.....	77
Figura A 4 - 85 °C, pH 7, aos 40 minutos de reação.....	78
Figura A 5 - 85 °C, pH 7, aos 60 minutos de reação.....	79
Figura A 6 - 85 °C, pH 7, aos 80 minutos de reação.....	80
Figura A 7 - 85 °C, pH 7, aos 120 minutos de reação.....	81
Figura A 8 - 90 °C, pH 7, aos 10 minutos de reação.....	82
Figura A 9 - 90 °C, pH 7, aos 20 minutos de reação.....	83
Figura A 10 - 90 °C, pH 7, aos 30 minutos de reação.....	84
Figura A 11 - 90 °C, pH 7, aos 40 minutos de reação.....	85
Figura A 12 - 90 °C, pH 7, aos 60 minutos de reação.....	86
Figura A 13 - 90 °C, pH 7, aos 80 minutos de reação.....	87
Figura A 14 - 90 °C, pH 7, aos 120 minutos de reação.....	88

Figura A 15 - 95 °C, pH 7, aos 10 minutos de reação.....	89
Figura A 16 - 95 °C, pH 7, aos 20 minutos de reação.....	90
Figura A 17 - 95 °C, pH 7, aos 30 minutos de reação.....	91
Figura A 18 - 95 °C, pH 7, aos 40 minutos de reação.....	92
Figura A 19 - 95 °C, pH 7, aos 60 minutos de reação.....	93
Figura A 20 - 95 °C, pH 7, aos 80 minutos de reação.....	94
Figura A 21 - 95 °C, pH 7, aos 120 minutos de reação.....	95
Figura A 22 - 85 °C, pH 8, aos 15 minutos de reação.....	96
Figura A 23 - 85 °C, pH 8, aos 90 minutos de reação.....	97
Figura A 24 - 85 °C, pH 8, aos 120 minutos de reação.....	98
Figura A 25 - 85 °C, pH 9, aos 10 minutos de reação.....	99
Figura A 26 - 85 °C, pH 9, aos 20 minutos de reação.....	100
Figura A 27 - 85 °C, pH 9, aos 40 minutos de reação.....	101
Figura A 28 - 85 °C, pH 9, aos 60 minutos de reação.....	102
Figura A 29 - 85 °C, pH 9, aos 90 minutos de reação.....	103
Figura A 30 - 85 °C, pH 9, aos 120 minutos de reação.....	104
Figura A 31 - 95 °C, pH 9, aos 10 minutos de reação.....	105
Figura A 32 - 95 °C, pH 9, aos 15 minutos de reação.....	106
Figura A 33 - 95 °C, pH 9, aos 40 minutos de reação.....	107
Figura A 34 - 95 °C, pH 9, aos 60 minutos de reação.....	108
Figura A 35 - 95 °C, pH 9, aos 120 minutos de reação.....	109

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
3.1 Produtos no mercado com nanopartículas de prata.....	16
3.2 Impactos das nanopartículas de prata sobre a saúde.....	17
3.3 Ressonância de plasmon .....	17
3.4 Método de Turkevich de síntese de nanopartículas de prata.....	19
3.5 Ação bactericida.....	22
<b>4 Materiais e Métodos.....</b>	<b>28</b>
4.1 Materiais .....	28
4.2 Procedimento para síntese das nanopartículas .....	29
4.3 Métodos de caracterização .....	30
4.4 Conversão.....	31
<b>5 Resultados e Discussão.....</b>	<b>32</b>
5.1 Estudos exploratórios.....	32
5.2 Análise morfológica da cristalização.....	44
5.3 Conversão.....	53
5.4 Relação entre conversão e absorvância.....	57
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>67</b>
<b>7 Bibliografia .....</b>	<b>69</b>
<b>8 Anexo A – Imagens MEV .....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata têm atraído muita atenção nos últimos anos. Segundo um relatório recente (PEN, 2011), o número de produtos catalogados contendo nanotecnologia cresceu de 54 em 2005 para 1317 em 2010. Em março de 2011, haviam 1393 produtos catalogados, sendo que 313 contêm nanopartículas de prata.

Essa atenção é devida às propriedades peculiares das nanopartículas de prata. Dentre as mais interessantes, podemos citar suas propriedades como catalisador (Jana e Pal, 2007), habilidade de intensificar o espalhamento RAMAN e fluorescência (Leopold e Lendl, 2003; Szmazinski et al., 2008), e ação bactericida (Marambio-Jones e Hoek, 2010).

Como antimicrobiano, as nanopartículas de prata são usadas em purificação de ar e água, produção alimentícia, cosméticos, roupas, itens de higiene pessoal, produtos infantis, dispositivos médico-hospitalares e implantes (Chen e Schluesener, 2008).

Dentre os dispositivos médico-hospitalares mais utilizados, encontram-se os cateteres. Cateteres venosos centrais são empregados em pacientes graves para administrar fluidos, hemoderivados e nutrição parenteral. Infelizmente, o uso desses dispositivos está associado à maioria dos casos de infecção da corrente sanguínea. Somente nos Estados Unidos, dos 5 milhões de pacientes cateterizados anualmente, cerca de 400 000 (8%) desenvolvem infecção, aumentando em média, 6,5 dias de internação em unidades de terapia intensiva, a um custo aproximado de US\$ 29 000,00 por paciente (Mermel, 2000 e Mermel et al., 2001). Dos métodos para se evitar essas infecções, um muito promissor é o uso de cateteres revestidos de nanopartículas de prata.

As características químicas e físicas das partículas têm forte influência em seu poder bactericida. Tamanho, forma e oxidação da superfície são fatores importantes que determinam o poder de atuação sobre microorganismos. Foi demonstrado que partículas triangulares têm um maior efeito bactericida, seguido das partículas



esféricas, e dos bastonetes (Pal et al., 2007). Também foi demonstrado que nanopartículas sintetizadas em ambientes isentos de oxigênio não apresentam poder antimicrobiano, enquanto que partículas com a superfície parcialmente oxidada apresentaram efeito bactericida (Lok et al., 2007). O efeito bactericida também foi relacionado ao tamanho das partículas, de forma que as menores apresentam melhores resultados (Martínez-Castañón et al., 2008).

Dentre as diversas formas de se sintetizar nanopartículas de prata, as mais comuns e mais simples são as rotas químicas, envolvendo algum sal solúvel de prata (como o nitrato de prata,  $\text{AgNO}_3$ ), um agente redutor, como o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), íon citrato (proveniente do ácido cítrico, ou do sal citrato de sódio), hidrazina, hidroxilamina, glicose, ácido ascórbico, ácido gálico, além de um agente estabilizante, como PVP (poli vinil pirrolidona), PVA (poli vinil álcool), PEG (poli etileno glicol), citrato e ácido poli-láctico, para diminuir o grau de agregação e controlar o tamanho (Maria et al., 2010; Yan et al., 2007; Lok et al., 2007; Paula et al., 2007).

Entre as sínteses químicas, vêm ganhando destaque as que se utilizam dos “princípios da química verde”, que envolvem a preocupação de se utilizar de reagentes não perigosos, não tóxicos ou pouco tóxicos para a saúde humana e o meio ambiente, além de não gerar produtos de reação perigosos ou tóxicos (Dahl et al., 2007). Das sínteses verdes, o método de Turkevich apresenta pontos interessantes, por ser um método rápido, simples, fácil, de baixo custo, com boa reprodutibilidade e seguro, pois usa água como solvente e citrato de sódio como agente redutor e estabilizante (Turkevich et al., 1951).

Dada a importância das nanopartículas e o potencial do uso em diversas áreas, faz-se necessário um melhor entendimento do mecanismo de formação e desenvolvimento dessas partículas, assim como a influência de certos parâmetros nesse mecanismo.

Para tanto, neste trabalho foi empregado o método de Turkevich com algumas modificações para sintetizar as nanopartículas de prata. Foram analisadas características das partículas, como distribuição de tamanho, grau de aglomeração,

além da conversão da reação e sua relação com a absorvância da dispersão. Também foram avaliadas as influências da temperatura e pH na evolução das partículas ao longo do tempo.

## **2 OBJETIVO**

Este trabalho teve como objetivo estudar como nanopartículas de prata se desenvolvem ao longo do tempo durante sua síntese por redução do nitrato de prata, usando citrato de sódio como agente redutor e estabilizante. Foram estudadas as características morfológicas das nanopartículas, como seu tamanho, forma e grau de aglomeração em diferentes condições de temperatura e pH.

Também foi estudado o desenvolvimento da reação, em termos da conversão de prata iônica a metálica, a relação entre conversão e a absorbância no espectro ultravioleta e visível, e o desenvolvimento morfológico em função de variáveis como pH e temperatura de reação.

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Produtos no mercado com nanopartículas de prata**

Segundo um relatório do PEN (The Project on Emerging Nanotechnologies) lançado em março de 2011, o número de produtos contendo nanotecnologia cresceu de 54 em 2005 para 1317 em 2010. Em março de 2011, haviam 1393 produtos catalogados, sendo que o material mais utilizado foi a prata, em 313 produtos, seguido do carbono, em 91 produtos (PEN, 2011). A maior parte dos produtos com prata busca utilizar os efeitos bactericidas das nanopartículas. Dentre os produtos catalogados, encontramos vasilhames para guardar alimentos, placa para cortar alimentos, amaciante de roupas, fronhas, lençol, toalha de banho, meias, travesseiros, sprays antimicrobianos, suplementos líquidos de minerais, suplementos alimentares, desinfetantes, placas de alisamento de cabelo e “babyliiss”, secadores de cabelo, mamadeiras, canecas, mordedores para bebês, gaze e esparadrapo, emplastos para ferimentos, camisinha, lubrificante íntimo com espermicida, filtro de ar condicionado, roupas íntimas, solução algicida para piscina, “spray” nasal, desinfetantes para limpeza doméstica, aparelhos refrigeradores, aspiradores de pó, máquinas de lavar roupas, cosméticos, limpadores de dentaduras, desodorantes, lenços umedecidos, umidificadores e purificadores de ar, roupas de mergulho e surf, equipamentos de informática e telefones celulares com revestimento de nanopartículas de prata, luvas para limpeza doméstica, palmilhas de calçados, creme dental, dispersões aquosas de nanopartículas, “spray bucal”, escova de dente, detergentes, produtos para cabelo e maquiagens, xampu e condicionador, tecidos para usos hospitalares, batons, sabonetes, chupetas, e todos os tipos de roupas, além de cateter antibacteriano.

### **3.2 Impactos das nanopartículas de prata sobre a saúde**

Hatzigrigoriou e Papaspyrides (2011) discutiram o uso de nanotecnologia em vasilhames plásticos para armazenamento de alimentos, e mostraram que ainda faltam estudos sobre impactos na saúde e sobre a possibilidade das nanopartículas migrarem do vasilhame para os alimentos.

Chen e Schluesener (2008) discutiram que, apesar dos inúmeros produtos que se utilizam das nanopartículas de prata, muito poucos são voltados para uso médico-hospitalar, se limitando a alguns produtos para cobrir ferimentos, instrumentos cirúrgicos, e algumas próteses. Entretanto, devido aos crescentes estudos em nanotecnologia, a tendência é que cada vez mais produtos hospitalares sejam desenvolvidos, fazendo com que o entendimento de potenciais impactos das nanopartículas de prata sobre os diversos tipos de tecido do corpo humano seja cada vez mais necessário. Outro ponto interessante levantado por eles é que, apesar da exposição à prata gerar apenas problemas menores, como argíria (doença causada pela absorção de prata pelo organismo, cujo principal sintoma é a pele azulada), e que são conhecidos poucos casos de envenenamento por prata em trabalhadores com extrema exposição ao metal, partículas de prata podem ter efeitos diferentes no organismo humano, e poucos trabalhos tentam mostrar os efeitos citotóxicos das nanopartículas de prata.

### **3.3 Ressonância de plasmon**

Uma característica interessante das nanopartículas de prata (na verdade, de qualquer nanopartícula metálica) se refere às bandas plasmon. Quando radiação eletromagnética de um determinado comprimento de onda incide sobre nanopartículas metálicas, os elétrons mais externos das partículas entram em ressonância com a onda de radiação, gerando uma absorção muito maior do que se

tem em corpos maiores. São absorvidas ondas de comprimentos específicos, dependendo, entre outras coisas, do metal constituinte, do tamanho médio e da forma das partículas, e do meio dispersante (viscosidade, íons e moléculas presentes, etc). As nanopartículas de prata, por exemplo, tem uma absorção característica de comprimentos de onda em torno de 400 nm, sendo que o tamanho das partículas influencia diretamente a posição do pico de absorção, ou seja, partículas menores apresentam um pico de absorção em comprimentos de ondas menores, e partículas maiores absorvem comprimentos de onda maiores. Assim, a distribuição de tamanhos das nanopartículas determina a largura da curva de absorção. Populações de partículas com tamanhos muito próximos apresentam curvas bem estreitas, enquanto que populações polidispersas apresentam curvas de absorção mais largas (Leopold e Lendl, 2003; Brandl et al.,2006).

Como o efeito plasmon é causado pela ressonância dos elétrons da superfície das nanopartículas, alterações nessas superfícies geram alterações nas bandas de absorção. Isso faz com que partículas de determinados metais, como prata e ouro, apresentem um alto potencial de aplicação no ramo de detecção ótica de vários compostos que apresentem ligações características com a superfície desses metais. Como as superfícies das nanopartículas de prata e ouro podem ser conjugadas facilmente a ligantes de relevância biológica, muitas estratégias de detecção de biomoléculas estão em desenvolvimento (Lu et al., 2009). Como exemplos, podemos citar trabalhos discutindo o uso de nanopartículas de prata na detecção de cristal violeta, que é usado em bancos de sangue para eliminar parasitas da doença de Chagas (Santana et al., 2006), e a detecção de íons de mercúrio em concentrações na ordem de partes por bilhão (Bera et al., 2010).

### 3.4 Método de Turkevich de síntese de nanopartículas de prata

O método do citrato foi proposto inicialmente por Turkevich em 1951, para a síntese de nanopartículas de ouro, e em 1982, foi adaptado por Lee e Meisel para a síntese de nanopartículas de prata (Turkevich et al., 1951; Lee e Meisel, 1982).

O método consiste em aquecer uma solução de nitrato de prata até a ebulição, e adicionar uma solução contendo citrato de sódio. O citrato de sódio ( $C_6H_5Na_3O_7$ ) se oxida, formando dicarboxilcetona e liberando elétrons que reduzem os íons de prata. A Figura 1 mostra a reação de oxidação do ácido cítrico. Embora haja formação de íons  $H^+$ , o pH do meio reacional não muda muito, pois as concentrações são relativamente baixas, e a variação de pH podem ser de, no máximo, 0,5 (Jiang et al., 2009).

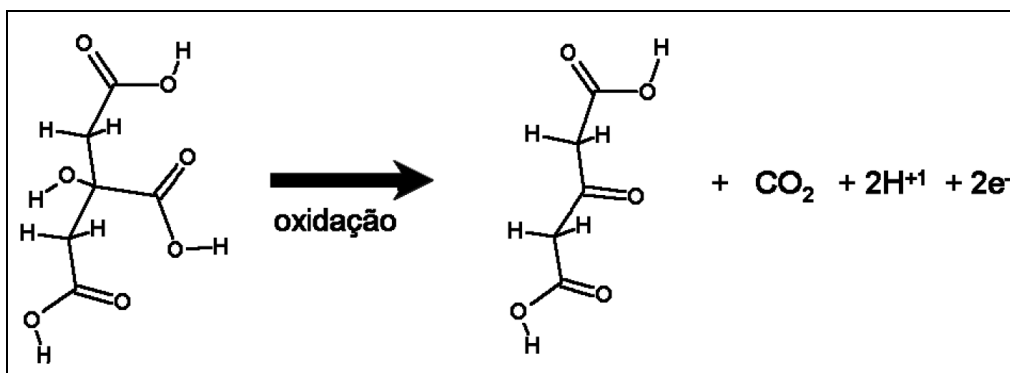


Figura 1 - Reação de oxidação do citrato em dicarboxilcetona

Turkevich explorou muito esse método, chegando à conclusão de que, com simples mudanças nos parâmetros de reação, como a razão entre concentrações de citrato e de sal de ouro, poderia alterar o tamanho das partículas e a velocidade de reação. Mostrou que quanto mais citrato havia em excesso, menores eram as partículas de ouro geradas e mais rápida a reação, mas para proporções molares maiores que 3:1

de citrato:ouro, a diminuição no tamanho e o aumento da velocidade de reação eram insignificantes.

A síntese de nanopartículas de prata, no entanto, não segue a mesma regra. Demonstrou-se que, com o aumento da razão entre citrato e prata, a reação ficava mais lenta e as partículas maiores (Jiang et al., 2010; Pillai et al., 2004).

Uma hipótese que explicaria isso diz que os íons citrato têm uma forte afinidade com a prata, formando complexos com os precursores  $Ag_2^+$  e  $Ag_4^{+2}$ . Dessa forma, muitos átomos de prata metálica são retidos pelos íons de citrato, dificultando a formação dos núcleos primários.

Outro ponto importante a respeito dos íons de citrato é o fato deles terem 3 espécies diferentes, dependendo do pH do meio, podendo ser totalmente desprotonado ( $Cit^{-3}$ ), monoprotonado ( $H_1Cit^{-2}$ ), diprotonado ( $H_2Cit^{-1}$ ), ou ficar em sua forma não ionizada ( $H_3Cit$ ). Dessas espécies, a mais reativa é a totalmente desprotonada ( $Cit^{-3}$ ), a qual é favorecida em valores de pH alcalinos. A figura 2 mostra o grau de ionização, em função do pH. Pode-se ver que em pH 7 a maior parte dos íons se encontram nas formas desprotonada e monoprotonada, quando o pH atinge 8 e 9, os íons estão quase que totalmente na forma desprotonada (Patungwasa e Hodak, 2008).



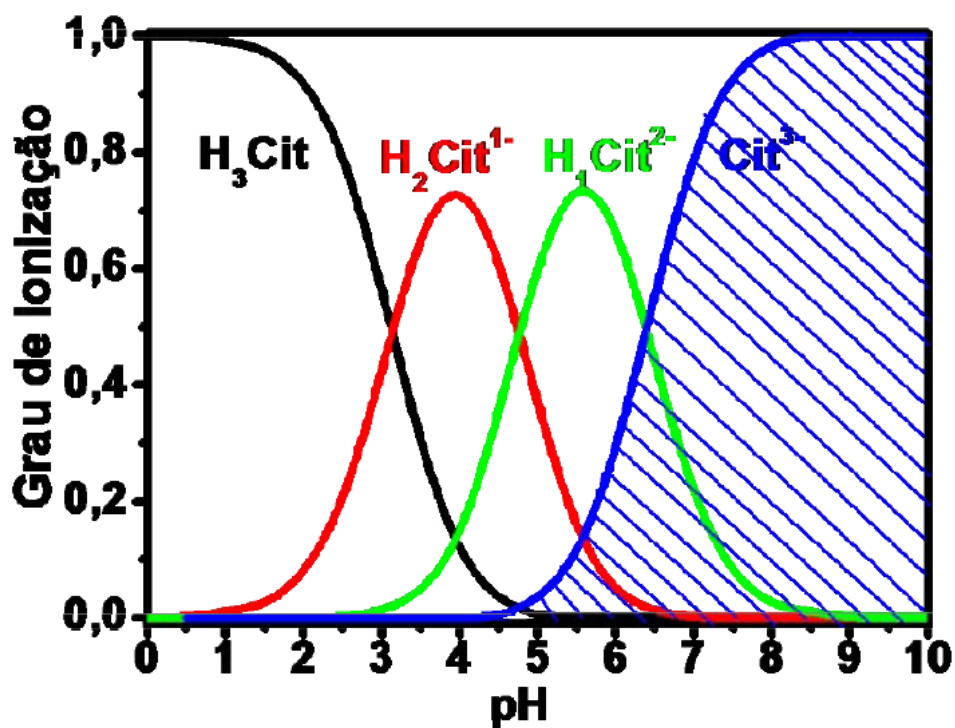


Figura 2 - Grau de ionização dos íons de citrato, em função do pH

Essa característica do citrato em assumir diferentes espécies dependendo do pH nos oferece a possibilidade de termos diferentes partículas para valores diferentes de pH. Em pH 6, por exemplo, com a predominância de  $Cit^{2-}$ , foram produzidas nanopartículas de ouro em torno de 100 nm, enquanto que em pH 8, o tamanho se reduziu para 20 nm (Turkevich et al., 1954).

Apesar de alguns trabalhos citarem os efeitos do pH e temperatura sobre a formação de nanopartículas de prata, estudos detalhados sobre a evolução das partículas ao longo do tempo, da conversão da reação ainda são escassos.

### 3.5 Ação bactericida

Apesar de a prata ter propriedades antimicrobianas conhecidas há muito tempo, o mecanismo de ação ainda não foi completamente desvendado. Entre as hipóteses de mecanismo de atuação, temos três que são as mais comuns (Marambio-Jones and Hoek, 2010):

- Geração de ROS (Reactive Oxygen Species) pelas nanopartículas e pelos íons  $\text{Ag}^+$ ;
- Absorção de  $\text{Ag}^+$  pelas células, seguida de quebra de produção de ATP (Adenosina tri-fosfato) e da replicação de DNA; e
- Dano direto à membrana pelas nanopartículas.

A Figura 3 ilustra os diversos mecanismos, que serão apresentados com maiores detalhes a seguir.

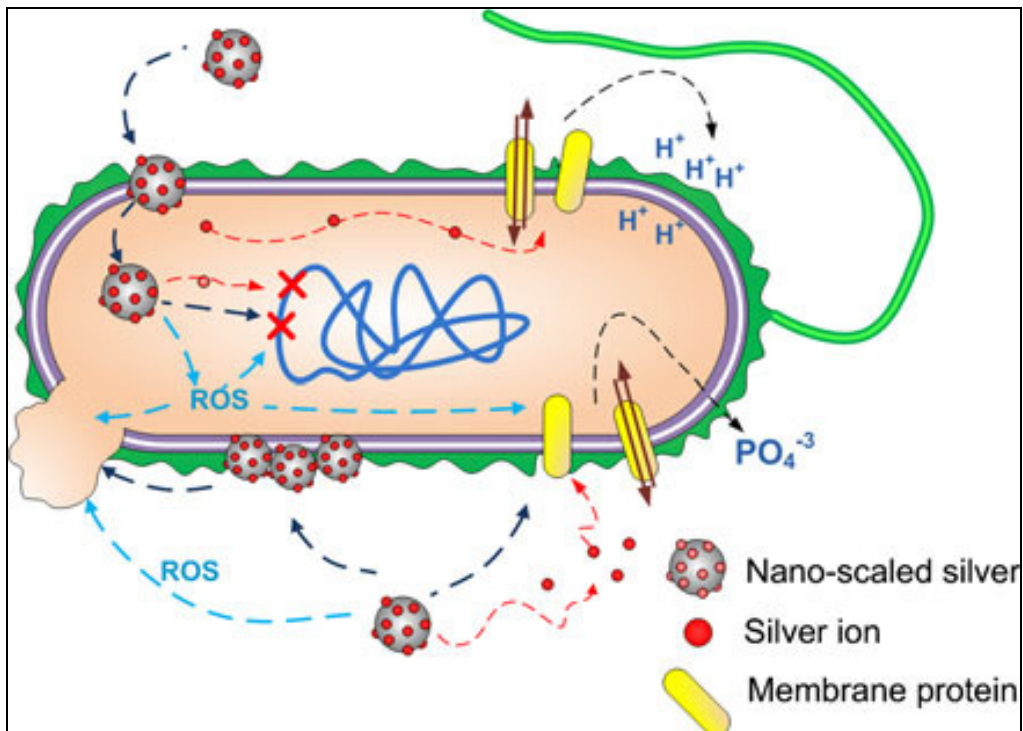
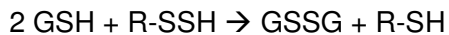


Figura 3 – Esquema mostrando os possíveis mecanismos de atuação da prata.

### Geração de ROS (Reactive Oxygen Species)

Dentro das células, pequenas quantidades de ROS são produzidas naturalmente, como subprodutos do metabolismo celular. Essas pequenas quantidades de ROS são controladas pelas defesas antioxidantes, formadas principalmente pelo equilíbrio entre a glutatona (GSH) e o dissulfeto de glutatona (GSSG), conforme as equações abaixo:



Caso esse mecanismo venha a falhar, permitindo que aumente a concentração de ROS intracelular, esse excesso de ROS pode atacar não apenas a membrana, causando seu rompimento, mas também as mitocôndrias, alterando a respiração e

geração de energia, ou ainda o DNA, causando morte da célula, ou alterando a divisão celular (Nel et al., 2006; Mendis et al., 2005).

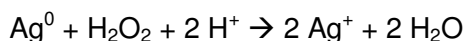
Metais de vários tipos, incluindo a prata, podem atuar como catalisadores na formação de ROS. As nanopartículas de prata podem se ligar diretamente na GSH, na GSH redutase ou outras enzimas de manutenção do equilíbrio GSH/GSSG.  $\text{Ag}^+$  também pode gerar ROS ao atuar como receptor de elétrons. Dessa forma, um excesso de ROS é gerado dentro dos microorganismos, seja pelo aumento da produção de ROS, seja pelo ataque ao equilíbrio de antioxidantes (Stohs and Bagchi, 1995; Carlson et al., 2008).

Estudo em bactérias nitrificantes mostra que, além de  $\text{Ag}^+$  e  $\text{AgCl}$ , nanopartículas de prata são capazes de induzir a geração de ROS intracelular, e que a inibição bacteriana está diretamente ligada ao aumento da geração de ROS induzida por cada espécie de prata. Mas, numa mesma concentração de ROS, nanopartículas são mais bactericidas, indicando que as nanopartículas possuem algum mecanismo antimicrobiano além da formação de ROS (Choi e Hu, 2008).

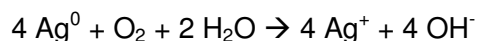
Outros estudos mostram, ainda, que o efeito bactericida é muito dependente da presença de oxigênio, e que nanopartículas de prata e nitrato de prata têm seu efeito reduzido na presença de antioxidantes, podendo até não ter efeito antimicrobiano nenhum em caso de excesso de antioxidantes (Yoon et al., 2008a, b; Kim et al., 2007).

### **Geração de $\text{Ag}^+$ das nanopartículas e absorção pelos microorganismos**

AshaRani et al. propõem que nanopartículas de prata entram nas células e são atacadas por peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), liberando íons de prata. Isso aconteceria nas mitocôndrias, onde há um excesso de  $\text{H}^+$  (AshaRani et al., 2009):



Choi et al. sugerem outro mecanismo. A prata seria atacada pelo oxigênio, liberando íons de prata. Isso pode acontecer fora da célula, com posterior absorção dos íons, ou dentro da célula, após a nanopartícula ser absorvida (Choi et al., 2008):



Outros estudos dizem que o  $\text{Ag}^+$  interage com enzimas da cadeia respiratória, como NADH desidrogenase, atrapalhando a síntese de ATP (adenosina trifosfato). Ou ainda com proteínas de transporte da membrana, causando fuga de  $\text{H}^+$ , destruindo a força motriz protônica. A força motriz protônica é causada pela diferença de concentrações de íons entre dois lados de uma membrana. Essa diferença possui uma energia potencial, que é utilizada pela célula para ativar diversos mecanismos (Dibrov et al., 2002; Holt and Bard, 2005; Lok et al., 2006).

A interação entre  $\text{Ag}^+$  e proteínas é causada pela afinidade entre íons de prata e grupos com enxofre e nitrogênio, muito presentes em proteínas do ciclo respiratório e de transporte (Holt and Bard, 2005; Liau et al., 1997; Petering, 1976).

Íons de prata aumentam a frequência com que ocorrem mutações do DNA em reações em cadeia de polimerase, e bactérias expostas a doses milimolares de  $\text{Ag}^+$  sofrem mudanças morfológicas, como diminuição de citoplasma, desgrudamento da parede celular e degradação da membrana celular, causando vazamento de organelas. Também ocorrem mudanças fisiológicas, de forma que as bactérias continuam ativas, mas a reprodução é inativada (Feng et al., 2000; Jung et al., 2008; Yang et al., 2009).

#### **Dano direto à membrana celular**

Partículas de prata interagem com a membrana, e são capazes de entrar nas células. Imagens de TEM (Figura 4) mostram que partículas entram na célula e deixam “buracos” na membrana (Choi et al., 2008; Raffi et al., 2008; Sondi and Salopek-Sondi, 2004).

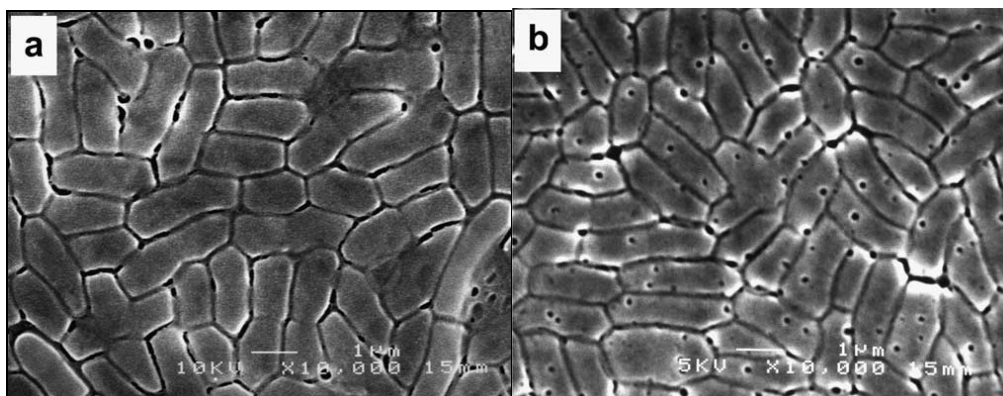


Figura 4 (AshaRani et al., 2009) - Bactérias antes (a) e depois (b) do ataque de nanopartículas de prata

Um trabalho mostra que partículas menores do que as partículas originais foram encontradas no interior das bactérias, indicando dissolução das nanopartículas. Partículas com superfície oxidada induziram “buracos” na parede celular, matando microorganismos (Smetana et al., 2008).

Morones et al. relatam que somente partículas menores que 10 nm penetram ou aderem em células de *V. cholera*, *P. aeruginosa* e *S. typhus* (Morones et al., 2005). No entanto, Xu et al mostraram que partículas de até 80 nm foram transportadas para dentro das células de *P. aeruginosa* (Xu et al., 2004). Esses trabalhos mostram que ainda não está bem definido o tamanho máximo que uma nanopartícula de prata pode ter para conseguir entrar nos microorganismos.

Nanopartículas de prata revestidas de Myramistin® mostraram ataque bactericida maior. Supõe-se que este revestimento altera a permeabilidade da membrana celular, facilitando a entrada das partículas (Vertelov et al., 2008)

Uma hipótese de como as nanopartículas interagem com a membrana celular considera que há uma atração eletrostática entre as partículas carregadas positivamente e a membrana carregada negativamente (Raffi et al., 2008), mas isso não explica como partículas carregadas negativamente também são afetadas.

Também foi proposto que as partículas interagem com os grupos sulfonados das proteínas da membrana – de modo similar aos íons de prata que se ligam às proteínas da respiração e de transporte (Morones et al., 2005).

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Materiais

Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), citrato de sódio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) e ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) em grau analítico (Sigma Aldrich Brasil) foram utilizados sem tratamentos adicionais. Água milli-Q foi usada em todas as preparações.

Para realizar os experimentos, utilizou-se de um reator encamisado de vidro, com agitação mecânica constante e vigorosa. O reator é um recipiente cilíndrico, vertical, de vidro, encamisado, provido de tampa e condensador de refluxo. A Figura 5 mostra uma imagem do reator em funcionamento.

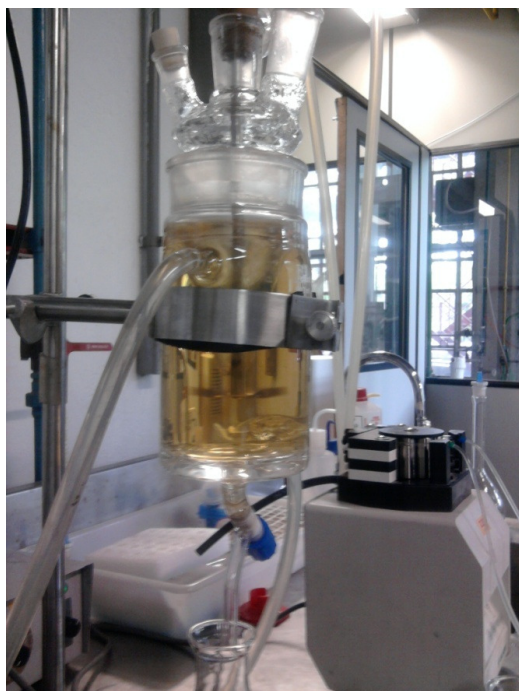


Figura 5 - Reator encamisado em funcionamento



A parte interna do reator tem 10 cm de diâmetro e 17 cm de altura, totalizando um volume útil de 1335 mL. Possui 4 chicanas, para evitar a formação de vórtice durante a agitação. A agitação foi feita através de um impelidor de metal, com 4 pás inclinadas em 45° de 2,5 cm, com uma rotação de 500 rpm, gerando um sentido de fluxo de baixo para cima.

#### **4.2 Procedimento para síntese das nanopartículas**

O “método de Turkevich” (Turkevich et al., 1951), desenvolvido originalmente para nanopartículas de ouro, adaptado para gerar nanopartículas de prata por Lee e Meisel (Lee e Meisel, 1982), foi utilizado com algumas modificações. As nanopartículas de prata foram geradas por redução química de íons de prata (nitrato de prata), usando citrato de sódio como agente redutor e estabilizante, em um reator com temperatura e agitação (500 rpm) constantes e sob controle.

Inicialmente, preparou-se uma solução de citrato de sódio 1,07 mM (variação entre 1,06 e 1,08 mM), e ajustou-se o pH para valores em torno de 7, 8 ou 9 usando hidróxido de sódio ou ácido nítrico (valores variaram entre 7,02 e 7,1, entre 8,02 e 8,11, e entre 9,02 e 9,14, respectivamente). Colocou-se 1 L desta solução no reator e aqueceu-se até 85, 90 ou 95 °C, com variações de temperatura menores que 1 °C, usando um banho termostático. Depois, uma quantidade de nitrato de prata era solubilizada em 10 mL, e adicionada ao reator, de forma que a concentração ficasse em torno de 1,07 mM. As quantidades de nitrato de prata variaram entre 179,95 e 187,5 mg (gerando as concentrações de 1,059 e 1,103 mM, respectivamente).

A cada 5 minutos, alíquotas eram retiradas do reator e colocadas em banho de gelo, para que a reação fosse interrompida, e foram reservadas para análises posteriores. Para garantir que o volume reacional não variasse por causa da evaporação, um condensador de vidro foi conectado ao reator, criando um sistema de refluxo. Todo o

sistema é selado, exceto pela saída do condensador, de forma que todo o vapor gerado é condensado e volta para o sistema reacional.

Valores de temperatura e pH inferiores aos citados foram testados, mas não levaram à formação de nanopartículas de prata dentro de algumas horas.

Parâmetros como ordem de adição dos reagentes e grau de agitação podem influenciar a formação das nanopartículas. Assim, decidiu-se que esses parâmetros fossem mantidos sempre os mesmos, em todos os experimentos.

### **4.3 Métodos de caracterização**

As medições de pH foram feitas a 25 °C no instrumento Accumet AR20, Fisher Scientific, USA.

As alíquotas do reator, após resfriadas, foram diluídas 12 vezes com água deionizada e analisadas por espectrometria de luz UV-VIS num espectrofotômetro Beckman DU-640, USA. As leituras de absorvância das alíquotas do reator foram feitas a 25 °C, em uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

As distribuições de tamanho das partículas foram determinadas por espalhamento dinâmico de luz, (DLS - Dynamic Light Scattering) a 25 °C usando o equipamento N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer, Beckman Coulter, com um ângulo de espalhamento de 90°. As determinações foram realizadas diretamente a partir das soluções amostradas do reator.

A análise morfológica das nanopartículas de prata foi realizada num microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (Field Emission Scanning Electron Microscope – FEG SEM) marca Jeol modelo JSM-4701F, na Central Analítica, do Instituto de Química da USP. Para se fazer as imagens de microscopia, eram colocadas gotas de cada amostra em um suporte de latão polido, que era deixado em uma estufa a 65 °C durante a noite para secar.

As concentrações de prata iônica foram determinadas por ICP–AES (Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente). Antes da análise de ICP, as amostras sofreram digestão a 120 °C usando ácido nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>), de forma a eliminar interferências de material orgânico, e para transformar toda a prata metálica (Ag<sup>0</sup>) em prata iônica (Ag<sup>+</sup>). A análise de ICP-ICS foi realizada para 3 ensaios: pH 7 e 95 °C, pH 8 e 90 °C, e pH 9 e 95 °C.

#### 4.4 Conversão

A conversão é definida como a parcela da prata adicionada que é convertida em prata metálica na forma de partículas nanométricas. Ela foi determinada conforme o seguinte procedimento: as amostras foram colocadas em 6 frascos de centrifugação de 2 mL e centrifugadas a 13.000 rpm (≈ 15.700 rcf) por 1 hora. A metade superior de sobrenadante foi recolhida de cada frasco, e reservada para análise do teor de prata por ICP. Foram feitas análises de ICP das amostras brutas (sem centrifugação) e das amostras centrifugadas.

A análise ICP das amostras brutas mostraram o total de prata no meio reacional. Comparando com a prata total no início da reação, foi possível determinar que uma quantidade pouco significativa de prata se perde no processo.

A análise ICP das amostras centrifugadas revelou apenas a quantidade de prata iônica no meio reacional, indicando quanto da prata ainda não reagiu. Comparando com o total inicial de prata, calculou-se a conversão da reação em um determinado instante.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Estudos exploratórios

Visualmente, a evolução típica da reação é a seguinte: após alguns minutos de reação, a mistura inicialmente incolor começa a apresentar uma cor amarelada, indicando o início da formação das nanopartículas de prata. Com o tempo, a cor amarelada se intensifica, passando gradativamente a amarronzado. Em alguns ensaios, desenvolve-se em seguida uma cor de caramelo ainda translúcido, caramelo turvo, e, por último, cinza bem turvo, indicativa da presença de agregados micrométricos.

A Tabela 1 mostra as condições dos experimentos realizados.

Tabela 1 - Experimentos realizados e condições de processo

Run	T (°C)	[AgNO <sub>3</sub> ] (mM)	[Citrato] (mM)	Proporção citrato/Ag (mol/mol)	pH	Tempo (min)	Medições ao longo do tempo?
1	85	1,06	0,68	100/156	8	40 + 90*	-
2	85	1,06	0,68	100/156	8	40 + 90*	-
3	85	1,06	0,68	100/156	8	40 + 90*	-
4	97	1,06	10,6	10/1	8	40 + 90*	Sim
6	85	1,06	10,6	10/1	8	40 + 90*	-
10	85	1,06	5,3	5/1	8	40 + 90*	-
11	85	1,06	5,3	5/1	8	40 + 90*	Sim
12	85	1,06	10,6	10/1	8	40 + 90*	Sim
13	85	1,06	10,6	10/1	8	20	-
14	85	1,06	1,06	1/1	8	40	-
16	85	1,06	1,06	1/1	8	30	-
17	85	1,06	1,06	1/1	8	20	-

<b>18</b>	75	1,06	1,06	1/1	8	90+60*	Sim
<b>19</b>	85	1,06	1,06	1/1	8	55	Sim
<b>20</b>	90	1,06	1,06	1/1	8	50	Sim
<b>21</b>	95	1,06	1,06	1/1	8	50	Sim
<b>22</b>	85	1,06	1,06	1/1	9	90	Sim
<b>23</b>	95	1,06	1,06	1/1	9	90	Sim
<b>24</b>	90	1,06	1,06	1/1	9	90	Sim
<b>25</b>	95	1,06	1,06	1/1	7	90	Sim
<b>26</b>	90	1,06	1,06	1/1	7	90	Sim
<b>27</b>	85	1,06	1,06	1/1	7	90	Sim

\* - Nesses experimentos, o segundo número é o tempo em que o meio reacional foi deixado esfriando de forma natural até a temperatura ambiente. Os outros experimentos tiveram a temperatura reduzida de forma brusca, usando banho de gelo.

A Figura 6 mostra a evolução do espectro de absorção UV-Vis com o tempo para um ensaio a 90 °C e pH 9. Pode-se ver que o pico de absorção se eleva com o tempo, indicando um aumento da concentração de partículas dispersas. Além disso, a absorbância máxima situa-se entre 430 e 460 nm, o que está de acordo com a ressonância plasmon de nanopartículas de prata. O comprimento de onda onde ocorre o máximo de absorção no espectro UV-VIS de soluções coloidais está relacionado ao tamanho médio das partículas, enquanto que a largura da banda de absorção na metade da altura relaciona-se à dispersão dos tamanhos das partículas (Leopold e Lendl, 2003). Logo, esses resultados indicam que houve variação do tamanho médio das partículas com o tempo.

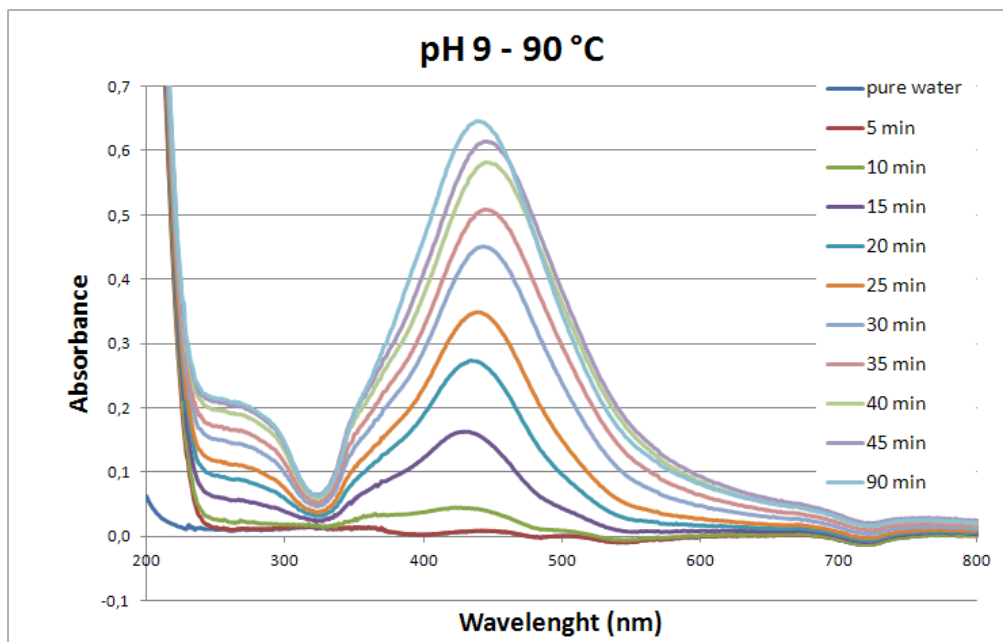


Figura 6 - Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo, do experimento realizado a 90 °C e pH 9 – ensaio 24.

As Figuras 7, 8 e 9 mostram a absorção máxima com o tempo para os experimentos utilizando valores de pH 7 e 9, entre 85 e 95 °C. Preliminarmente, admitimos para esta análise que a absorbância está diretamente relacionada com a conversão da prata iônica em prata metálica (esse assunto será melhor discutido adiante). A reação apresenta um tempo de indução, onde a absorbância não se altera, seguida de uma fase de crescimento em forma de S, após o qual a absorbância não mais se altera, indicando o final da reação.

Observamos nas figuras 7 e 8 que, para um dado valor de pH, as absorbâncias tendem a um mesmo valor máximo, e que a temperatura somente influi na velocidade com que esse máximo é atingido, ou seja, na velocidade da reação. Podemos notar, também, que esse valor máximo de absorbância é diferente para diferentes valores de pH, sendo maior em pH 9 do que em pH 7. Assim, supomos que a conversão em pH 9 fosse maior que em pH 7.

Pode-se ver, pela figura 9, que a curva atinge metade do valor máximo em 15 minutos de reação quando usamos pH 9, e em 25 minutos quando usamos pH 7, indicando que o pH influencia tanto a velocidade de reação, quanto o valor máximo de conversão.

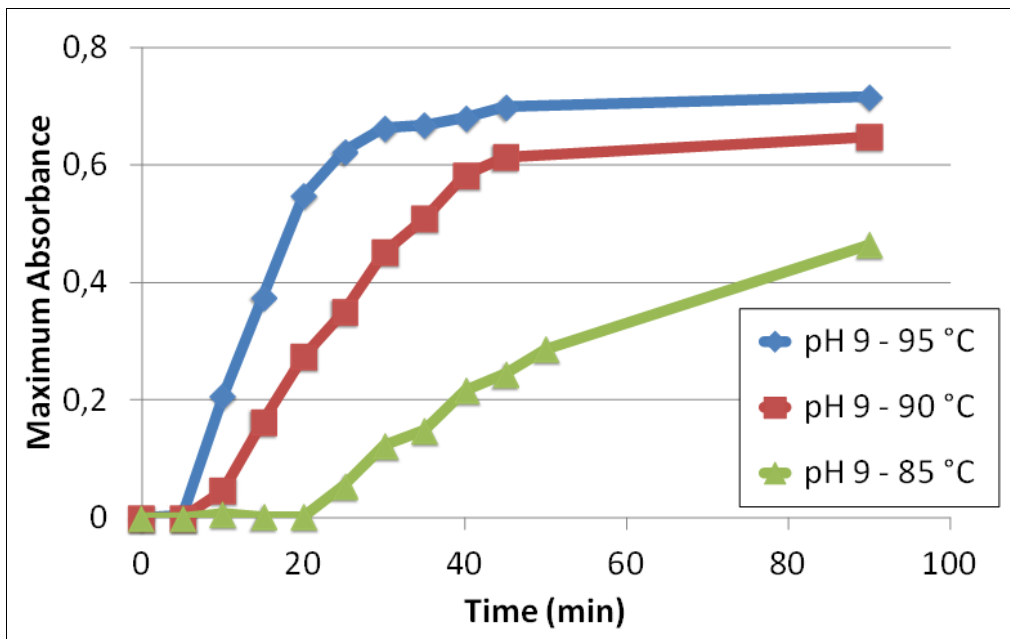


Figura 7 - Absorbância ao longo do tempo, pH 9 e temperaturas de 85, 90 e 95 °C

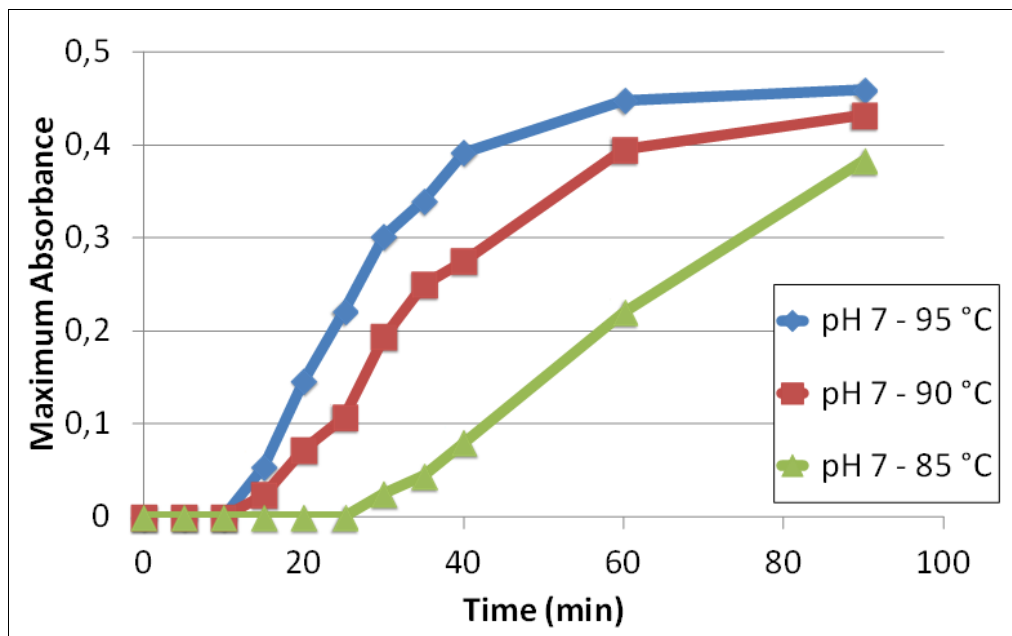


Figura 8 - Absorbância ao longo do tempo, pH 7 e temperaturas de 85, 90 e 95 °C.

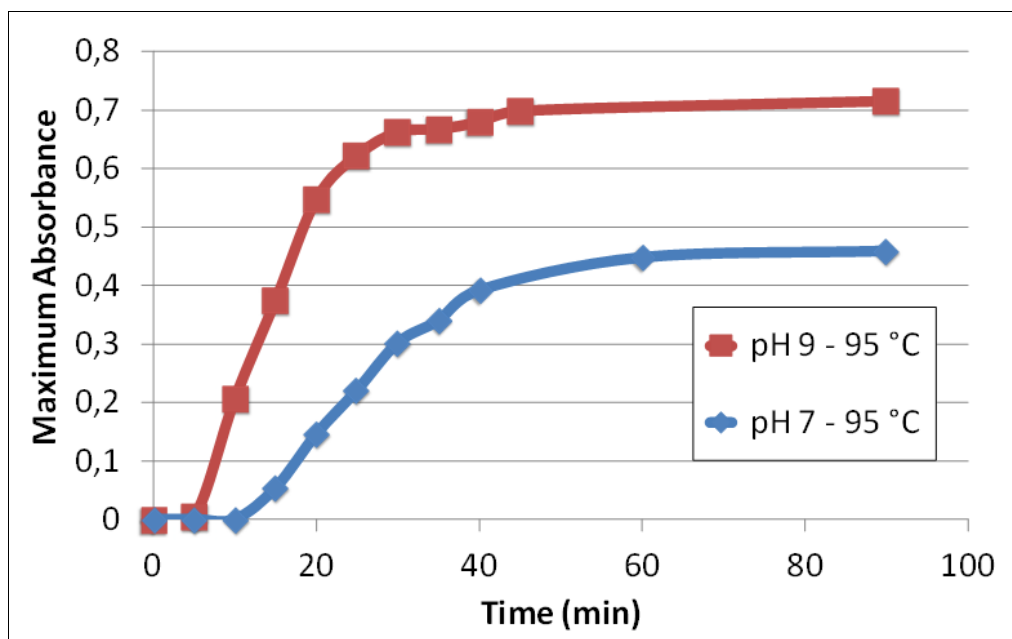


Figura 9 - Curvas comparativas de absorbância a 95 °C e valores de pH 7 e 9.



Essa hipótese da conversão ser proporcional à absorvância se mostrou parcialmente falsa, como veremos na análise de conversão usando ICP, mais adiante.

As análises de DLS forneceram as distribuições de tamanho das partículas, como podemos ver exemplificada na Figura 10.

Na maioria dos casos, detectou-se duas “populações” com tamanhos distintos: uma população de partículas pequenas, por volta de 10 nm, e outra população de partículas maiores, em torno de 80 nm.

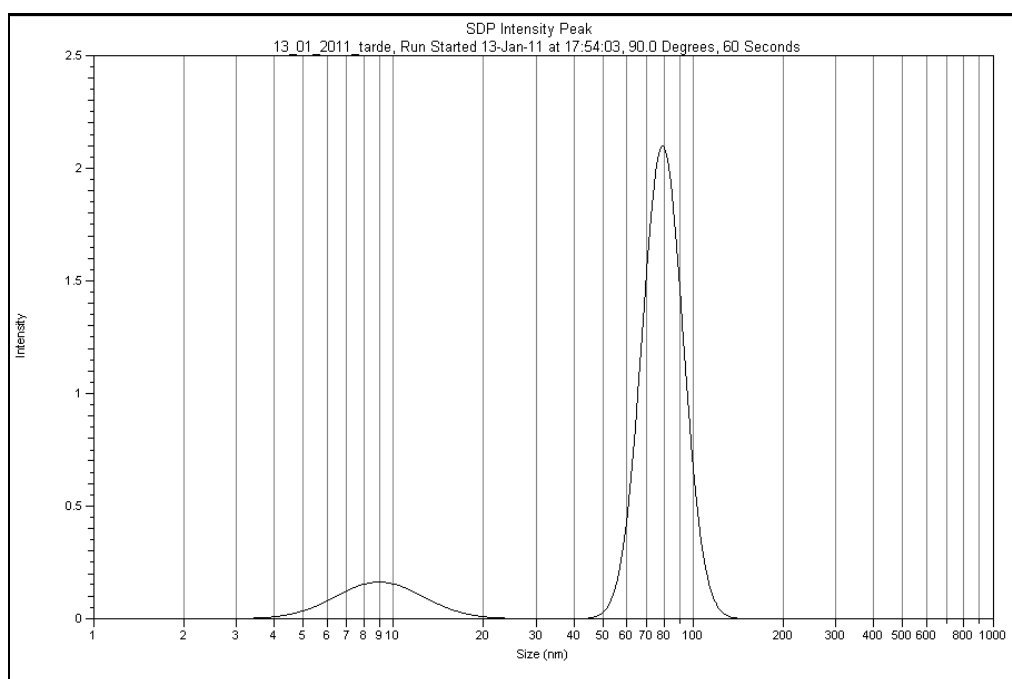


Figura 10 - Distribuição de tamanhos por DLS das partículas do experimento 3, em pH 8 e 85 °C, ao final da reação

A presença dessas duas populações pode ser vista na maioria dos casos, conforme mostrado na Tabela 2. Em alguns poucos casos, detectou-se uma terceira população, ou ainda uma única população.

Entretanto, a análise em DLS utiliza modelagens adequadas apenas para partículas com formatos aproximadamente esféricos, e não diferencia uma partícula de um aglomerado de partículas. Dessa forma, foi também realizada análise de tamanhos a partir de imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 2 – Faixas de tamanhos médios das partículas obtidos por DLS

	T (°C)	Proporção citrato/Ag (mol/mol)	pH	Tempo (min)	>90 nm	50-90 nm	10-20 nm	5-10 nm
<b>1</b>	85	100/156	8	40 + 90*		77,8	15,2	5,5
<b>2</b>	85	100/156	8	40 + 90*		79,5	11,3	
<b>3</b>	85	100/156	8	40 + 90*		76,7		8,9
<b>4</b>	97	10/1	8	40 + 90*	113,6		12,1	
<b>6</b>	85	10/1	8	40 + 90*	131,3		21,7	
<b>10</b>	85	5/1	8	40 + 90*		75,3	9,3	2,7
<b>11</b>	85	5/1	8	40 + 90*		81,2		10
<b>12</b>	85	10/1	8	40 + 90*		80,1		7,7
<b>13</b>	85	10/1	8	20		61,8		5,5
<b>14</b>	85	1/1	8	40		76,4		8,1
<b>16</b>	85	1/1	8	30		70,5		6,2
<b>17</b>	85	1/1	8	20		58,6		4,2
<b>18</b>	75	1/1	8	90+60*		76,9		6,6
<b>19</b>	85	1/1	8	55		88,5		8,3
<b>20</b>	90	1/1	8	50	92,7		15,3	
<b>21</b>	95	1/1	8	50		85,8	12,3	
<b>22</b>	85	1/1	9	90		89,8	10,6	
<b>23</b>	95	1/1	9	90		63,4		6,3
<b>24</b>	90	1/1	9	90		88,2		
<b>25</b>	95	1/1	7	90	92,6		14	
<b>26</b>	90	1/1	7	90	99			

\* - Nesses experimentos, o segundo número é o tempo em que o meio reacional foi deixado esfriando de forma natural até a temperatura ambiente. Os outros experimentos tiveram a temperatura reduzida de forma brusca, usando banho de gelo.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram geradas a partir das alíquotas tiradas aos 20 e aos 40 minutos de reação, nos valores de pH 7 e 9, nas temperaturas de 85, 90 e 95 °C. Apesar de terem sido tomadas nos mesmos tempos de reação, as alíquotas de diferentes condições de processo apresentam partículas

em diferentes estágios de desenvolvimento. Por exemplo, ao observar a Figura 7, podemos ver que, aos 40 minutos de reação, a curva de absorvância de 85 °C ainda está aumentando, enquanto que aos 90 e 95 °C, no mesmo tempo de reação, a curva está entrando em sua parte quase horizontal correspondendo ao final da reação. A Tabela 3 apresenta os tamanhos médios obtidos, assim como informações sobre morfologia (se são partículas dispersas ou agregadas).

Tabela 3 – Estado de agregação e tamanhos médios das partículas obtidos por análise das imagens de MEV

Run	pH	T (°C)	População de partículas menores, depois de 20 minutos	População de partículas maiores, depois de 20 minutos	População de partículas menores, depois de 40 minutos	População de partículas maiores, depois de 40 minutos
27	7	85	Agregados entre 10 e 33 nm	Ausente	Agregados de 23 nm	Dispersas de 57 nm
26	7	90	Agregados entre 11 e 44 nm	Ausente	Agregados de 16 nm	Dispersas de 66 nm
25	7	95	Agregados entre 21 e 61 nm	Ausente	Dispersas de 12 nm	Dispersas de 95 nm
19	8	85	Dispersas de 17 nm	Dispersas de 68 nm	Ausente	Dispersas de 61 nm
20	8	90	Agregados entre 30 e 100 nm	Ausente	Ausente	Dispersas de 64 nm
21	8	95	Dispersas de 17 nm	Agregados de 73 nm	Ausente	Dispersas de 81 nm
22	9	85	Dispersas de 23 nm	Ausente	Dispersas de 25 nm	Ausente
24	9	90	Agregados de 18 nm	Dispersas de 64 nm	Dispersas de 12 nm	Dispersas de 67 nm
23	9	95	Dispersas de 12 nm	Dispersas de 68 nm	Ausente	Dispersas de 63 nm

As Figuras 11 a 16 mostram nanopartículas de prata em diferentes estágios de desenvolvimento. As Figuras 11 e 12 mostram as partículas em seus estágios iniciais da reação, correspondendo ao período em que se inicia o aumento da absorvância com o tempo nas figuras 7 a 9. Estas partículas foram geradas a 90 °C e pH 7 (Figura 11), e a 85 °C e pH 7 (Figura 12), coletadas após 20 minutos de

reação. Possuem em torno de 10 nm, com formas irregulares, e formam pequenos agregados de até 44 nm.

As Figuras 13 e 14 apresentam nanopartículas de prata em estágios intermediários de reação, correspondendo ao período em que a absorvância aumenta com o tempo. Estas nanopartículas foram sintetizadas a 95 °C e pH 7 após 40 minutos de reação (Figura 13), e a 90 °C e pH 9 após 20 minutos de reação (Figura 14). Podemos ver duas populações de partículas dispersas de tamanhos bem distintos, confirmando as análises em DLS.

As Figuras 15 e 16 apresentam nanopartículas no estágio final da reação, quando a absorvância estabiliza-se. Elas foram sintetizadas a 95 °C e pH 9 após 40 minutos de reação (Figura 15), e a 85 °C e pH 8 após 40 minutos de reação (Figura 16). Podemos ver que as partículas menores desapareceram, cedendo lugar às partículas maiores.

Baseando-nos na Tabela 3 e nas Figuras 11 a 16, sugerimos a seguinte rota de formação e amadurecimento das partículas: (i) formam-se partículas de tamanhos uniformes, mas de formas irregulares, por volta de 10 nm, podendo formar pequenos aglomerados entre 30 e 40 nm (Figuras 11 e 12); (ii) algumas partículas se aglomeram e crescem, formando partículas policristalinas em torno de 70 nm, e outras mais instáveis se dissolvem gradativamente (“Ostwald Ripening” – amadurecimento de Ostwald), formando duas populações de partículas dispersas de tamanhos distintos (Figuras 13 e 14); (iii) as partículas menores desaparecem, dando lugar às partículas maiores, entre 70 e 90 nm (Figuras 15 e 16).

Podemos ver, também, que se formam, em menor escala, placas triangulares e bastonetes em algumas condições de síntese, como podemos ver na Figura 17. Aparentemente, a formação de bastonetes e triângulos é mais lenta, pois foram detectados nas imagens das amostras retiradas após 40 minutos de reação, mas não aos 20 minutos (com exceção do experimento a 95 °C e pH 9, que apresentou bastonetes e triângulos nos dois tempos observados). Nas condições de pH 7 a 85 °C, pH 7 a 90 °C, e pH 9 a 85 °C, não foram detectados bastonetes nem triângulos em nenhum tempo.

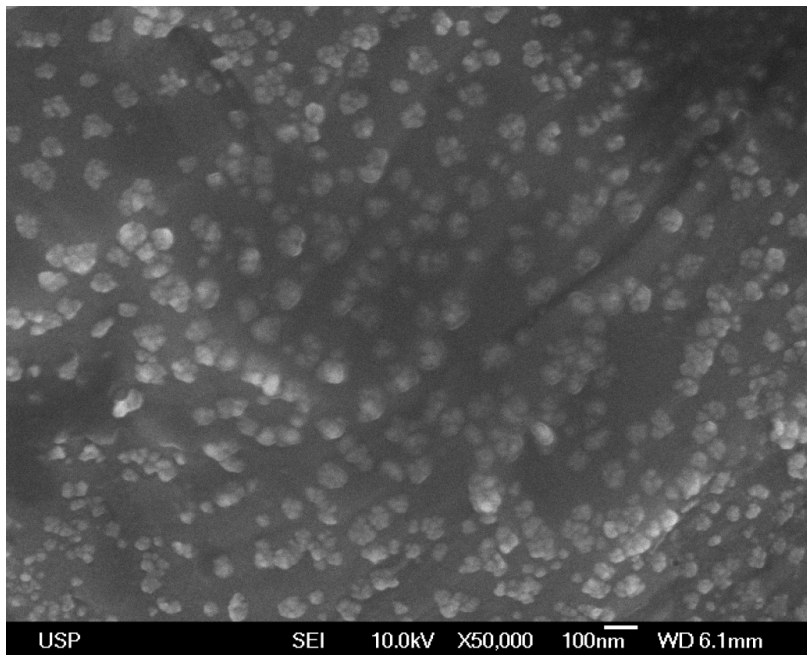


Figura 11 - Nanopartículas no estágio inicial da reação, geradas a 90 °C e pH 7, 20 minutos de reação.

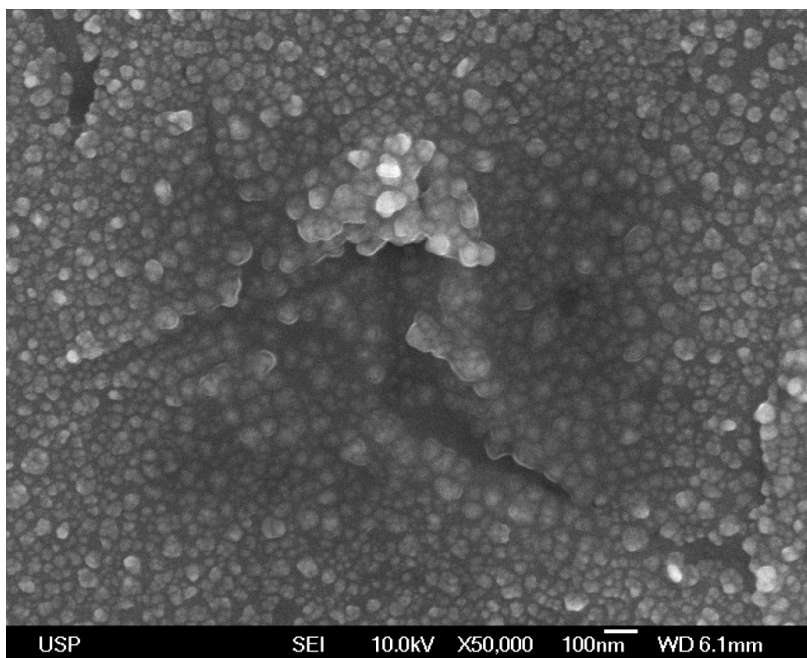


Figura 12 - Nanopartículas no estágio inicial da reação, geradas a 85 °C e pH 7, 20 minutos de reação.



Figura 13 - Nanopartículas em estágio intermediário da reação, geradas a 95 °C e pH 7, 40 minutos de reação.

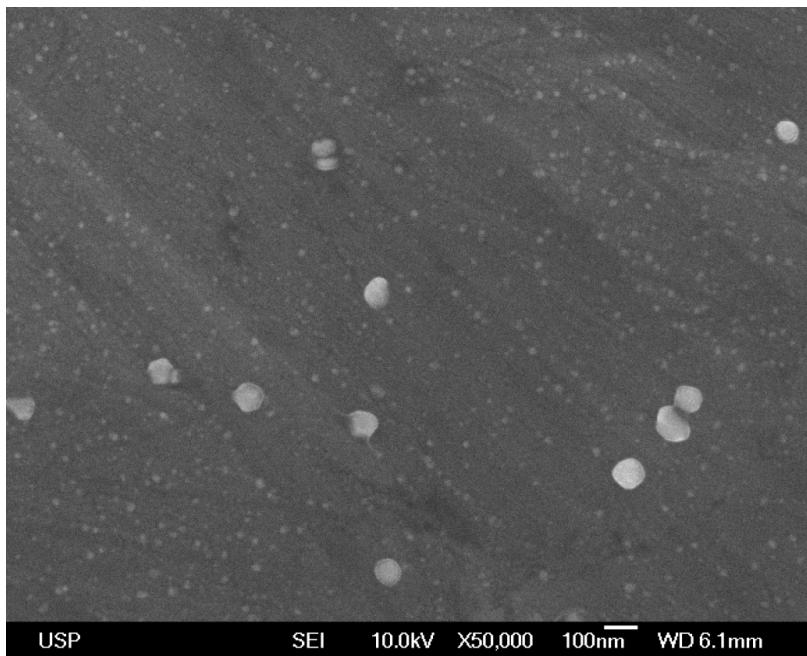


Figura 14 - Nanopartículas em estágio intermediário da reação, geradas a 90 °C e pH 9, 20 minutos de reação.

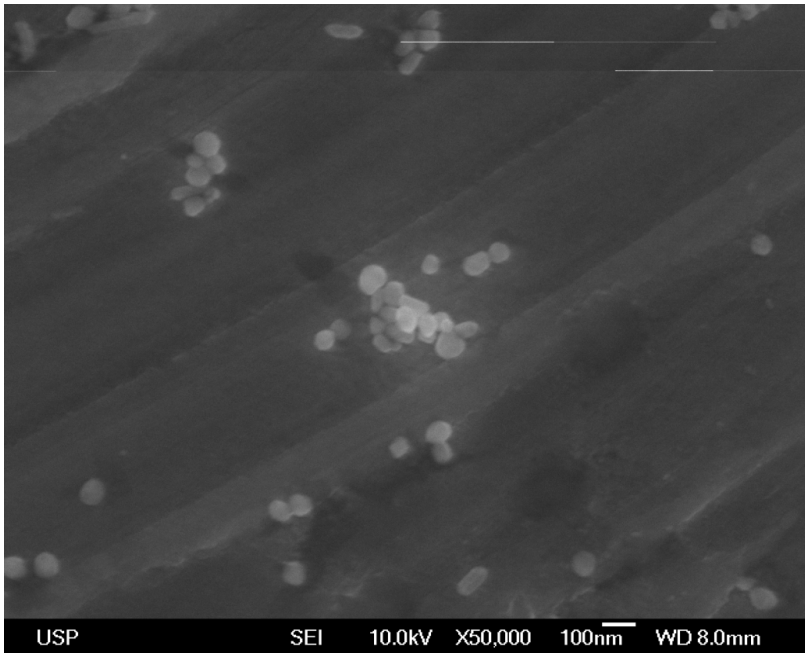


Figura 15 - Nanopartículas no estágio final da reação, geradas a 95 °C e pH 9, 40 minutos de reação.

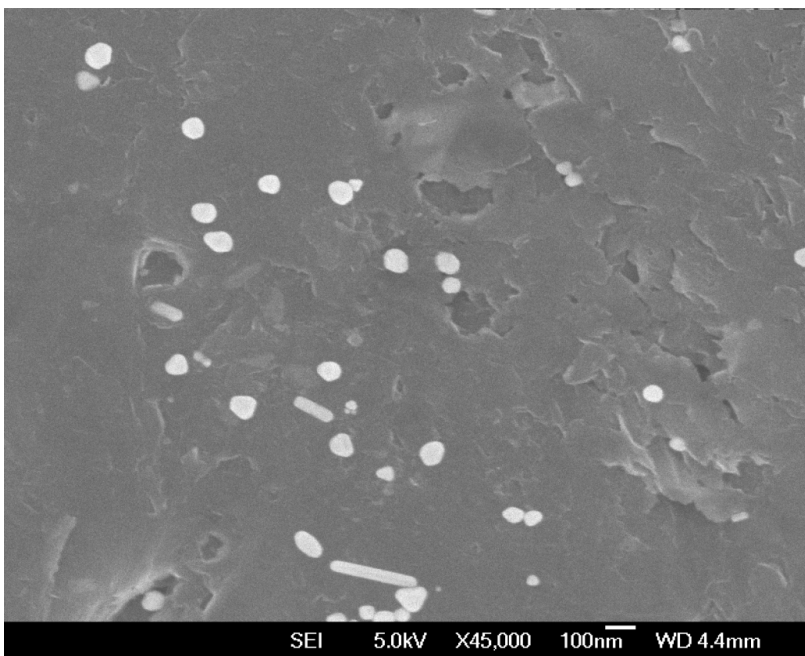


Figura 16 - Nanopartículas no estágio final da reação, geradas a 85 °C e pH 8, 40 minutos de reação.

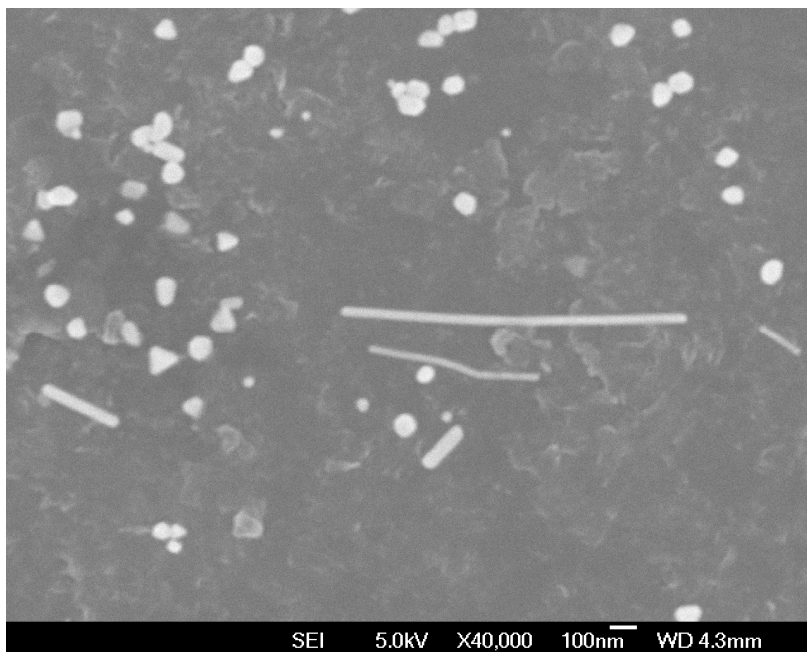


Figura 17 - Nanopartículas no estágio final da reação, geradas a 95 °C e pH 8, 40 minutos de reação - Nota-se a presença de alguns bastonetes e triângulos.

Para se verificar a validade da hipótese desenvolvida, foi decidido que mais ensaios eram necessários. Desses ensaios, foram geradas novas imagens das nanopartículas, que serviram de base para a análise do desenvolvimento morfológico das partículas, a seguir.

## 5.2 Análise morfológica da cristalização

Para avaliar as transformações sofridas pelas nanopartículas em detalhes, foram realizadas micrografias em diferentes tempos de reação para as diversas condições de pH e temperatura utilizadas. Apresentamos a seguir uma reação típica, com todas as etapas de desenvolvimento das nanopartículas, realizada nas condições de pH 8 e a 90 °C. Em alguns experimentos com outras condições, o desenvolvimento



aparenta “pular” etapas, ou não chega a atingir as etapas finais. Isso se deve às escolhas de tempo de reação.

Aos 10 minutos de reação (Figura 18), podemos ver uma grande quantidade de partículas pequenas, muitas formando aglomerados, e algumas isoladas (essa formação de grandes quantidades de pequenas partículas logo no início da reação foi observada em todas as condições estudadas – ver Anexo A). Aos 15 minutos de reação (Figura 19), as partículas estão distribuídas de forma mais uniforme, tanto em relação aos tamanhos, quanto à formação de aglomerados. É possível que as partículas mais instáveis já estejam se dissolvendo. Aos 20 minutos de reação (Figura 20), notamos uma diminuição na quantidade de partículas, assim como um aumento no tamanho médio. Também podemos ver que apareceram algumas partículas de maior tamanho. Aos 40 minutos de reação (Figura 21), as partículas aparecem menos aglomeradas, e a presença de dois tamanhos diferentes de partículas fica mais evidente. Aos 60 minutos (Figura 22) as partículas de menor tamanho são muito poucas. Aos 80 minutos (Figura 23) e aos 120 minutos (Figura 24), não mais encontramos as partículas menores, e aparentemente, as partículas param de crescer quando atingem em torno de 70 nm. Vemos muitas partículas grandes aglomeradas, e muito poucas isoladas.

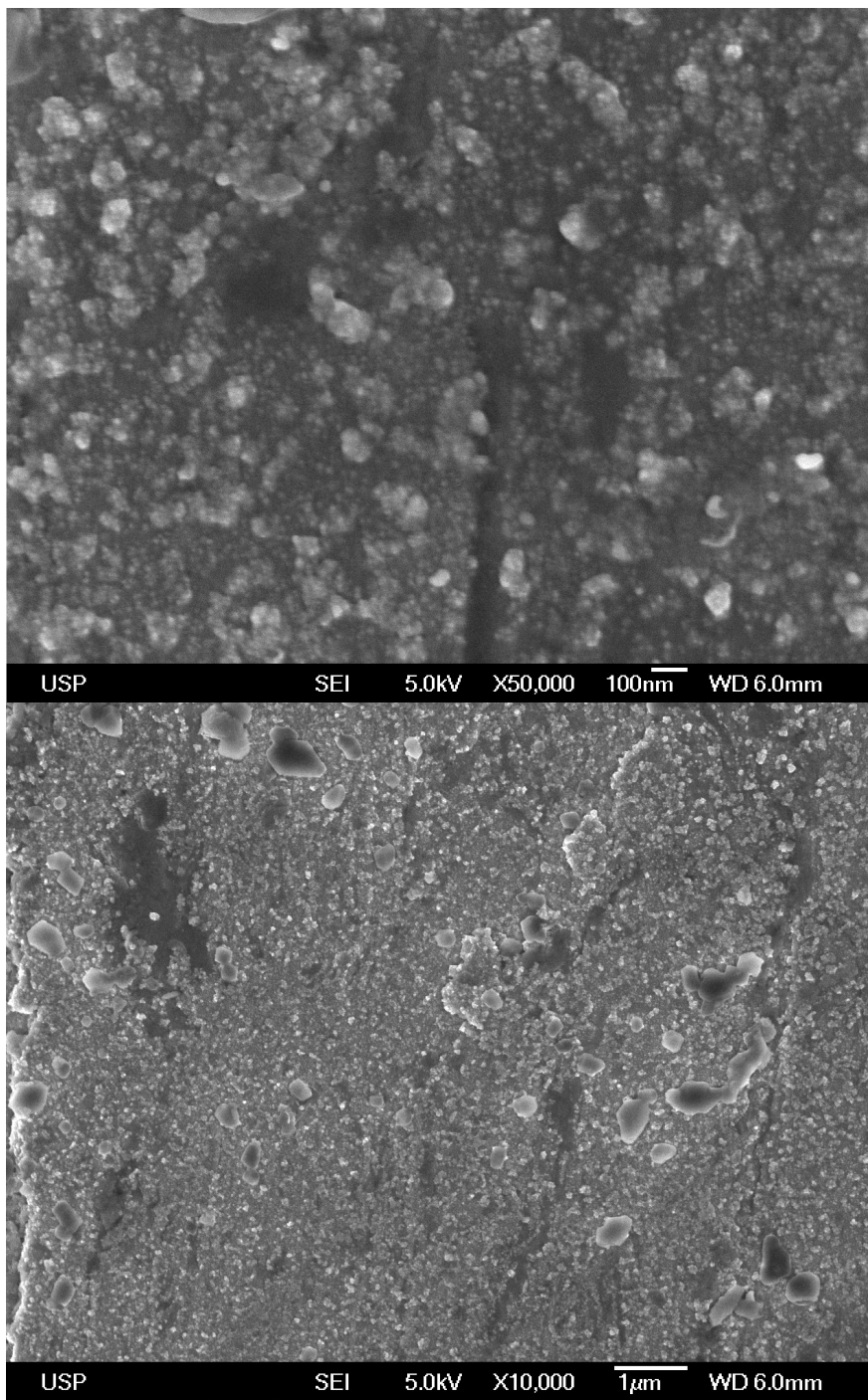


Figura 18 – Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 10 minutos de reação.

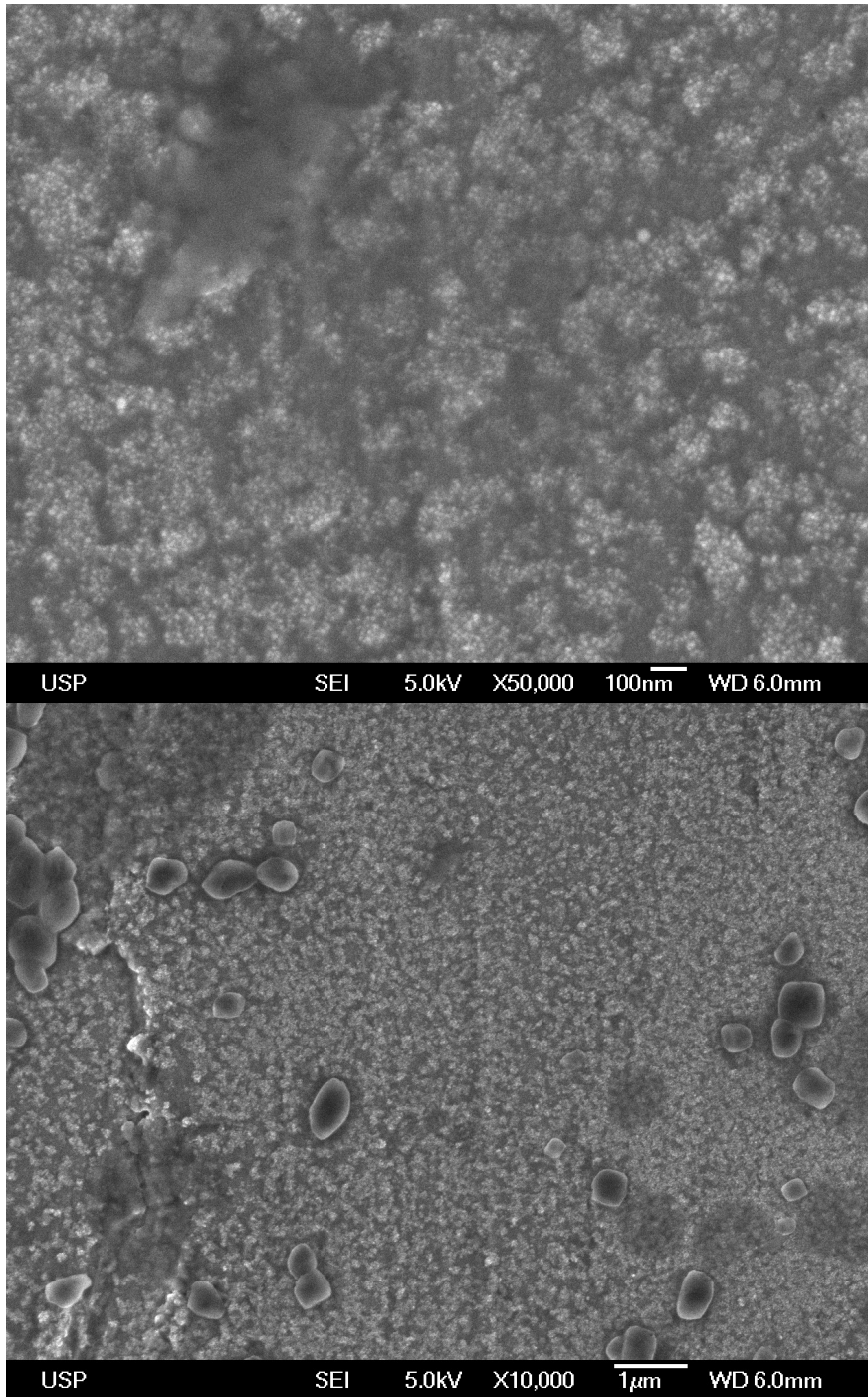


Figura 19 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 15 minutos de reação.

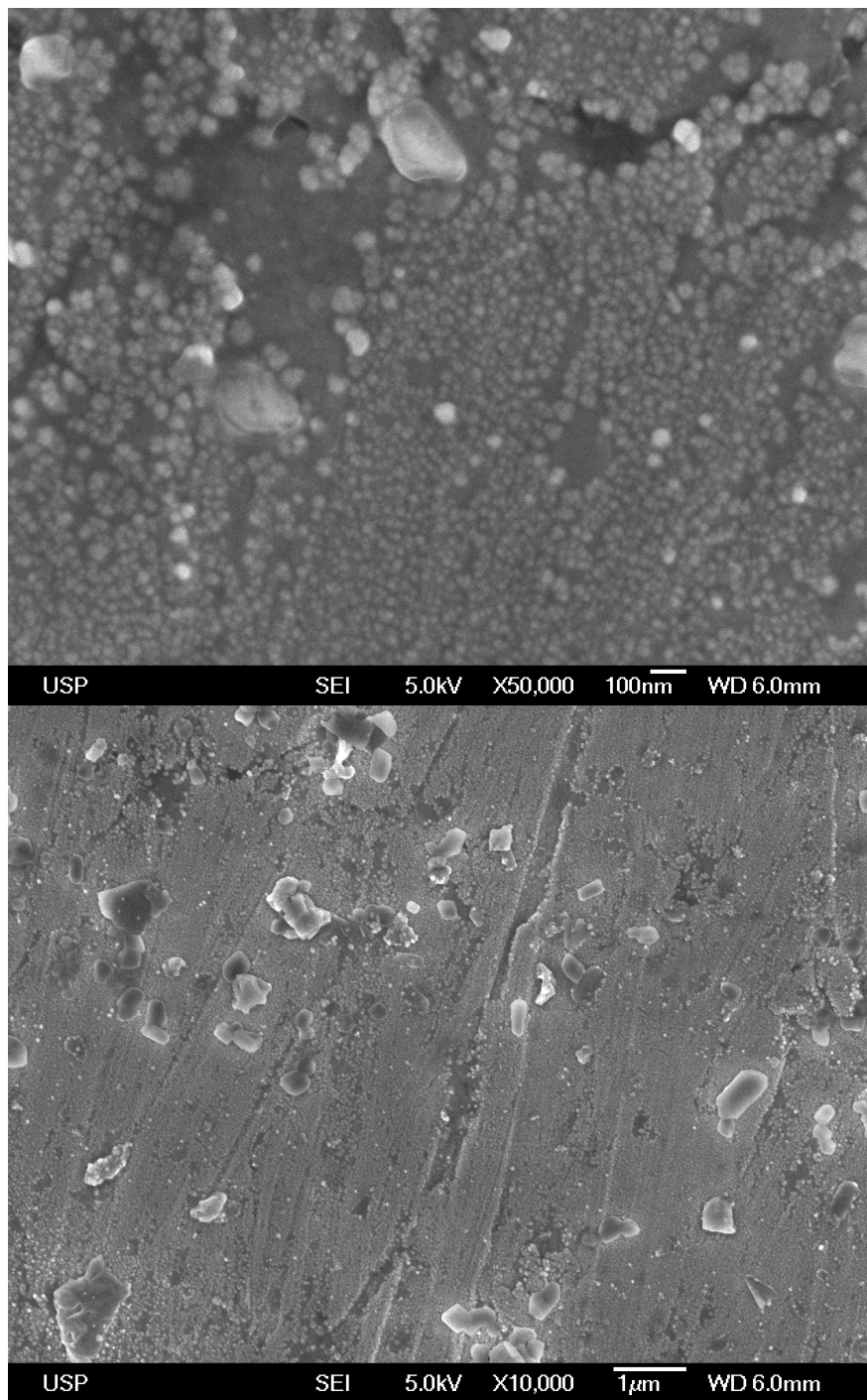


Figura 20 – Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 20 minutos de reação.

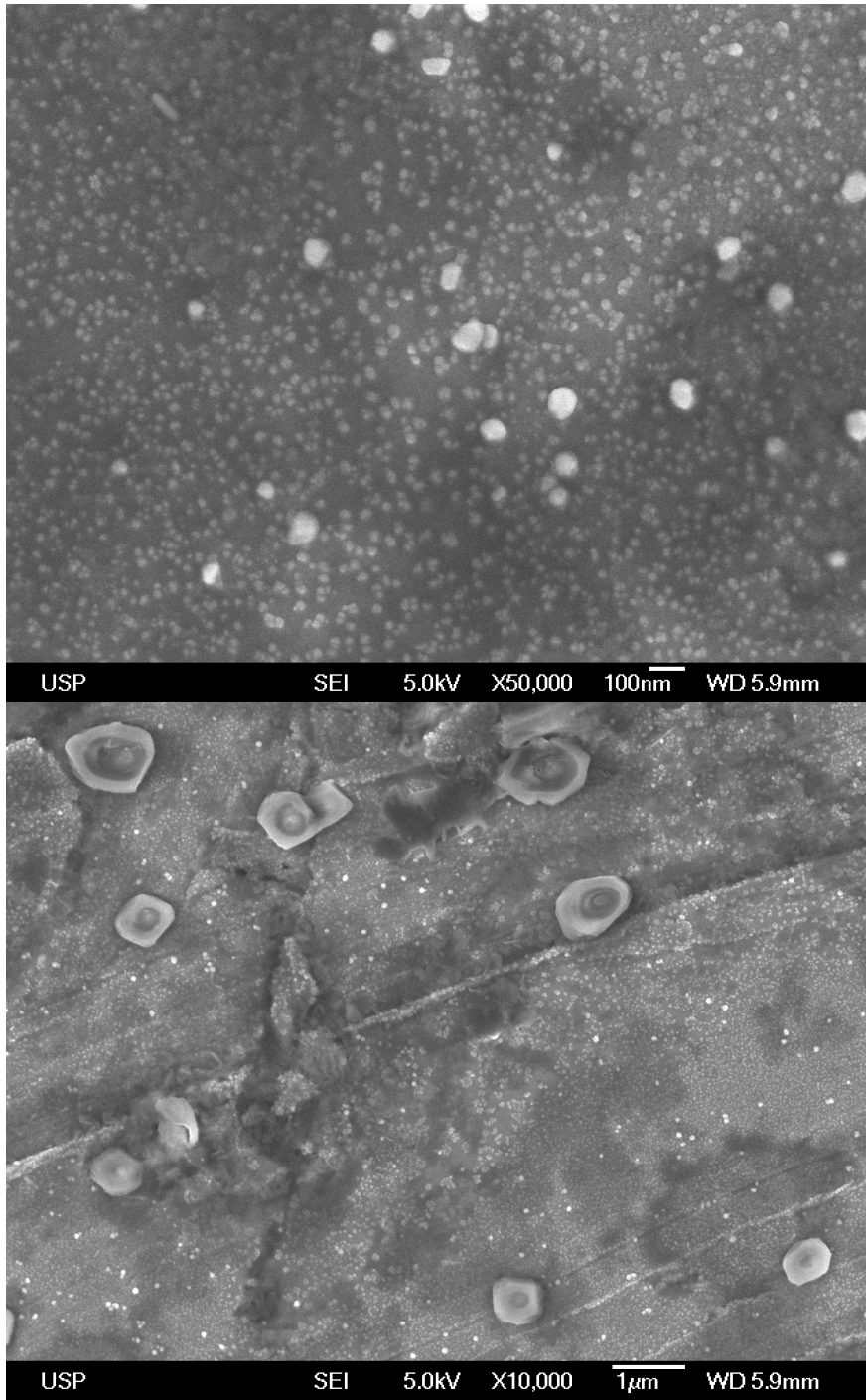


Figura 21 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 40 minutos de reação.

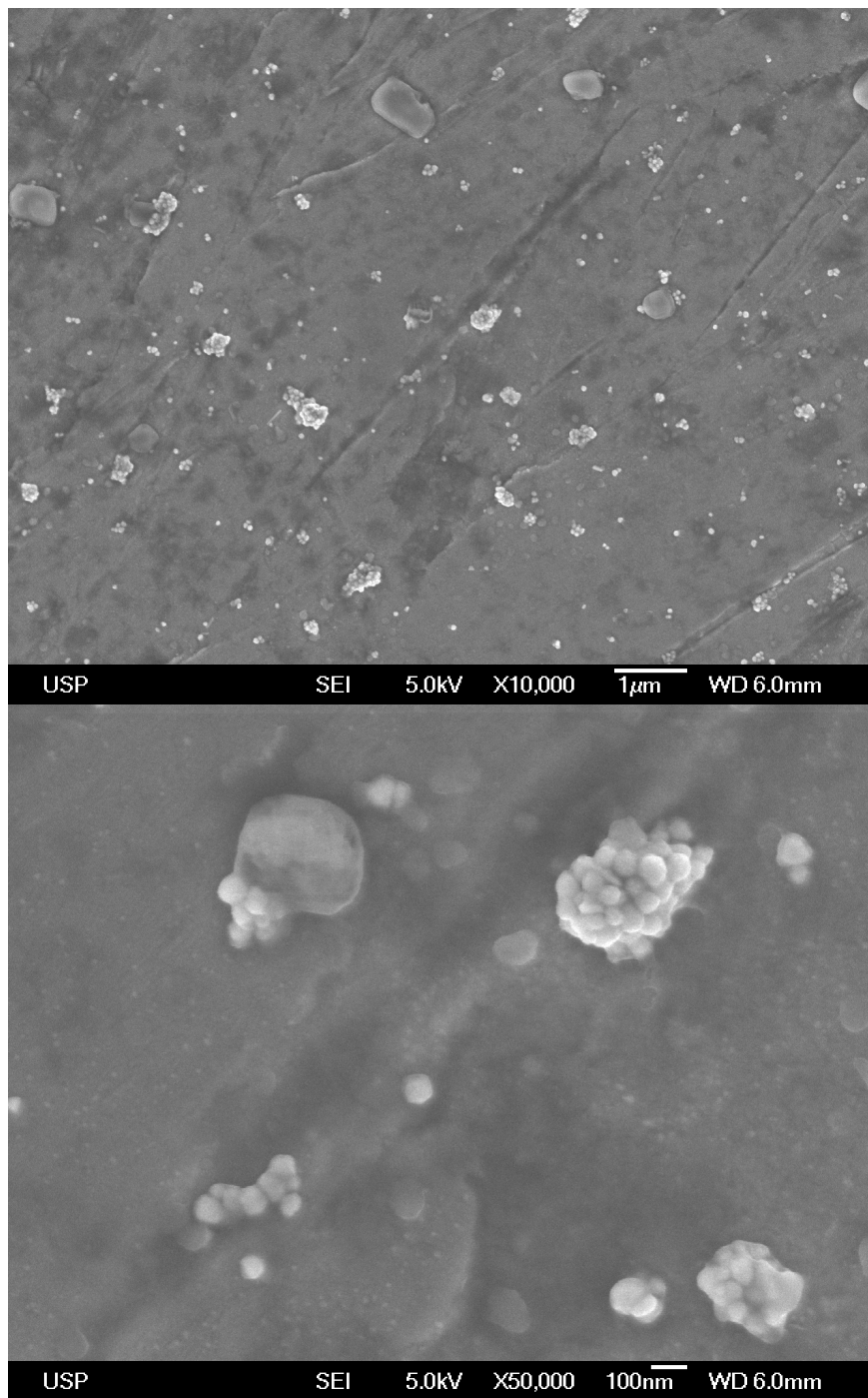


Figura 22 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 60 minutos de reação.

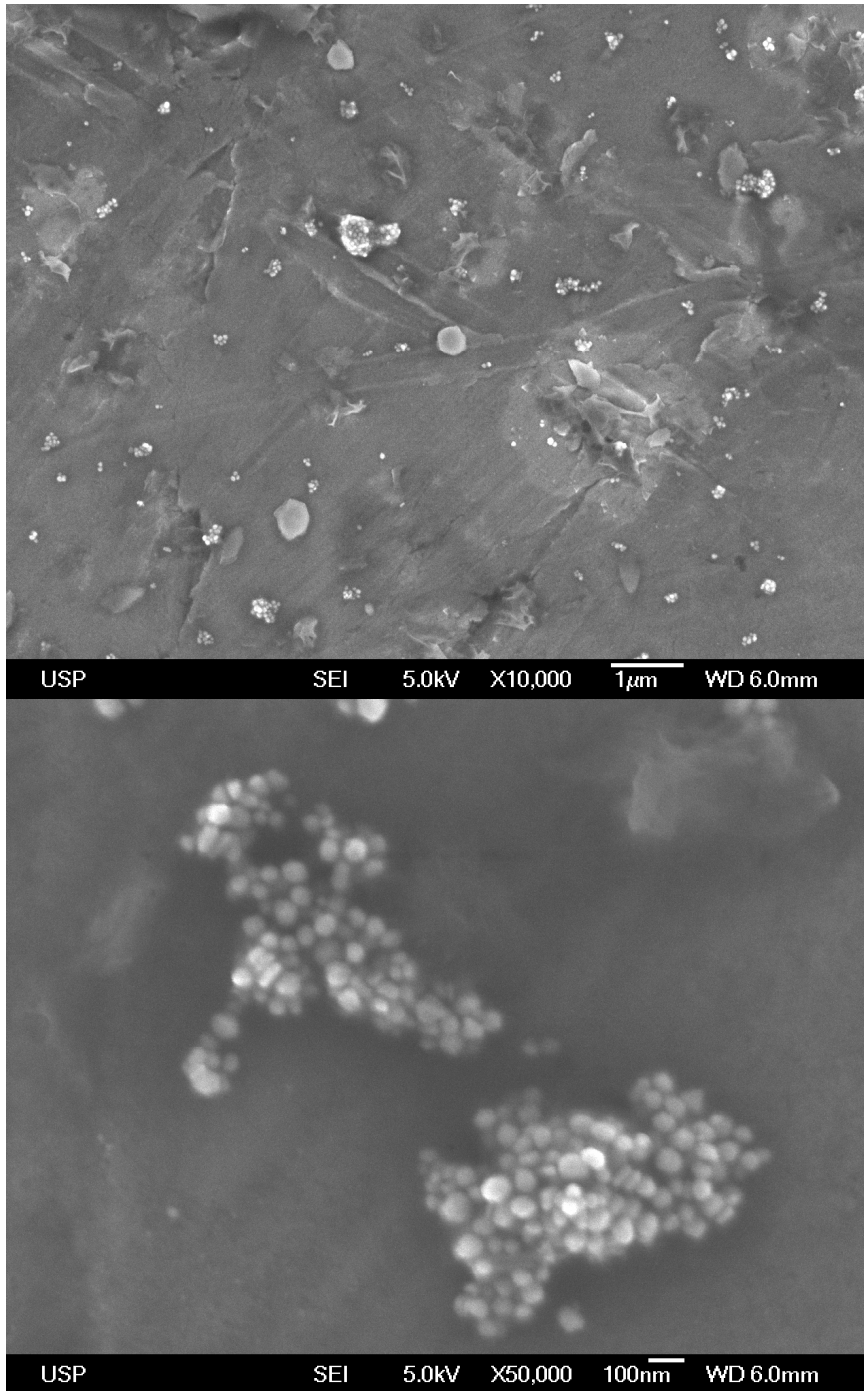


Figura 23 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 80 minutos de reação.

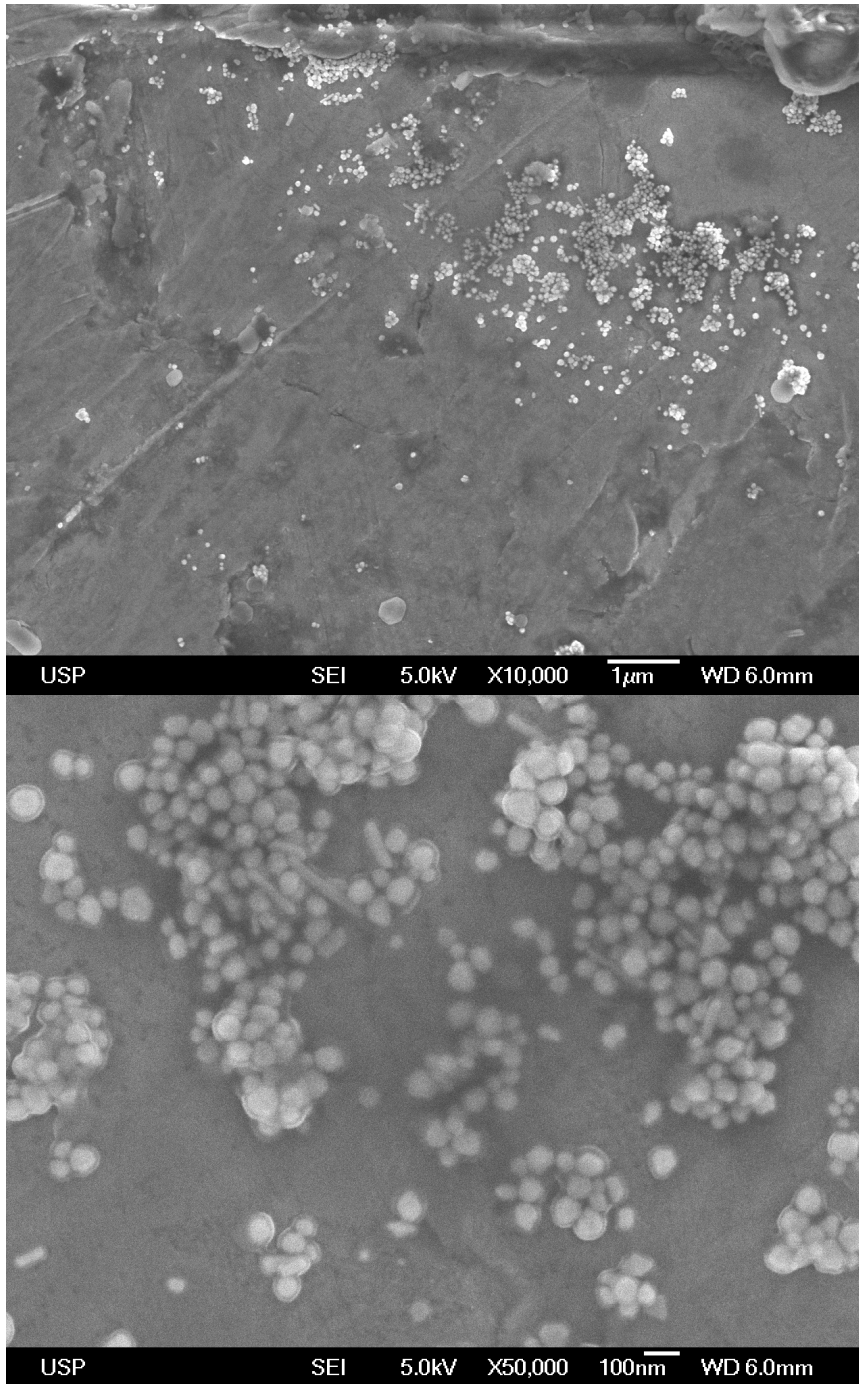


Figura 24 - Nanopartículas geradas a 90 °C e pH 8, 120 minutos de reação.



Podemos ver, pelas imagens de outros experimentos (ver anexo A), que as partículas se formam e se desenvolvem de uma maneira muito parecida em todas as situações analisadas, variando apenas o tempo de reação necessário para passar de um estágio pra outro.

Aparentemente, as partículas se formam em grande quantidade logo no início da reação, e se juntam formando pequenos aglomerados. Nesse estágio, existem muito poucas partículas isoladas. Essas partículas iniciais parecem ser instáveis, pois no próximo estágio de desenvolvimento, vemos uma diminuição das partículas aglomeradas e um aumento na proporção de partículas isoladas.

No estágio seguinte, se observa que “surgem” partículas isoladas de maior tamanho. É possível que essas partículas maiores sejam as partículas formadas previamente, mas que tinham estrutura mais estável, de forma que continuaram a crescer, enquanto que outras, mais instáveis, se dissolveram (amadurecimento de Ostwald). Nesse estágio, dificilmente encontramos aglomerados, apenas partículas isoladas de dois tamanhos diferentes.

Em seguida, verifica-se que as partículas menores (tanto as isoladas quanto as aglomeradas) vão se tornando mais raras. Possivelmente, elas se dissolvem, conforme as partículas maiores continuam a crescer.

Finalmente, chega-se a um ponto onde restam apenas partículas grandes, que permanecem isoladas ou formam grandes aglomerados.

### **5.3 Conversão**

A Figura 25 mostra a evolução da concentração de prata iônica (prata que não reagiu), e da concentração de prata total (prata iônica mais prata na forma de nanopartículas) no meio reacional obtidas em pH 8 e temperatura de 90 °C. Pode-se ver que a prata total se altera muito pouco ao longo do tempo, indicando que uma parcela desprezível da massa de prata se perde durante o processo (nas paredes do

reator, por exemplo). Já a concentração de prata iônica diminui bastante, chegando a atingir valores abaixo do limite de detecção do equipamento (0,01 mg/L). Estes resultados mostram que a conversão, ao final do experimento, é de aproximadamente 100%, isto é, quase toda a prata inicial se converte em prata metálica.

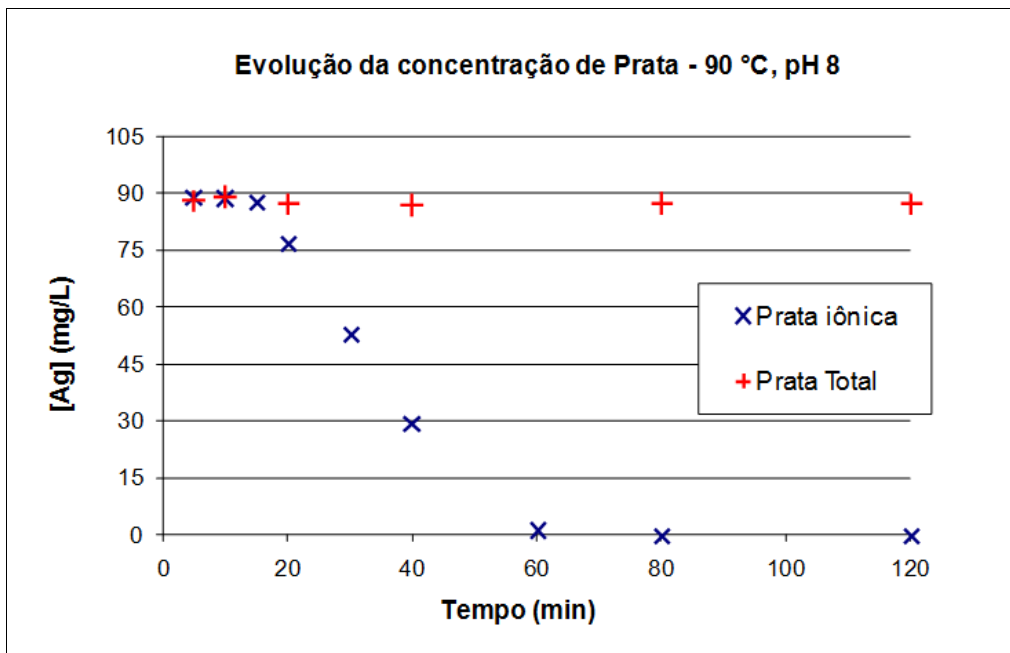


Figura 25 - Concentrações de prata iônica e total ao longo do tempo para ensaio a pH 8 e 90 °C.

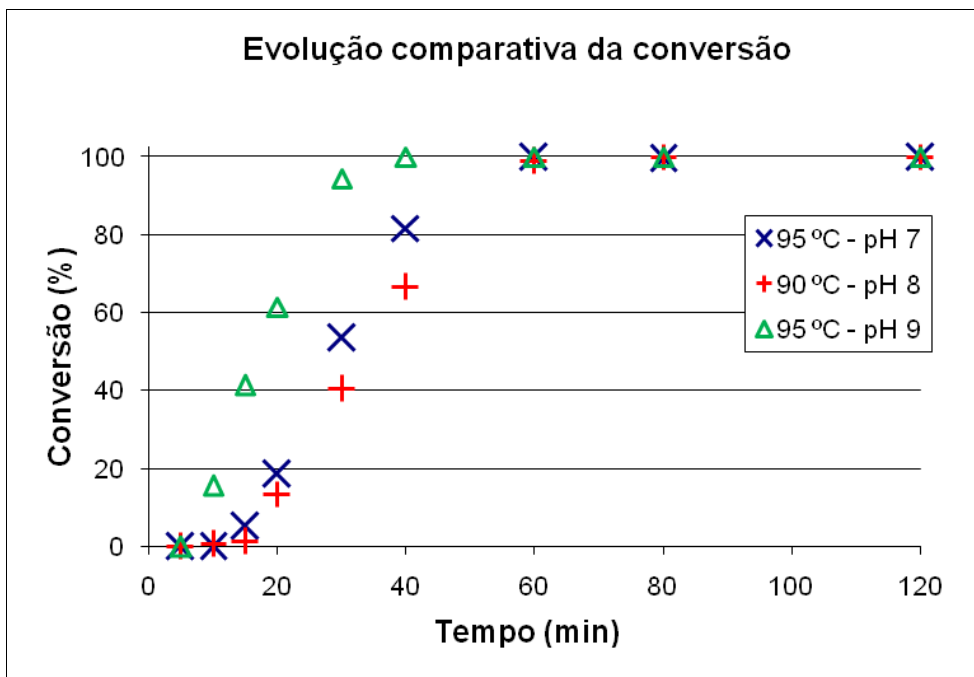


Figura 26 - Evolução da conversão em 3 experimentos de diferentes condições.

Podemos ver pela Figura 26, que a reação apresenta um tempo de indução, onde não se observa conversão significativa. Em seguida, há uma fase de aumento da conversão em forma de S, seguida de uma aproximação lenta para a conversão máxima, que é sempre próxima a 100%.

Considerando que a absorbância mantém uma relação direta com a conversão (ver adiante), e observando as figuras 7, 8, 9 e 26, pode-se ver que o tempo de indução e a velocidade de reação dependem tanto da temperatura quanto do pH, sendo que esse tempo é menor quando pH e temperatura são altos. A conversão é mais rápida em pH 9 e 95 °C, do que em temperaturas e pH's mais baixos. Esse resultado mostra que as formas menos protonadas do íon citrato são mais reativas, confirmando o encontrado na literatura (Patungwasa e Hodak, 2008).

Comparando as curvas de conversão com as imagens MEV, podemos concluir também que cada uma das etapas de desenvolvimento das nanopartículas estão muito bem relacionadas com determinadas regiões da curva de conversão. Como

exemplo, podemos ver que aos 20 minutos, a reação a 95 °C e pH 7 (Figura A 16, do Anexo A) ainda apresenta partículas em estágio inicial, mas aos 30 minutos (Figura A 17, Anexo A), elas já se encontram no estágio intermediário, apresentando partículas com dois tamanhos distintos. A mudança do estágio inicial para o intermediário aconteceu entre os 20 e 30 minutos de reação. Pela Figura 29, vemos que o estágio inicial termina entre 20 e 50% de conversão. A Figura A 19 (Anexo A) mostra que aos 60 minutos já não encontramos partículas pequenas, estando no estágio final. A mudança do estágio intermediário para o final aconteceu entre 40 e 60 minutos de reação, que corresponde, pela Figura 29, a algo entre 80 e 100% de conversão.

Fazendo a mesma análise para as outras condições, temos que, para pH 8 e 90 °C, a mudança entre estágio inicial e intermediário ocorre entre 15 e 20 minutos de reação (Figuras 19 e 20), algo em torno dos 15% de conversão; a mudança do estágio intermediário ocorre logo depois dos 60 minutos de reação (Figura 22), quando a reação já está em 100% de conversão. Para pH 9, 90 °C, a mudança do estágio inicial para o intermediário acontece entre 10 e 15 minutos de reação (Figuras A 31 e A 32, Anexo A), algo entre 20 e 40% de conversão; a mudança do estágio intermediário para o final acontece entre 40 e 60 minutos de reação (Figuras A 32 e A 34, Anexo A), quando a conversão já alcançou seu máximo.

Richards et al. notaram, em seus experimentos, que as nanopartículas de prata seguiam um mecanismo de nucleação e crescimento muito semelhante ao encontrado em nossos ensaios. Eles chegaram à conclusão de que o mecanismo envolve a nucleação clássica no início da reação, seguido por um crescimento agregativo (formando partículas policristalinas), e finalmente, amadurecimento de Ostwald (Ostwald ripening), todos acontecendo em tempos diferentes (Richards et al., 2010). Com isso, vemos que nossos resultados confirmam o encontrado na literatura. A Figura 27 mostra essas etapas encontradas por Richards, sendo  $V(t)$  o volume total das partículas no meio reacional. Podemos ver também que nossos experimentos mostraram uma etapa adicional em alguns casos: a aglomeração entre partículas grandes ao final do experimento.

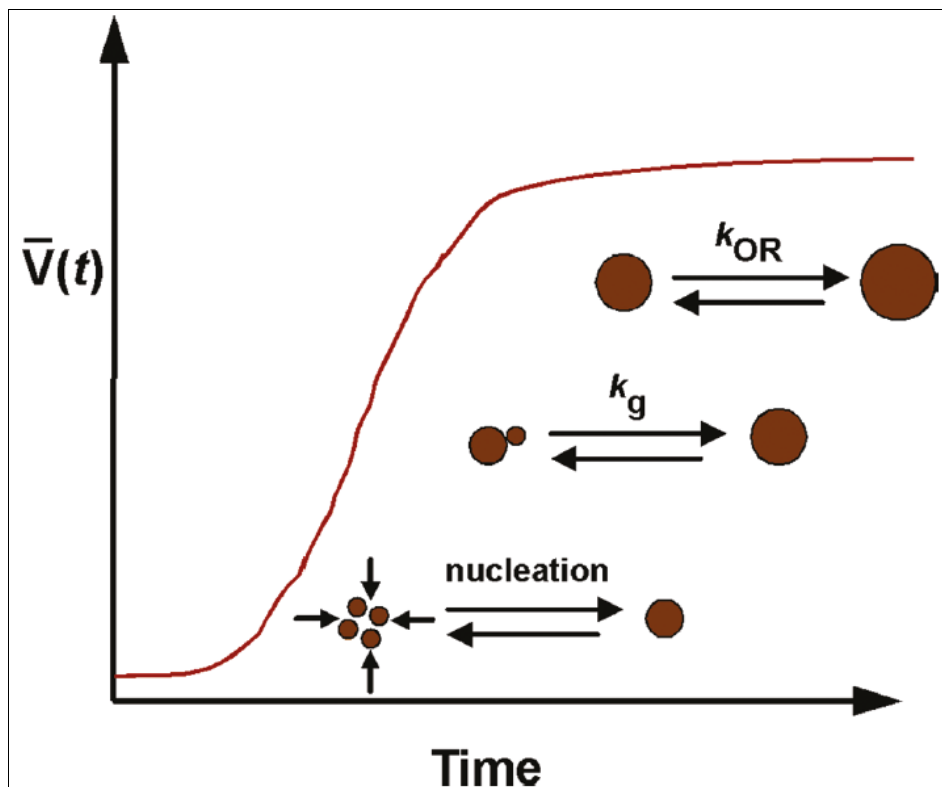


Figura 27 - Mecanismo de nucleação e crescimento das partículas.  $k_g$  é a constante de crescimento (growth) e  $k_{OR}$  é a constante do amadurecimento de Ostwald (Ostwald Ripening).

#### 5.4 Relação entre conversão e absorvância

As Figuras 28, 29 e 30 mostram a evolução da conversão da prata e a evolução da absorvância ao longo do tempo, em três diferentes condições. Podemos ver que existe uma relação direta entre conversão e absorvância.

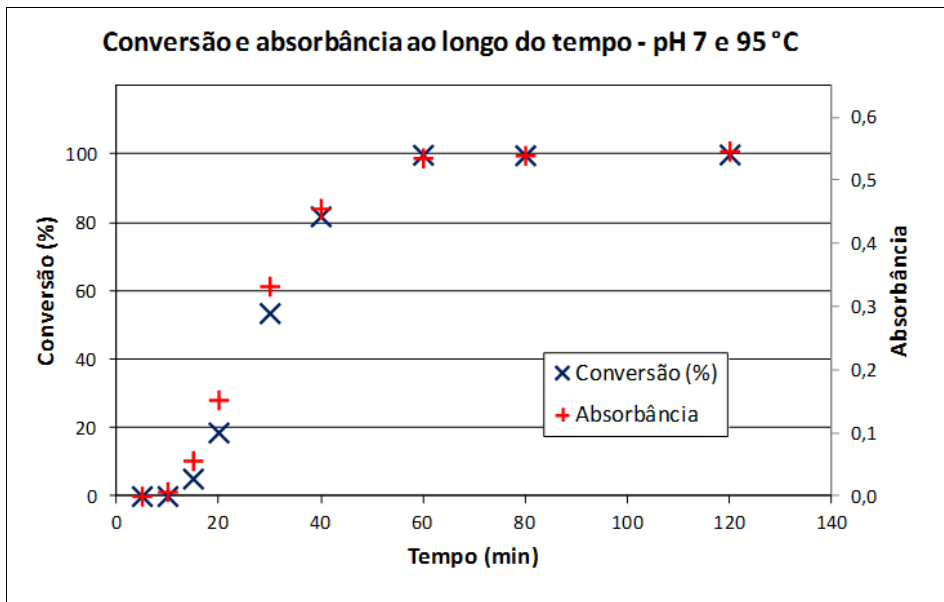


Figura 28 - Conversão e absorbância ao longo do tempo, a 95 °C e pH 7.

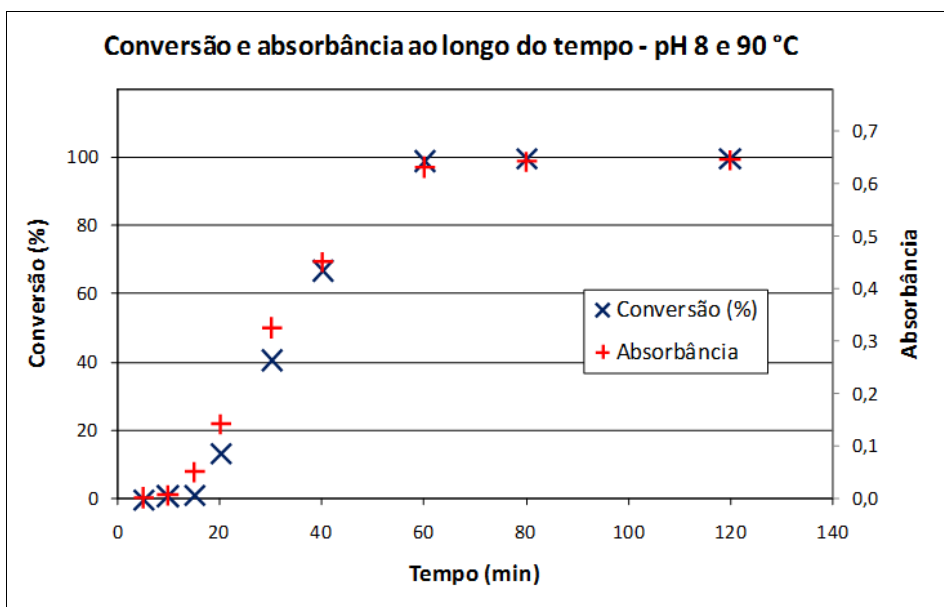


Figura 29 - Conversão e absorbância ao longo do tempo, a 90 °C e pH 8.

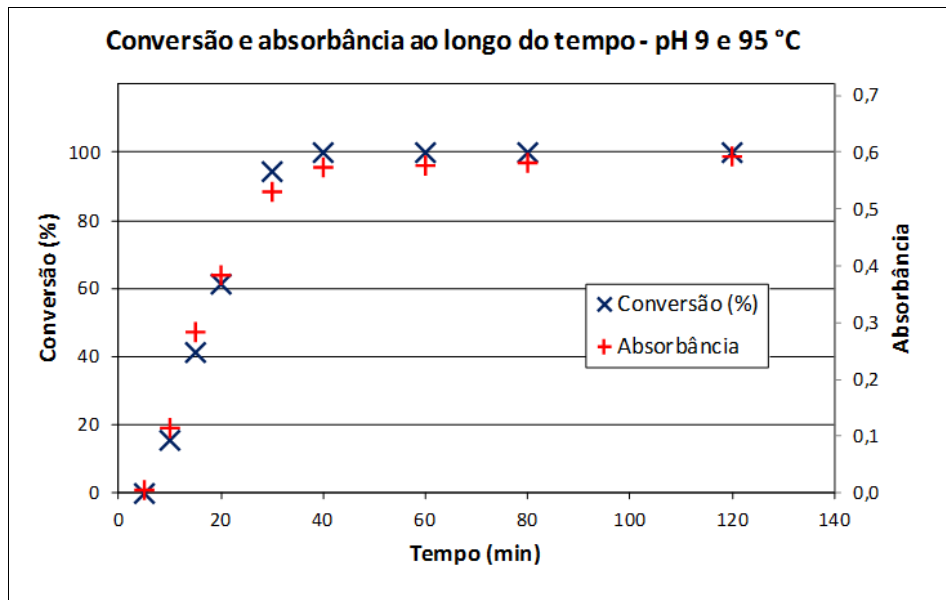


Figura 30 - Conversão e absorvância ao longo do tempo, a 95 °C e pH 9.

Assim, é possível estimar a conversão da reação (e a concentração de prata, por consequência) a partir de dados da absorvância. Esse é um resultado muito positivo, uma vez que análises de ICP são muito mais caras e demoradas do que as medições de absorvância, sem contar os custos de aquisição e manutenção dos equipamentos, e a necessidade de pessoal treinado e qualificado.

Nota-se, também, que, mesmo com diferentes valores finais de absorvância, experimentos de condições diferentes também atingem a mesma conversão final de aproximadamente 100%, como podemos ver pelas Figuras 26 e 31.

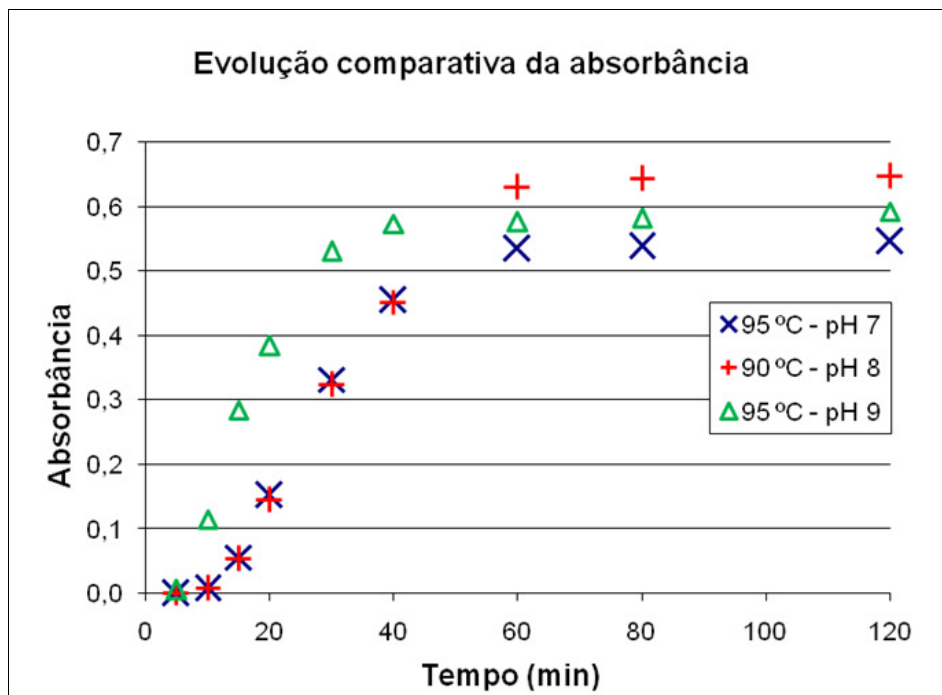


Figura 31 - Evolução da absorbância em 3 experimentos de diferentes condições.

Como em cada experimento o valor de 100% de conversão se relaciona a valores diferentes de absorbância máxima, deve-se utilizar valores de Absorbância relativa ao estimar as conversões, atribuindo o valor 100 para o valor máximo de absorção, e 0 (zero) para o valor mínimo. Dessa forma, chega-se facilmente às estimativas das conversões intermediárias. Deve-se tomar o cuidado de ter certeza de que a absorbância se estabilizou em seu valor máximo, ou o valor de 100% de conversão seria atribuído a um valor errado de absorbância.

As Figuras 32, 33 e 34 mostram a evolução da absorbância relativa e da conversão para os 3 ensaios.



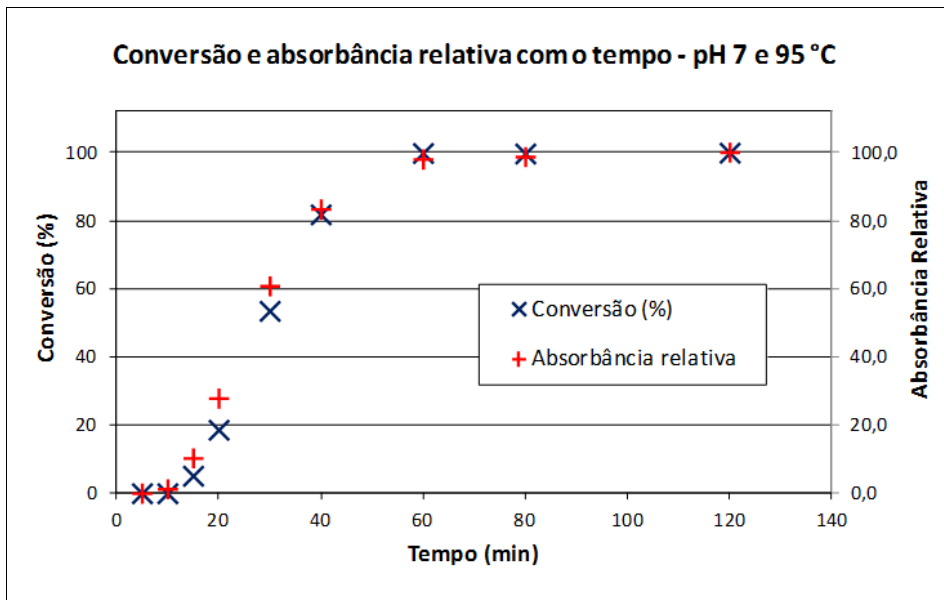


Figura 32 - Evolução da conversão e da absorbância relativa ao longo do tempo, em pH 7 e 95 °C.

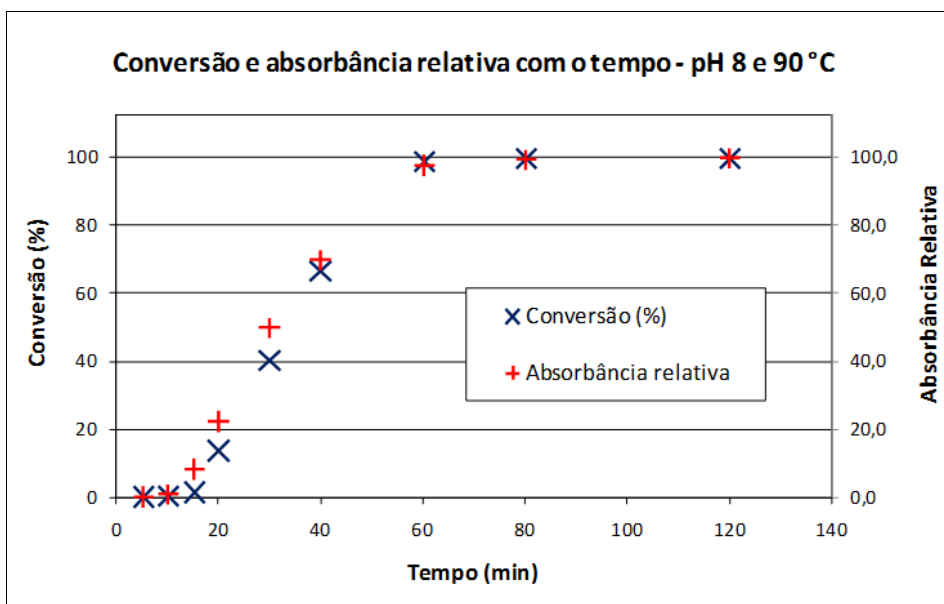


Figura 33 - Evolução da conversão e da absorbância relativa ao longo do tempo, em pH 8 e 90 °C.

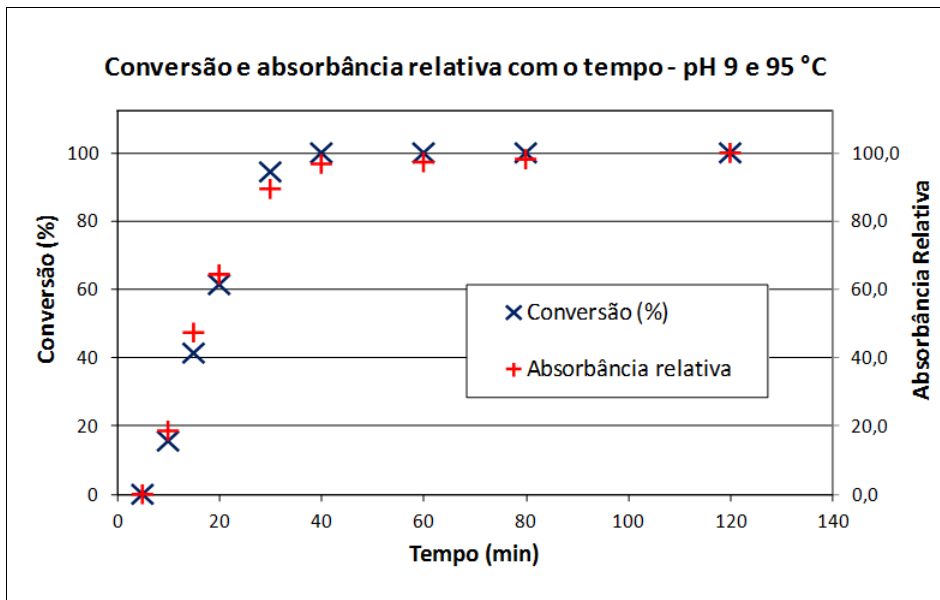


Figura 34 - Evolução da conversão e da absorbância relativa ao longo do tempo, em pH 9 e 95 °C.

Com os dados de absorbância relativa e de conversão, foram gerados os gráficos com as correlações para cada ensaio (Figuras 35, 36 e 37), e para os 3 ensaios (Figura 38).

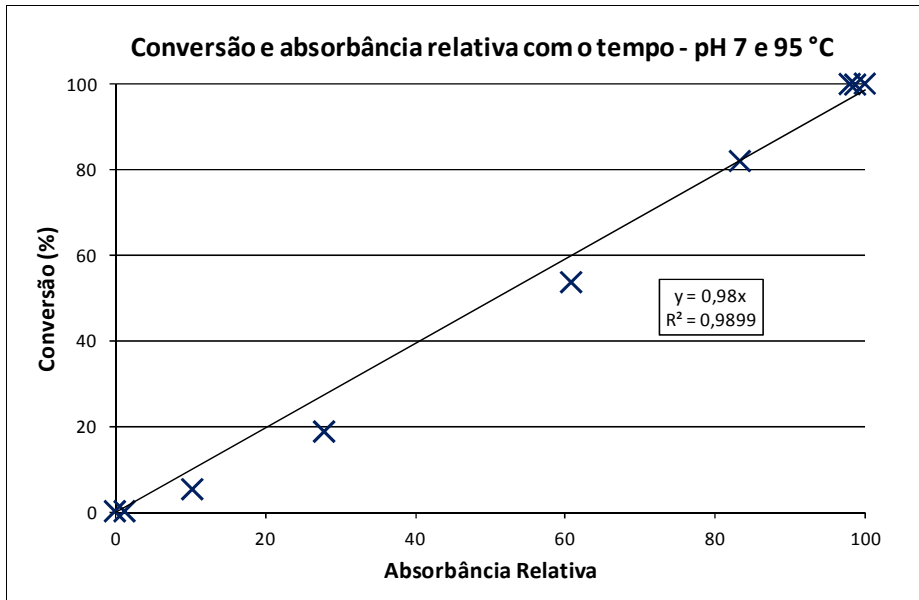


Figura 35 - Relação entre Conversão e Absorvância Relativa, em pH 7 e 95 °C.

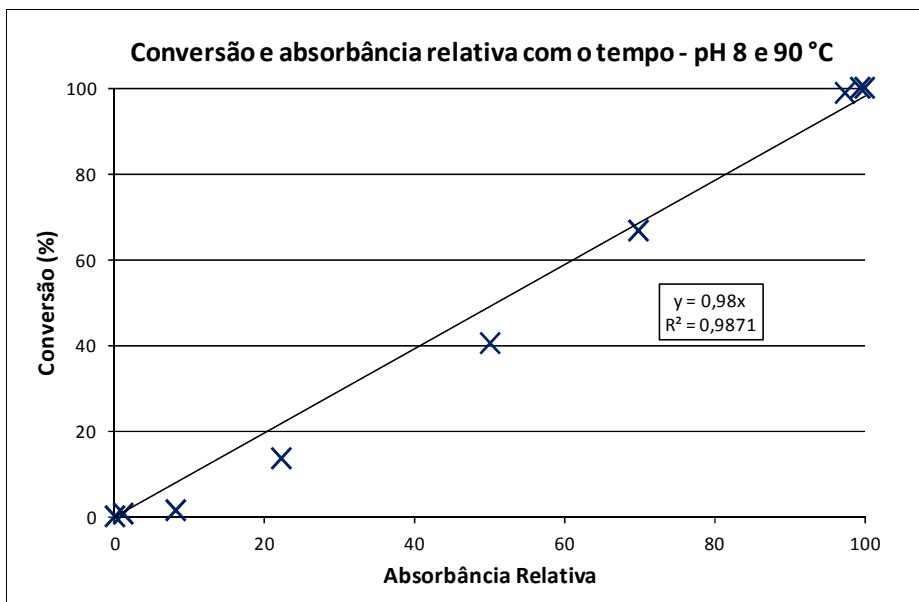


Figura 36 - Relação entre Conversão e Absorvância Relativa, em pH 8 e 90 °C.

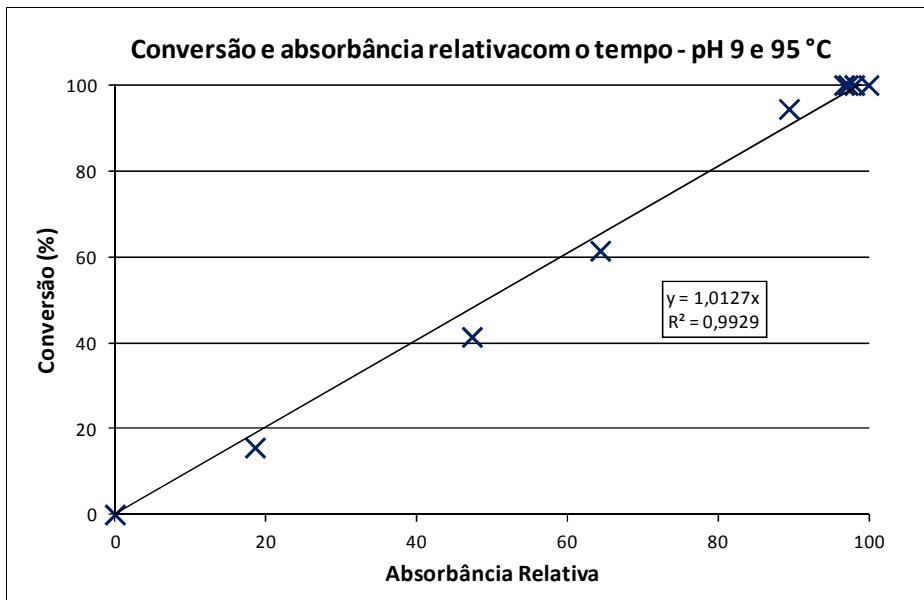


Figura 37 - Relação entre Conversão e Absorvância Relativa, em pH 9 e 95 °C.

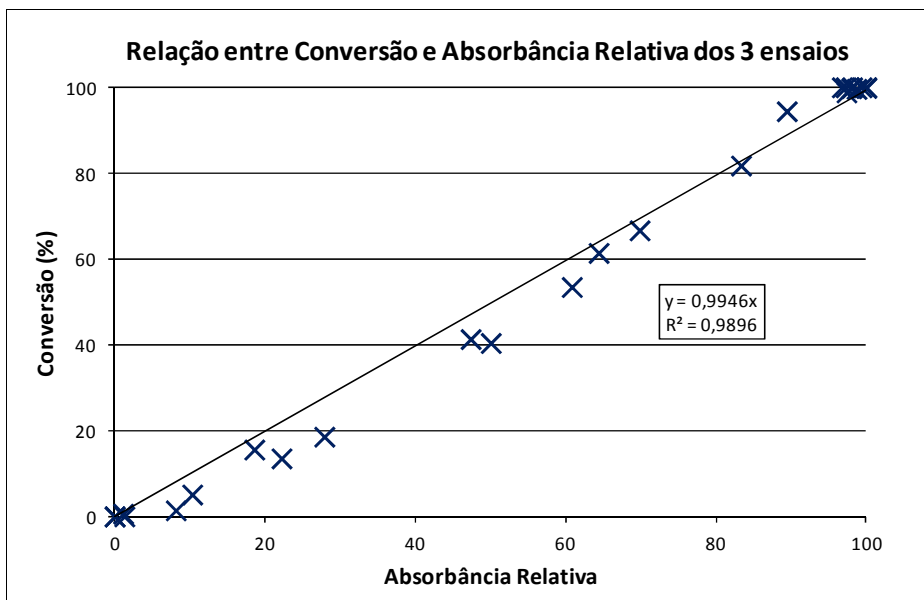


Figura 38 - Correlação entre conversão e absorvância relativa dos 3 ensaios.

Pode-se ver que existe uma boa correlação entre absorvância e a conversão ( $R^2$  varia entre 0,9871 e 0,9929). No entanto, nota-se que alguns pontos se distanciam bem do valor desejado. Na figura 33, aos 30 minutos, por exemplo, a absorvância relativa indica uma conversão estimada de 50%, ao passo que a conversão real, calculada a partir da análise de ICP, aponta uma conversão de 40%. A Tabela 4, abaixo, mostra os valores reais e os valores estimados a partir da absorvância relativa. Podemos observar que os desvios ficam entre 0 e 9,63 (média de  $3,08 \pm 3,075$ ). Mesmos com esses desvios, pode-se ver que a absorvância relativa representa uma boa ferramenta para se estimar a conversão da reação.

Tabela 4 - Conversão estimada a partir da absorvância relativa, e conversão real, obtida pela análise de ICP.

Condições	Tempo (min)	Conversão estimada	Conversão real	Desvio
95 °C, pH 7	5	0,00	0,00	0,00
	10	1,29	0,00	1,29
	15	10,32	5,12	5,20
	20	27,89	18,61	9,29
	30	60,84	53,48	7,36
	40	83,35	81,78	1,57
	60	97,99	99,77	1,78
	80	98,72	99,63	0,91
	120	100,00	99,86	0,14
90 °C, pH 8	5	0,00	0,00	0,00
	10	1,12	0,65	0,47
	15	8,13	1,42	6,71
	20	22,20	13,55	8,65
	30	50,04	40,42	9,63
	40	69,84	66,68	3,16
	60	97,37	98,81	1,44
	80	99,38	100,00	0,62
	120	100,00	100,00	0,00
95 °C, pH 9	5	0,00	0,00	0,00
	10	18,58	15,58	3,00
	15	47,37	41,36	6,01
	20	64,40	61,42	2,98
	30	89,44	94,43	4,99
	40	96,76	100,00	3,24
	60	97,27	100,00	2,73
	80	98,13	100,00	1,87
	120	100,00	100,00	0,00

Estes resultados confirmam a hipótese inicial de relação direta entre absorvância e conversão. Conclui-se, portanto, que as diferentes morfologias de nanopartículas são obtidas ao longo do processo de conversão. Partículas obtidas nos estágios iniciais do processo estão imersas num meio contendo quantidades substanciais de prata na forma iônica. Tal dispersão pode apresentar vantagens para o emprego das dispersões com agente bactericida ao aliar o efeito de prata iônica e nanométrica. Por outro lado, caso seja de interesse utilizar apenas as nanopartículas, será necessário desenvolver método para separar as partículas do meio reacional, sem que haja agregação. Do ponto de vista de economia de átomos, também é desejável desenvolver métodos para converter completamente a prata na morfologia desejada. Talvez o uso de agentes estabilizantes mais eficientes melhore o processo, no sentido de evitar aglomeração e aumentar o controle do crescimento das partículas.

## 6 Conclusões

O método de Turkevich modificado foi aplicado para se obter partículas de prata metálica de dimensões nanométricas, usando diferentes valores de pH e temperatura. Os experimentos foram feitos em pH 7, 8 e 9, e em temperaturas de 85, 90 e 95 °C.

Com os ensaios exploratórios, foi feita uma hipótese para o mecanismo de formação e desenvolvimento das nanopartículas, além de sugerirmos uma relação direta entre a absorvância e a conversão da reação. Com os experimentos seguintes, mais detalhados, essa hipótese foi confirmada, e um método para estimar a conversão, a partir da absorvância, foi desenvolvido.

A conversão da prata iônica em prata metálica nanoparticulada ocorre da seguinte forma: há um período de indução, onde se forma uma grande quantidade de núcleos primários e a conversão é próxima de zero, seguido de uma fase de conversão rápida, onde ocorre um crescimento agregativo e amadurecimento de Ostwald, até a conversão completa.

Foi realizada uma análise detalhada da evolução morfológica das nanopartículas de prata ao longo do tempo. Ficou claro que uma grande quantidade de núcleos primários se forma logo no início da reação, mas eles são instáveis, com grande tendência a se aglomerar. Esses núcleos se aglomeram e continuam crescendo (crescimento agregativo), ou se dissolvem para fornecer material para o crescimento das outras partículas, quando a quantidade de prata iônica se torna baixa (amadurecimento de Ostwald).

Com o crescimento agregativo e com o amadurecimento de Ostwald, surgem duas populações de tamanhos distintos, uma com tamanhos em torno de 10 a 20 nm, e outra com tamanhos entre 70 e 90 nm. Na maioria dos casos, essas populações são formadas por partículas dispersas, formando aglomerados em poucos casos.

Quando a reação se aproxima dos 100% de conversão, o desenvolvimento das nanopartículas atinge sua etapa final, com o desaparecimento das nanopartículas menores. Nesse ponto, verifica-se a presença apenas das partículas maiores e dispersas, que permanecem com tamanhos entre 70 e 90 nm. As partículas menores se aglomeraram durante o crescimento agregativo, ou se dissolveram durante o amadurecimento de Ostwald. Deixando que o processo continue mesmo depois de atingir 100% de conversão faz com que as nanopartículas se aglomerem.

Esses resultados mostram que é possível, numa mesma reação, obter nanopartículas de diversos tipos de morfologia. Pode-se parar a reação no momento em que houver nanopartículas na forma desejada, apenas diminuindo a temperatura bruscamente. Caso o objetivo seja de produzir apenas as nanopartículas iniciais de tamanho pequeno, sem a prata iônica que não reagiu, deve-se desenvolver um método para separar as nanopartículas, e dispersá-las novamente em outro meio, sem que ocorra a aglomeração.

Como o citrato é um agente estabilizante fraco, mais estudos são necessários para se verificar como ocorre o mecanismo de nucleação e crescimento das nanopartículas na presença de agentes estabilizantes mais eficientes, como o PVP, e o PVA. Possivelmente, na presença de tais estabilizantes, o crescimento seria menor, assim como o grau de aglomeração.

Com os dados de absorvância e de conversão, foi possível estabelecer uma relação direta entre os dois parâmetros, permitindo a estimativa dos valores de conversão com erros relativamente baixos. Para facilitar a estimativa da conversão e possibilitar a comparação entre experimentos diferentes, sugerimos o uso da absorvância relativa, entre 0 e 100.



## 7 Bibliografia

AshaRani, P. V.; Mun, G. L. K.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, v. 3, n. 2, p. 279–290, 2009.

Bera, R. K.; Das, A. K.; Raj, C. R. Enzyme-Cofactor-Assisted Photochemical Synthesis of Ag Nanostructures and Shape-Dependent Optical Sensing of Hg (II) Ions. *Chemistry of Materials*, v. 22 n.15, p. 4505-4511, 2010.

Brandl, D. W.; Mirin, N. A.; Nordlander, P. Plasmon Modes of Nanosphere Trimers and Quadrumers. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 25, p. 12302-12310, Jun 2006.

Carlson, C.; Hussain, S. M.; Schrand, A. M.; Braydich-Stolle, L. K.; Hess, K. L.; Jones, R. L.; Schlager, J. J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B*, v. 112, n. 43, p. 13608–13619, Oct 2008.

Chen, X.; Schluesener, H. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*, v. 176, n. 1, p. 1–12, 2008.

Choi, O.; Hu, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol*, v. 42, n. 12, p. 4583–4588, May 2008.

Choi, O.; Deng, K. K.; Kim, N. J.; Ross, Jr. L.; Surampalli, R. Y.; Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, v. 42, n. 12, p. 3066–3074, Jun 2008.

Dahl, J. A.; Maddux, B. L. S.; Hutchison, J. E. Toward Greener Nanosynthesis. *Chemical Reviews*, v. 107, n. 6, p. 2228-2269, Jun 2007.

Dibrov, P.; Dzioba, J.; Gosink, K.; Hase, C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 8, p. 2668–2670, Aug 2002.

Feng, Q.; Wu, J.; Chen, G.; Cui, F.; Kim, T.; Kim, J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*, v. 52, n. 4, p. 662–668, Dec 2000.

Hatzigrigoriou, N. B.; Papaspyrides, C. D. Nanotechnology in plastic food-contact materials. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 122, n. 6, p. 3719-3738, Dec 2011.

Hatzor, A.; Weiss, P. S. Molecular Rulers for Scaling Down Nanostructures. *Science*, v. 291, n. 5506, p. 1019-1020, Mar 2001.

Holt, K.; Bard, A. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry*, v. 44, n. 39, p. 13214–13223, Oct 2005.

Jana, S.; Pal, T. Synthesis, Characterization and Catalytic Application of Silver Nanoshell Coated Functionalized Polystyrene Beads. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 7, n. 6, p. 2151–2156, Jun 2007.

Jiang, X. C.; Chen, C. Y.; Chen, W. M.; Yu, A. B. Role of Citric Acid in the Formation of Silver Nanoplates through a Synergistic Reduction Approach. *Langmuir*, v. 26, n. 6, p. 4400-4408, Mar 2010.

Jung, W.; Koo, H.; Kim, K.; Shin, S.; Kim, S.; Park, Y. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, v. 74, n. 7, p. 2171–2178, Apr 2008.

Kim, J.; Kuk, E.; Yu, K.; Kim, J.; Park, S.; Lee, H.; Kim, S.; Park, Y.; Park, Y.; Hwang, C.; Kim, Y.; Lee, Y.; Jeong, D.; Cho, M. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol*, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.

Lee, P.; Meisel, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 86, n. 17, p. 3391–3395, Aug 1982.

Leopold, N.; Lendl, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 107, n. 24, p. 5723-5727, Jun 2003.

Liau, S.; Read, D.; Pugh, W.; Furr, J.; Russell, A. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol*, v. 25, n. 4, p. 279–283, Oct 1997.

Lok, C.; Ho, C.; Chen, R.; He, Q.; Yu, W.; Sun, H.; Tam, P.; Chiu, J.; Che, C. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*, v. 5, n. 4, p. 916–924, Apr 2006.

Lok, C-N.; Ho, C-M.; Chen, R.; He, Q-Y.; Yu, W-Y.; Sun, H.; Tam, P. K-H.; Chiu, J-F.; Che, C-M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 12, n. 4, p. 527-534, Feb 2007.

Lu, X.; Rycenga, M.; Skrabalak, S. E.; Wiley, B.; Xia, Y. Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles. *Annual review of physical chemistry*, v. 60, p. 167–192, May 2009.

Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, Mar 2010.

Maria, L. C. S.; Santos, A. L. C.; Oliveira, P. C.; Valle, A. S. S.; Barud, H. S.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S. J. L. Preparation and antibacterial activity of silver nanoparticles impregnated in bacterial cellulose. *Polímeros*, v. 20, n. 1, p. 72–77, Feb 2010.

Martínez-Castañón, G. A.; Niño-Martínez, N.; Martínez-Gutierrez, F.; Martínez-Mendoza, J. R.; Ruiz, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, n. 8, p. 1343-1348, Jul 2008.

Mendis, E.; Rajapakse, N.; Byun, H.; Kim, S. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci*, v. 77, n. 17, p. 2166–2178, Sep 2005.

Mermel, L. A. Prevention of intravascular catheter-related infections. *Annals of Internal Medicine*, v. 32, n. 5, p. 391-402, Mar 2000.

Mermel, L. A.; Farr, B. M.; Sherertz, R. J.; Raad, I. I.; O'Grady, N.; Harris, J. S.; Craven, D. E. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Infection control and Hospital Epidemiology*, v. 22, n. 4, p. 222-242, Apr 2001.

Morones, J.; Elechiguerra, J.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.; Ramirez, J.; Yacaman, M. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, Aug 2005.

Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, v. 311, n. 5761, p. 622-627, Feb 2006.

Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, Mar 2007.

Patungwasa, W.; Hodak, J. H. pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction. *Materials Chemistry and Physics*, v. 108, n. 1, p. 45-54, Mar 2008.

Paula, M. M.; Costa, C. S.; Baldin, M. C.; Scaini, G.; Rezin, G. T.; Segala, K.; Andrade, V. M.; Franco, C. V.; Streck, E. L. In vitro effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 8, p. 1556-1560, Aug 2009.

PEN - The Project on Emerging Nanotechnologies. Disponível em <[http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis\\_draft/](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/)> acessado em 11 de agosto de 2011.

Petering, H. Pharmacology and toxicology of heavy metals- silver. *Pharmacol Ther A*, v. 1, n. 2, p. 127-130, 1976.

Pillai, Z. S.; Kamat, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 3, p. 945-951, Jan 2004.

Raffi, M.; Hussain, F.; Bhatti, T.; Akhter, J.; Hameed, A.; Hasan, M. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *J Mater Sci Technol*, v. 24, n. 2, p. 192-196, 2008.

Richards, V. N.; Rath, N. P.; Buhro, W. E. Pathway from a Molecular Precursor to Silver Nanoparticles: The Prominent Role of Aggregative Growth. *Chemistry of Materials*, v. 22, n. 11, p.3556–3567, May 2010.

Smetana, A.; Klabunde, K.; Marchin, G.; Sorensen, C. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir*, v. 24, n. 14, p. 7457–7464, Jun 2008.

Santana, H.; Zaia, D. A. M.; Corio, P.; El Haber, F.; Louarn, G. Preparation and characterization of SERS-active substrates: a study of the crystal violet adsorption on silver nanoparticles. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 194–199, Apr 2006.

Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, v. 275, n. 1, p. 177–182, Jul 2004.

Stohs, S. J.; Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radic Biol Med*, v. 18, n. 2, p. 321–336, Feb 1995.

Szmacinski, H.; Lakowicz, J. R.; Catchmark, J. M.; Eid, K.; Anderson, J. P.; Middendorf, L. Correlation Between Scattering Properties of Silver Particle Arrays and Fluorescence Enhancement. *Applied spectroscopy*, v. 62, n. 7, p. 733–738, Jul 2008.

Turkevich, J.; Stevenson, P.C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, v. 11, p. 55-75, 1951.

Turkevich, J.; Garton, G.; Stevenson, P. The color of colloidal gold. *Journal of colloid Science*, v. 9, n. 1, p. 26–35, 1954.

Vertelov, G.; Krutyakov, Y.; Efremenkova, O.; Olenin, A.; Lisichkin, G. A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 19, n. 35, Sep 2008.

Xu, X.; Yang, Q.; Wang, Y.; Yu, H.; Chen, X.; Jing, X. Biodegradable electrospun poly(L-lactide) fibers containing antibacterial silver nanoparticles. *Eur Phys J D*, v. 42, n. 9, p. 2081–2087, Sep 2006.

Yan, Y.; Kang, S. Z.; Mu, J. Preparation of high quality Ag film from Ag nanoparticles. *Applied Surface Science*, v. 253, n. 10, p. 4677–4679, Mar 2007.

Yang, W.; Shen, C.; Ji, Q.; An, H.; Wang, J.; Liu, Q.; Zhang, Z. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology*, v. 20, n. 8, Feb 2009.

Yoon, K.; Byeon, J.; Park, C.; Hwang, J. Antimicrobial effect of silver particles on bacterial contamination of activated carbon fibers. *Environ Sci Technol*, v. 42, n. 4, p. 1251–1255, Jan 2008a.

Yoon, K.; Byeon, J.; Park, J.; Ji, J.; Bae, G.; Hwang, J. Antimicrobial characteristics of silver aerosol nanoparticles against *Bacillus subtilis* bioaerosols. *Environ Eng Sci*, v. 25, n. 2, p. 289–293, Mar 2008b.

Zanchet, D.; Moreno, M.; Ugarte, D. Anomalous packing in thin nanoparticle supercrystals. *Physical review letters*, v. 82, n. 26, p. 5277–5280, Jun 1999.

Zhang, L.; Fang, X.; Ye, C. Controlled Growth of Nanomaterials. Singapura, 2007, 1<sup>a</sup> Ed. Copyright by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2007.

## 8 Anexo A - Imagens MEV

85 °C, pH 7

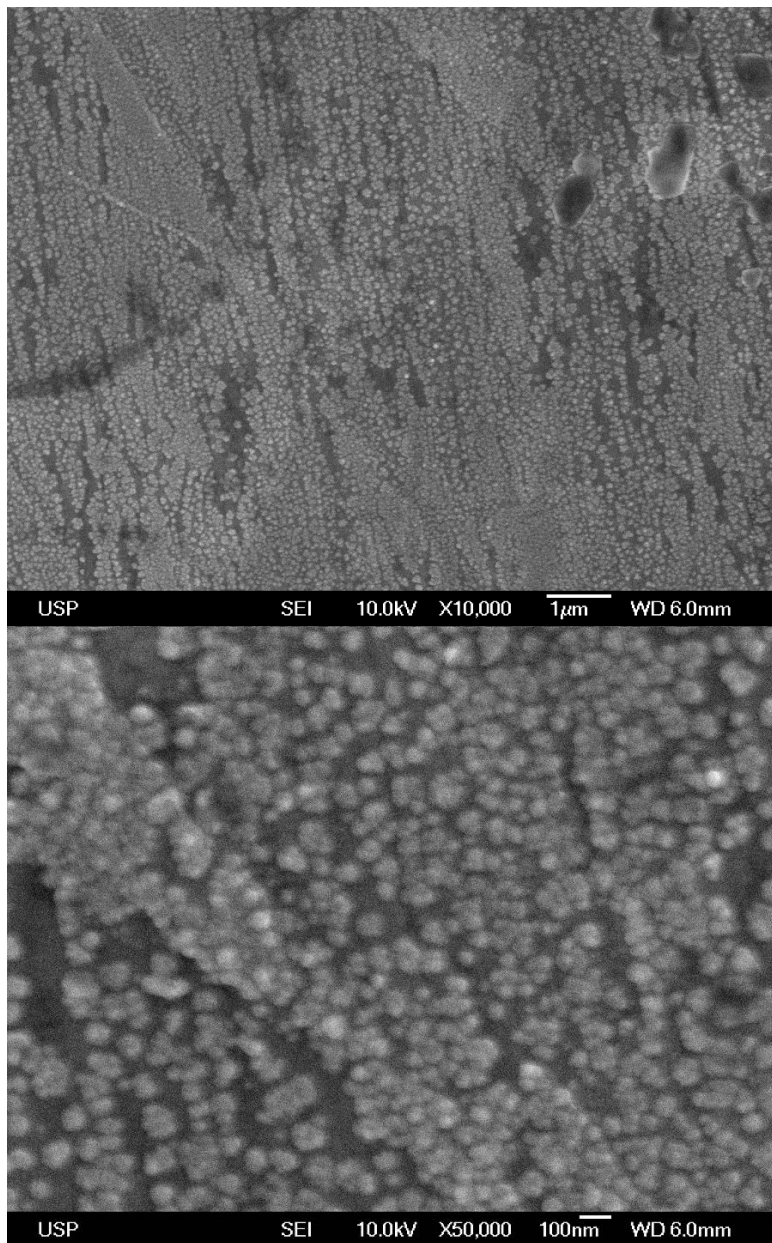


Figura A 1 - 85 °C, pH 7, aos 10 minutos de reação

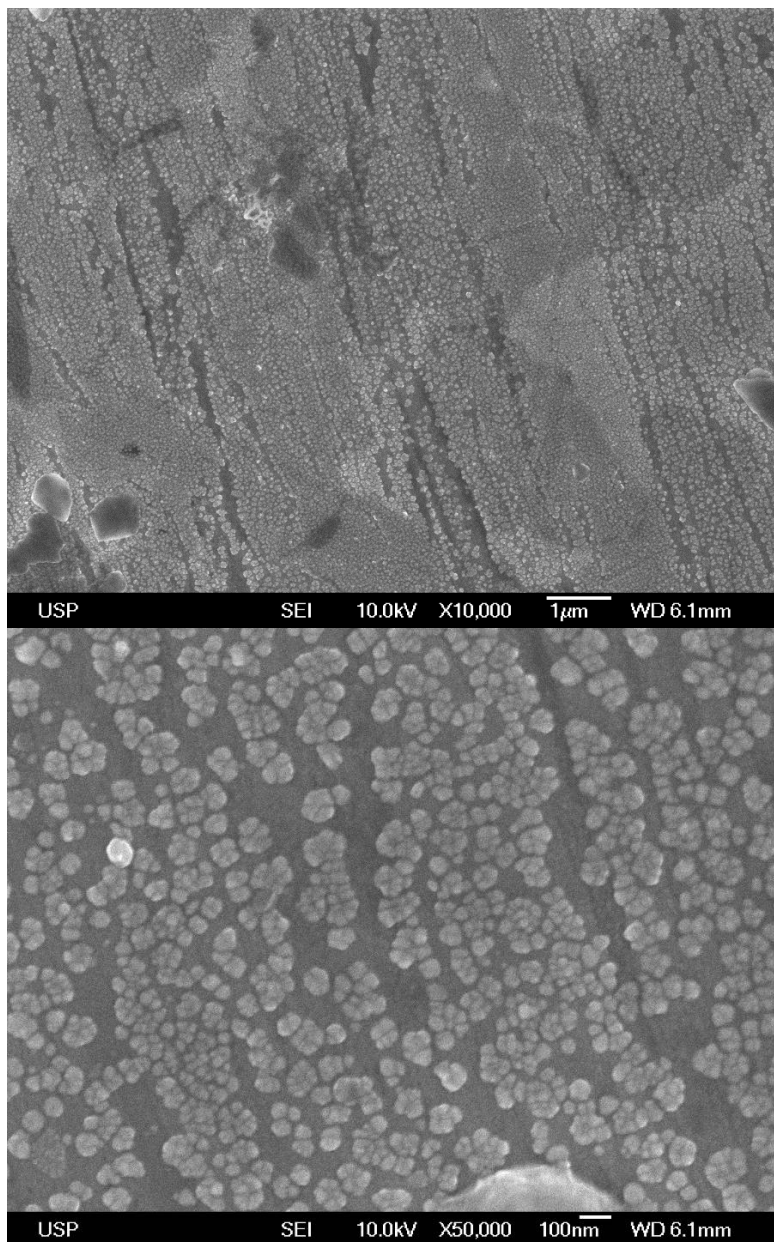


Figura A 2 - 85 °C, pH 7, aos 20 minutos de reação



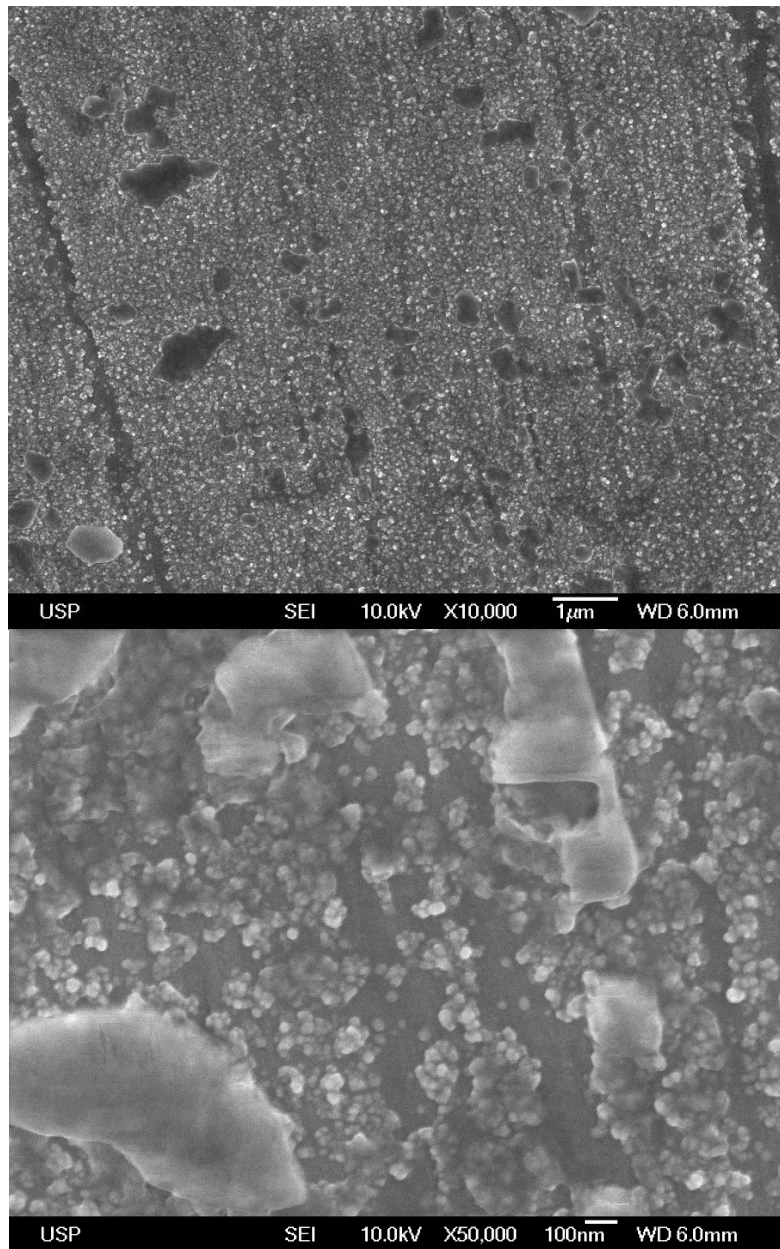


Figura A 3 - 85 °C, pH 7, aos 30 minutos de reação

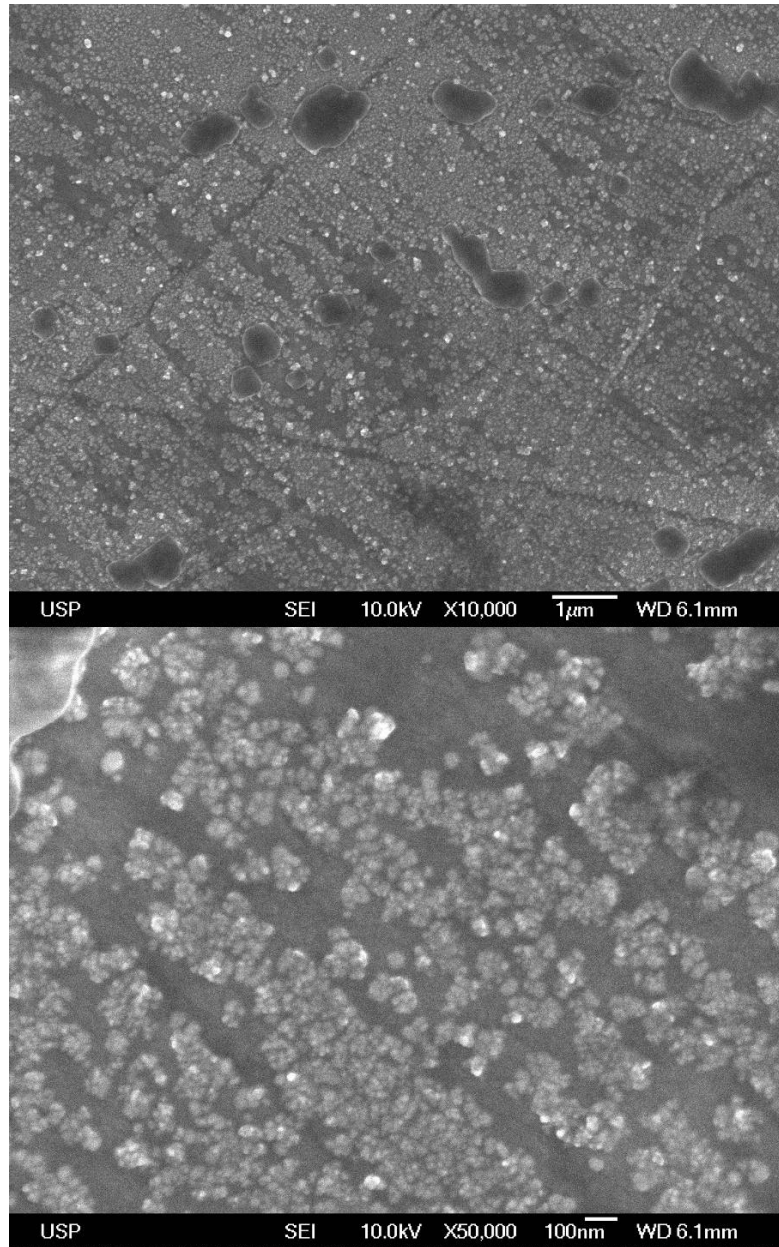


Figura A 4 - 85 °C, pH 7, aos 40 minutos de reação

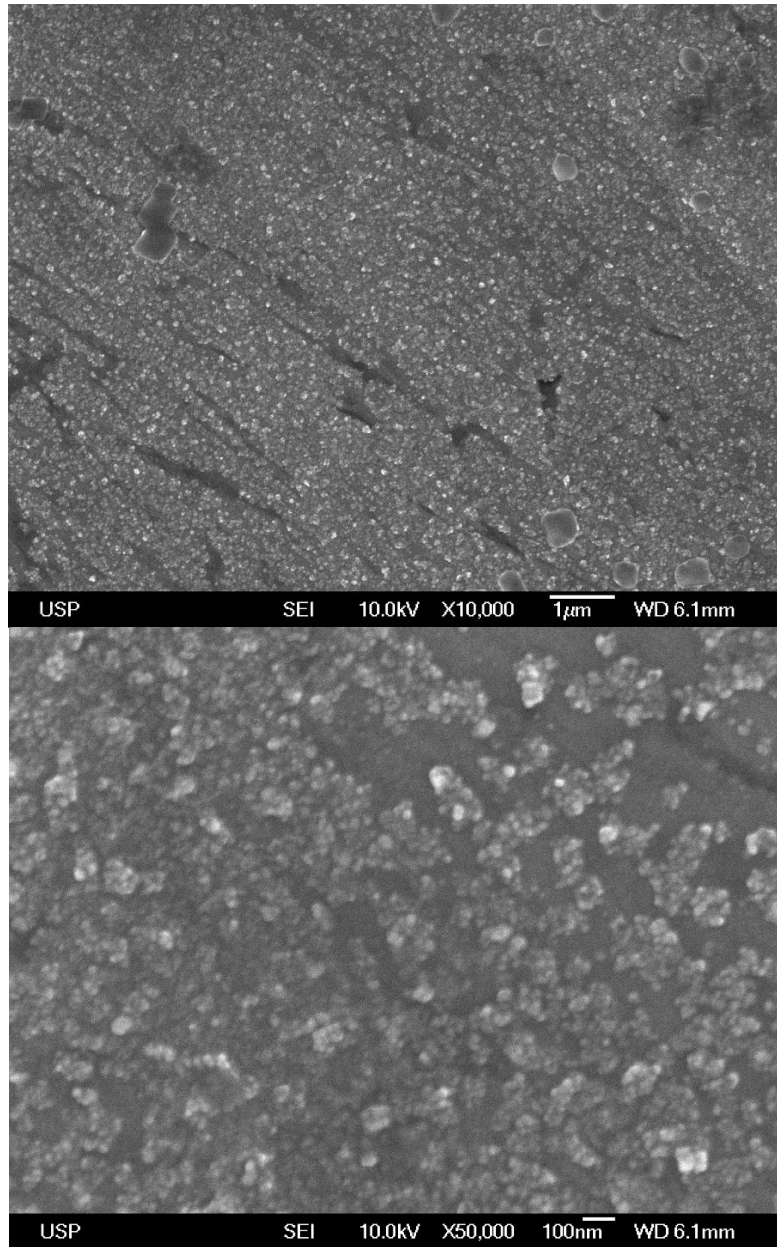


Figura A 5 - 85 °C, pH 7, aos 60 minutos de reação

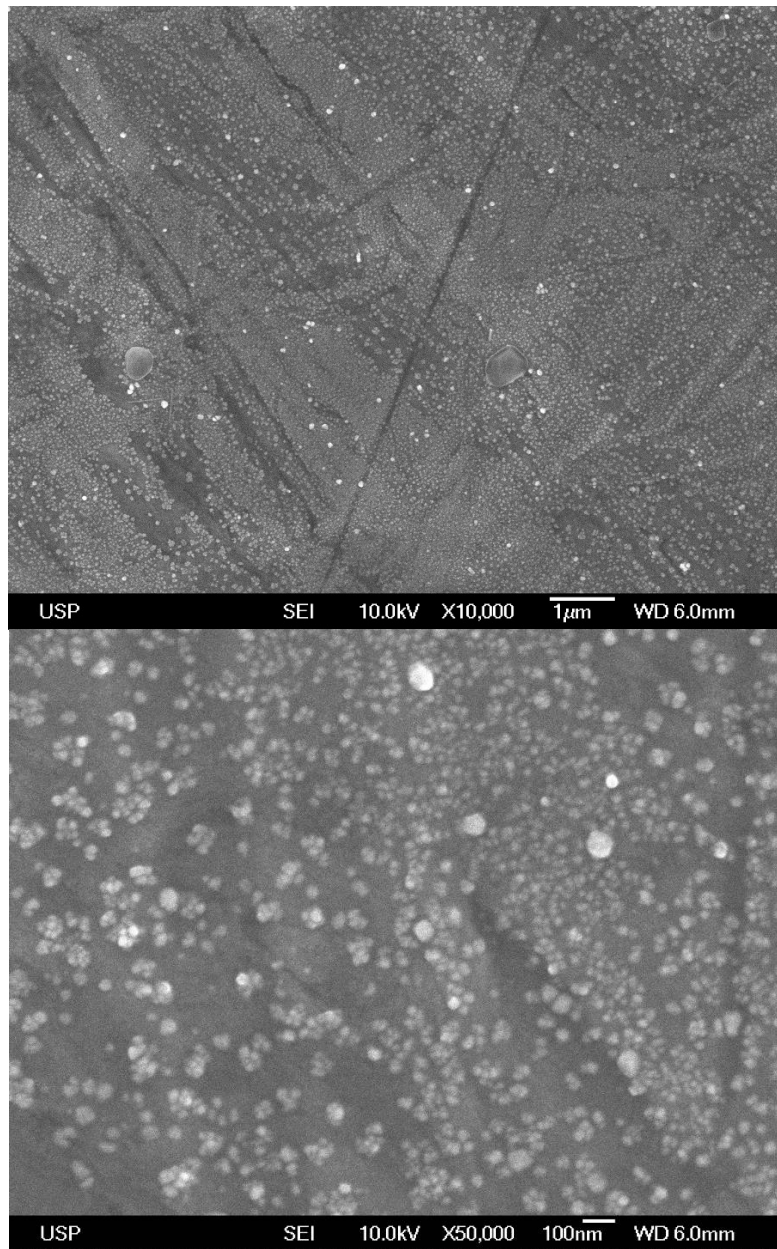


Figura A 6 - 85 °C, pH 7, aos 80 minutos de reação

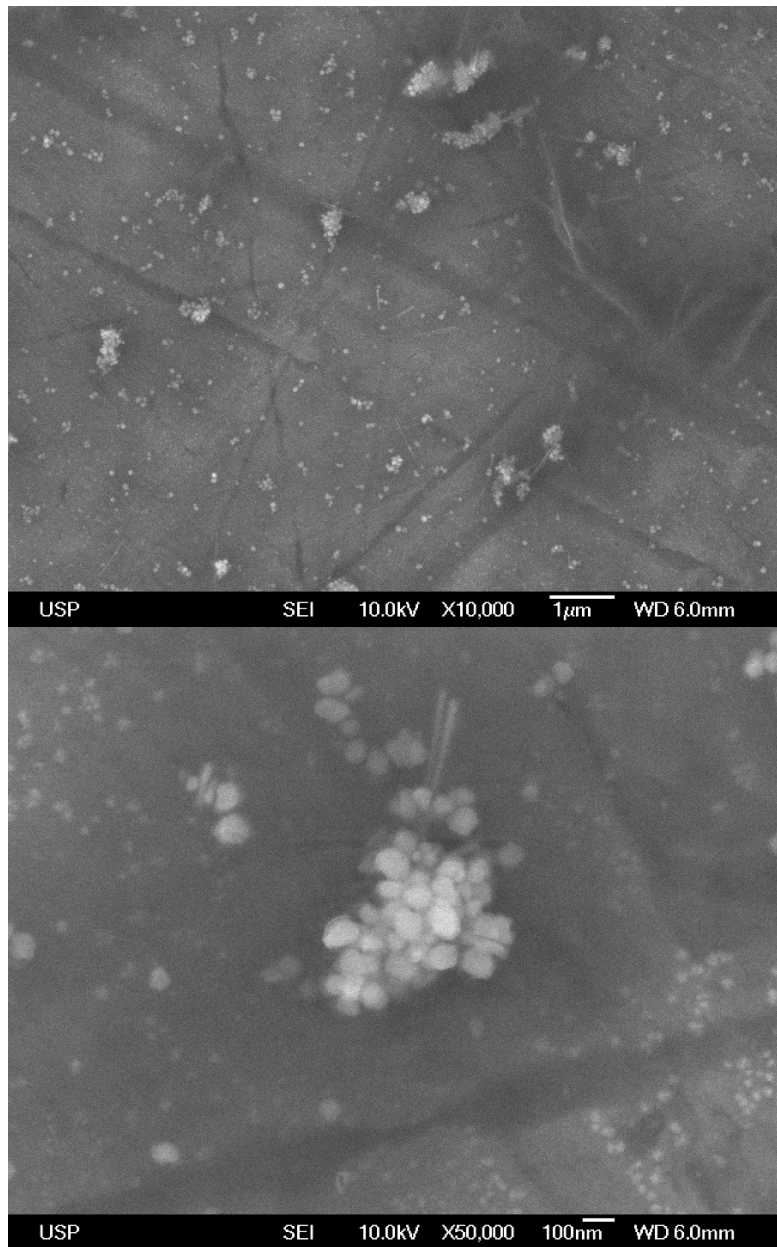


Figura A 7 - 85 °C, pH 7, aos 120 minutos de reação

90 °C, pH 7

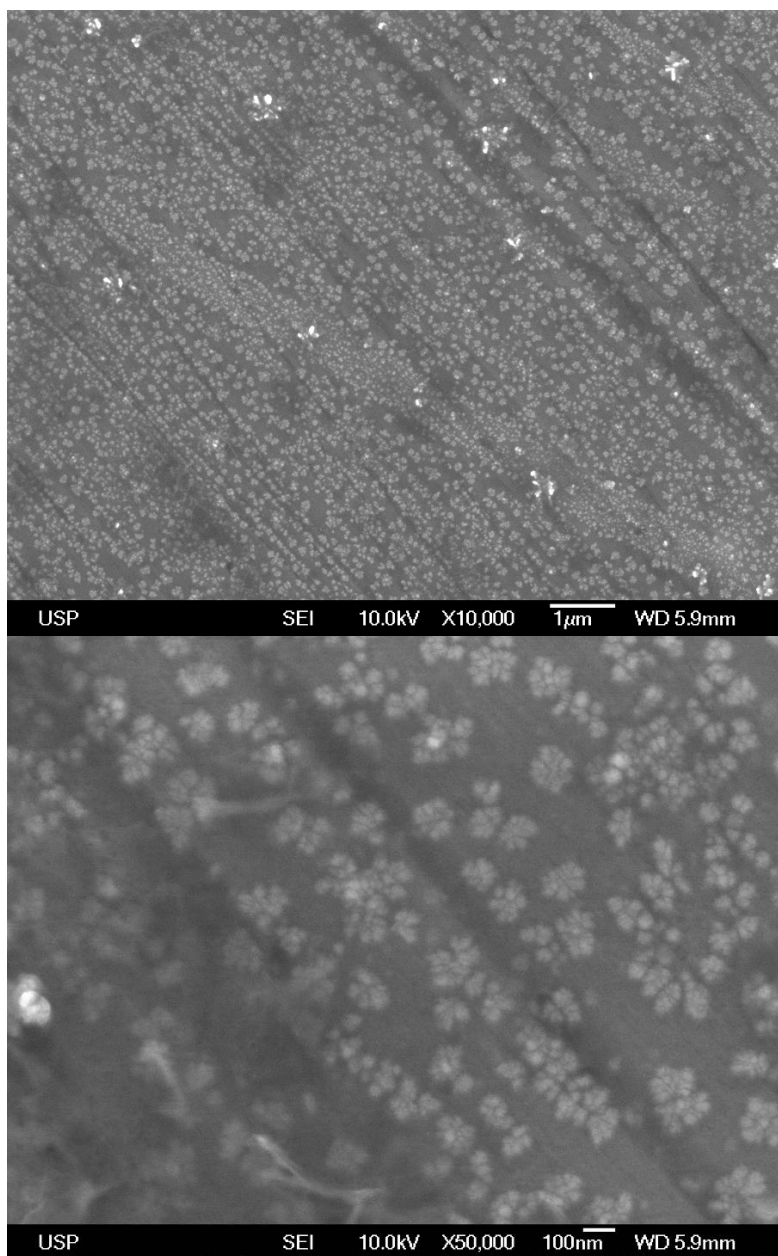


Figura A 8 - 90 °C, pH 7, aos 10 minutos de reação

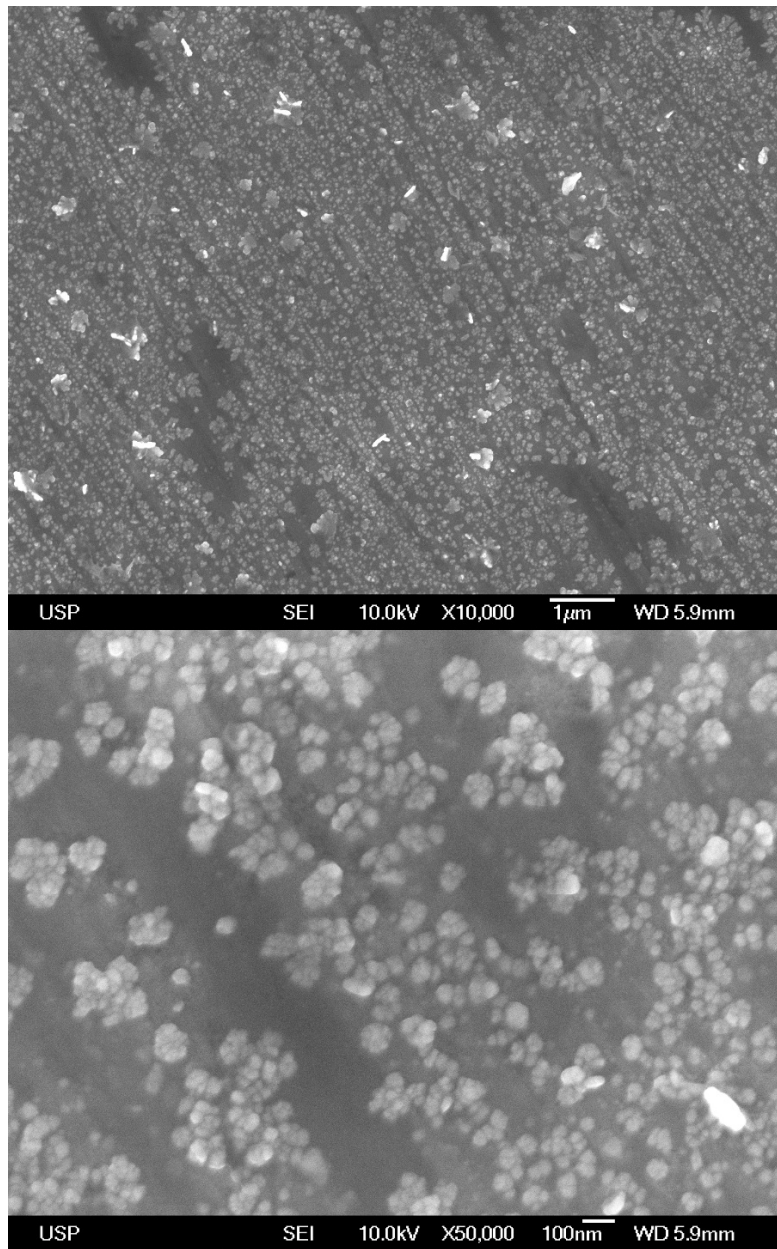


Figura A 9 - 90 °C, pH 7, aos 20 minutos de reação

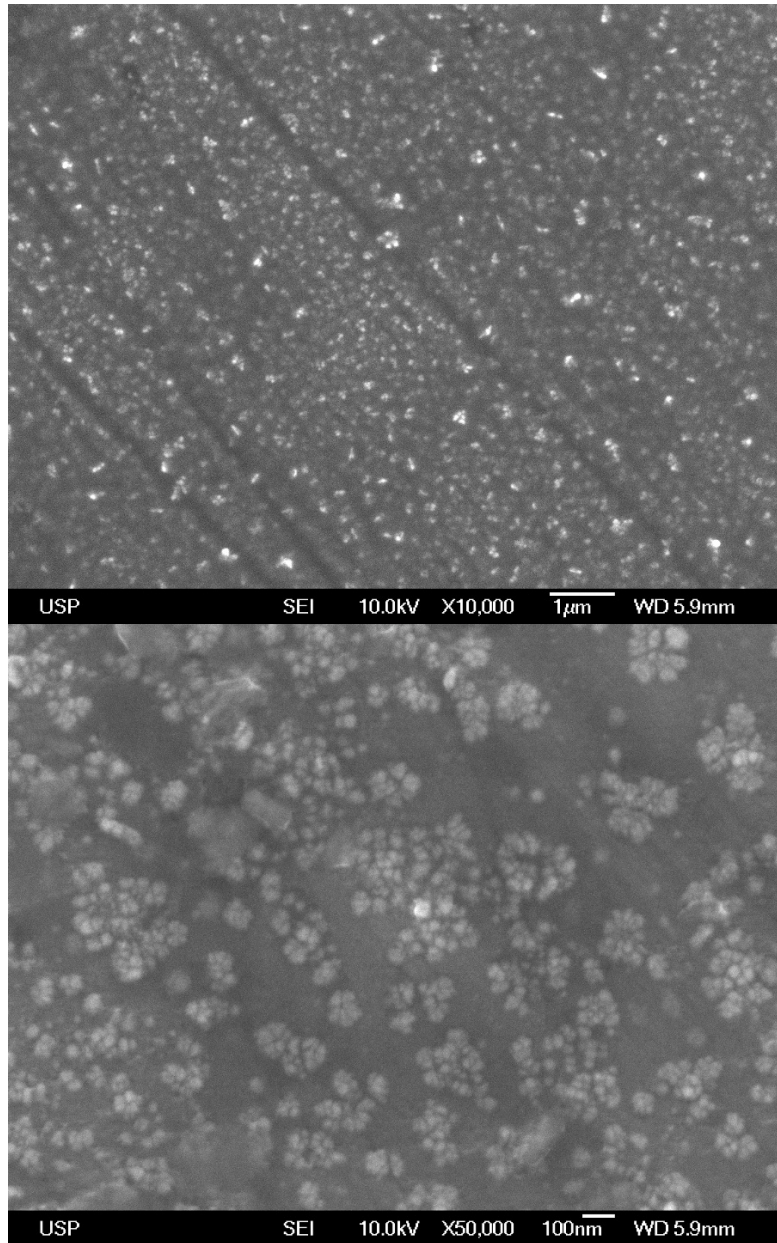


Figura A 10 - 90 °C, pH 7, aos 30 minutos de reação



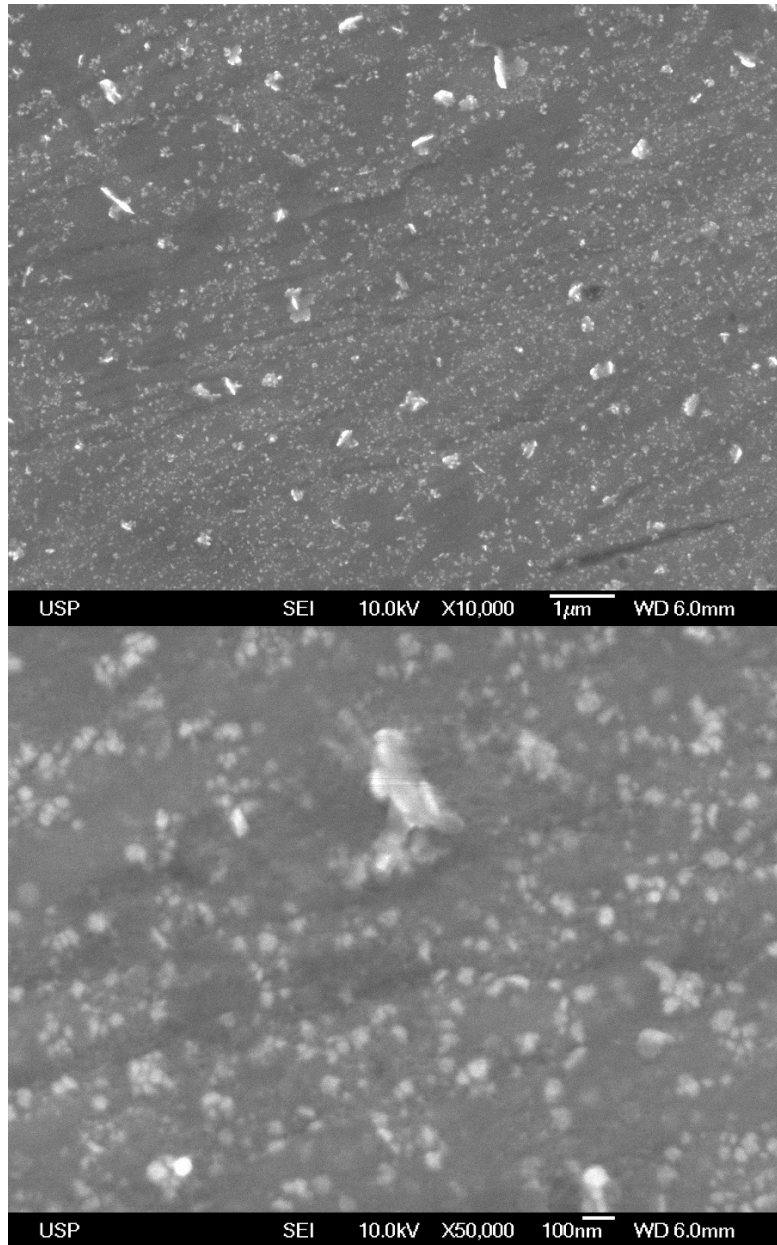


Figura A 11 - 90 °C, pH 7, aos 40 minutos de reação

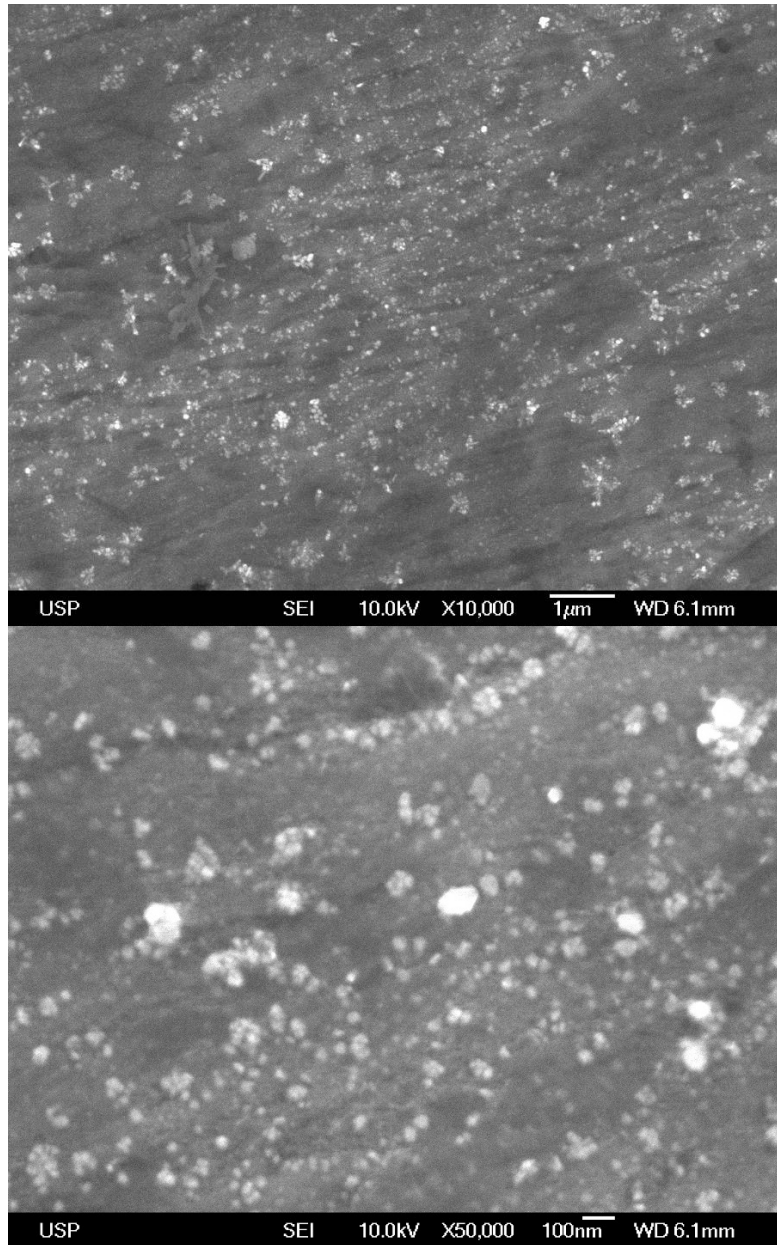


Figura A 12 - 90 °C, pH 7, aos 60 minutos de reação

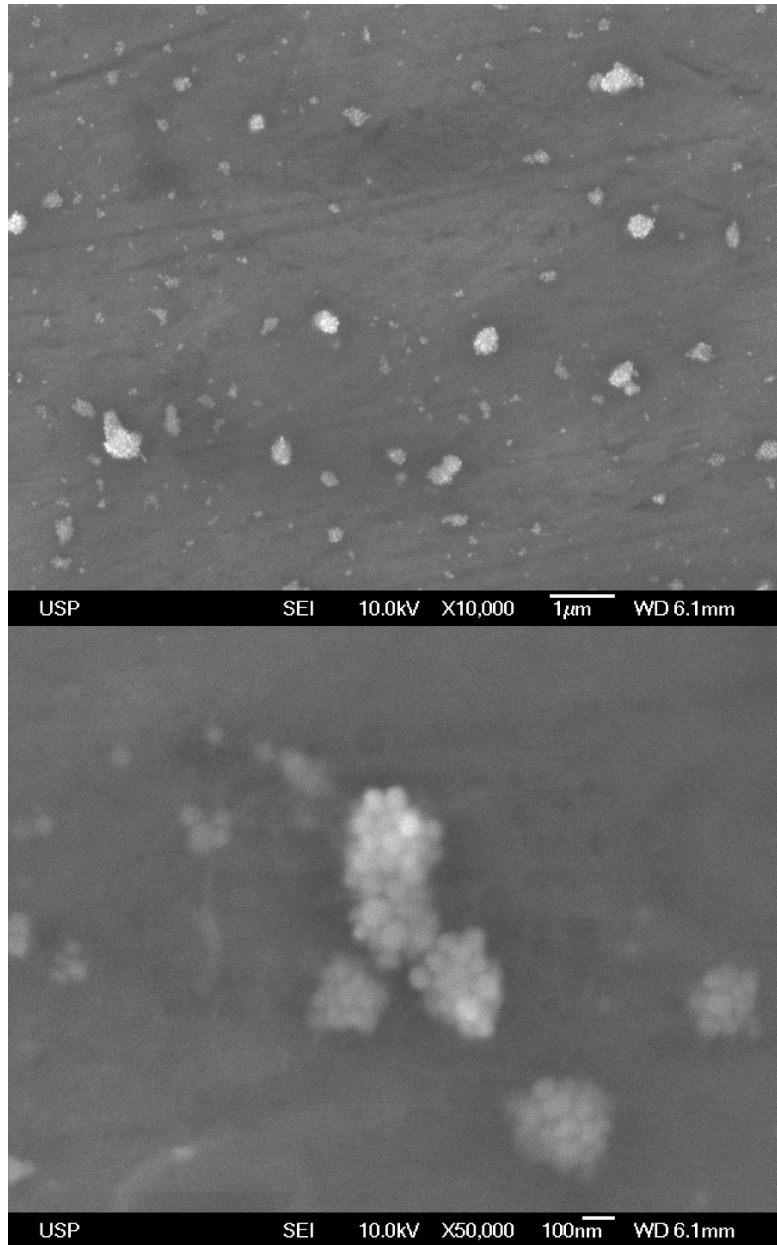


Figura A 13 - 90 °C, pH 7, aos 80 minutos de reação

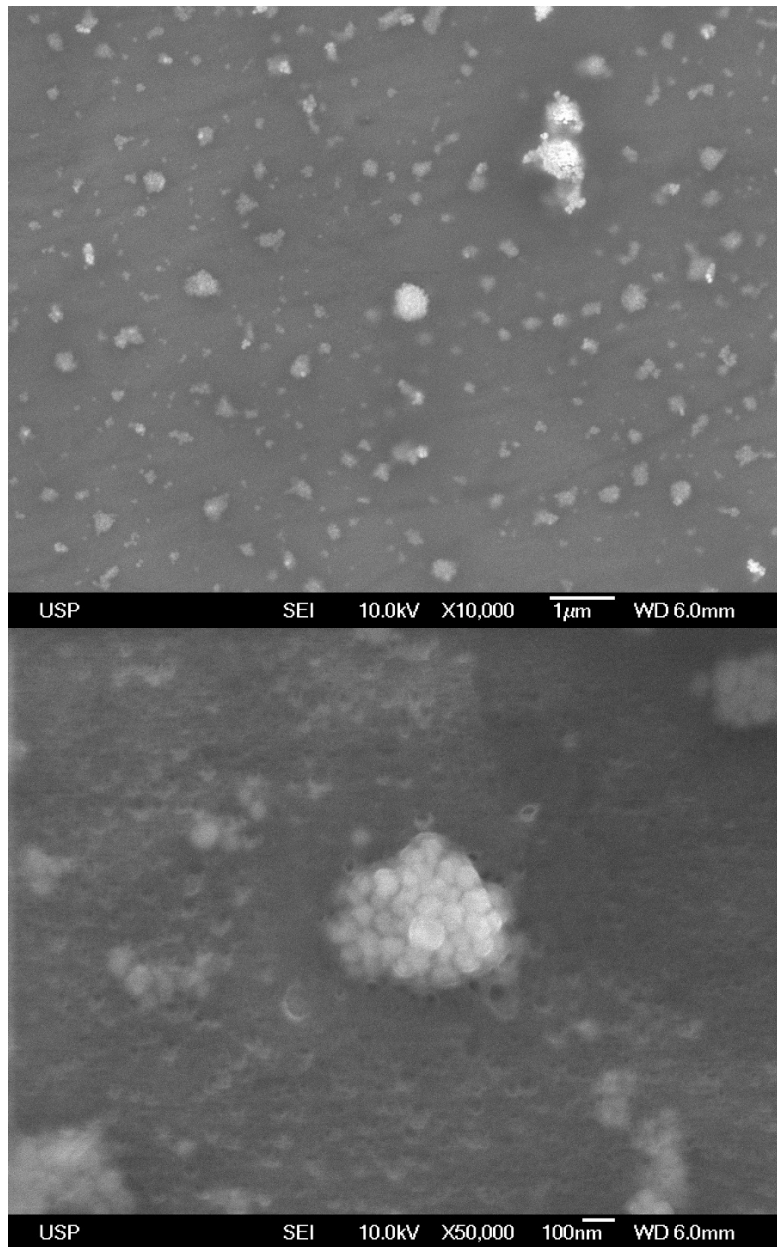


Figura A 14 - 90 °C, pH 7, aos 120 minutos de reação

95 °C, pH 7

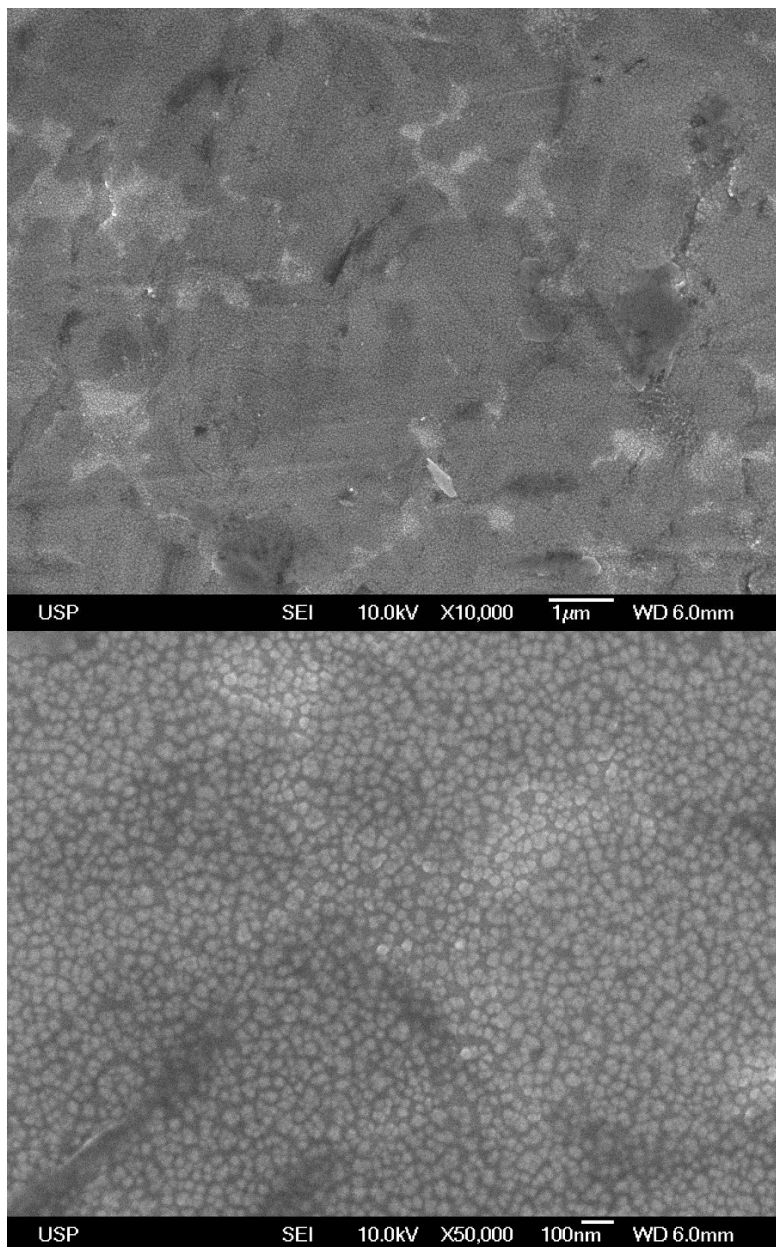


Figura A 15 - 95 °C, pH 7, aos 10 minutos de reação

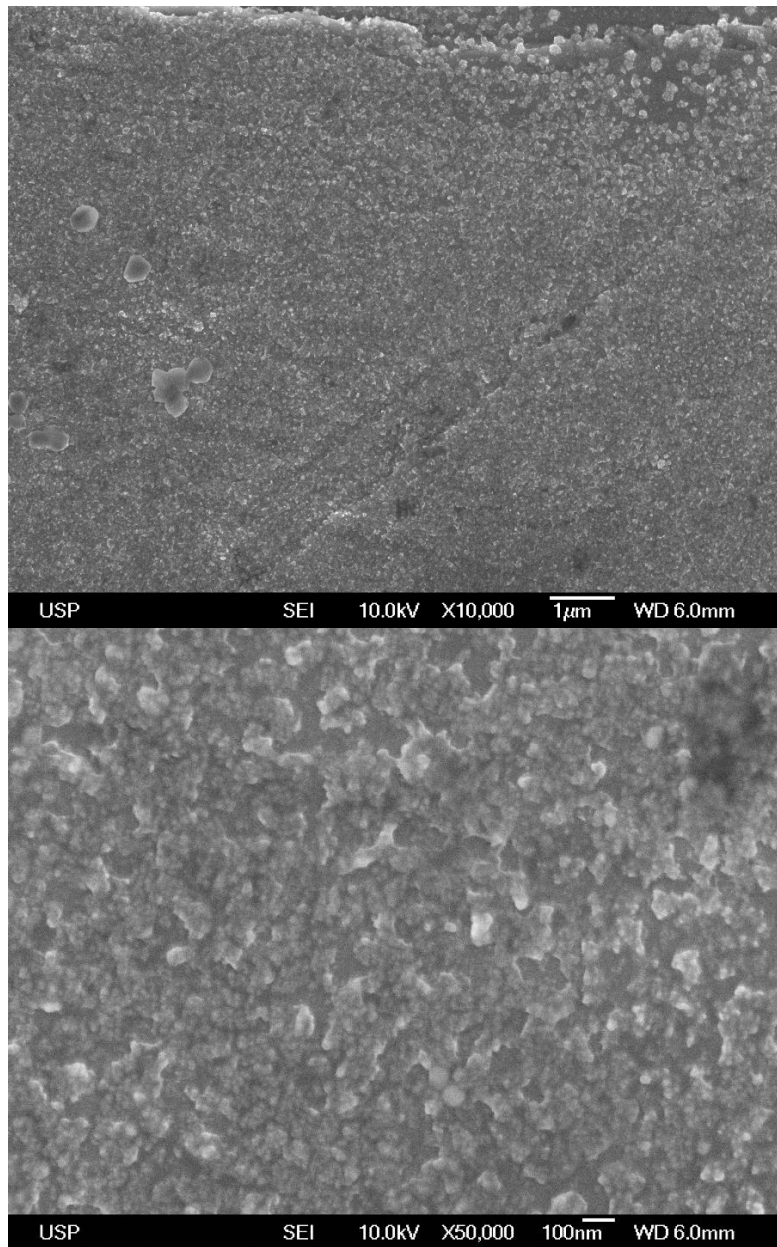


Figura A 16 - 95 °C, pH 7, aos 20 minutos de reação

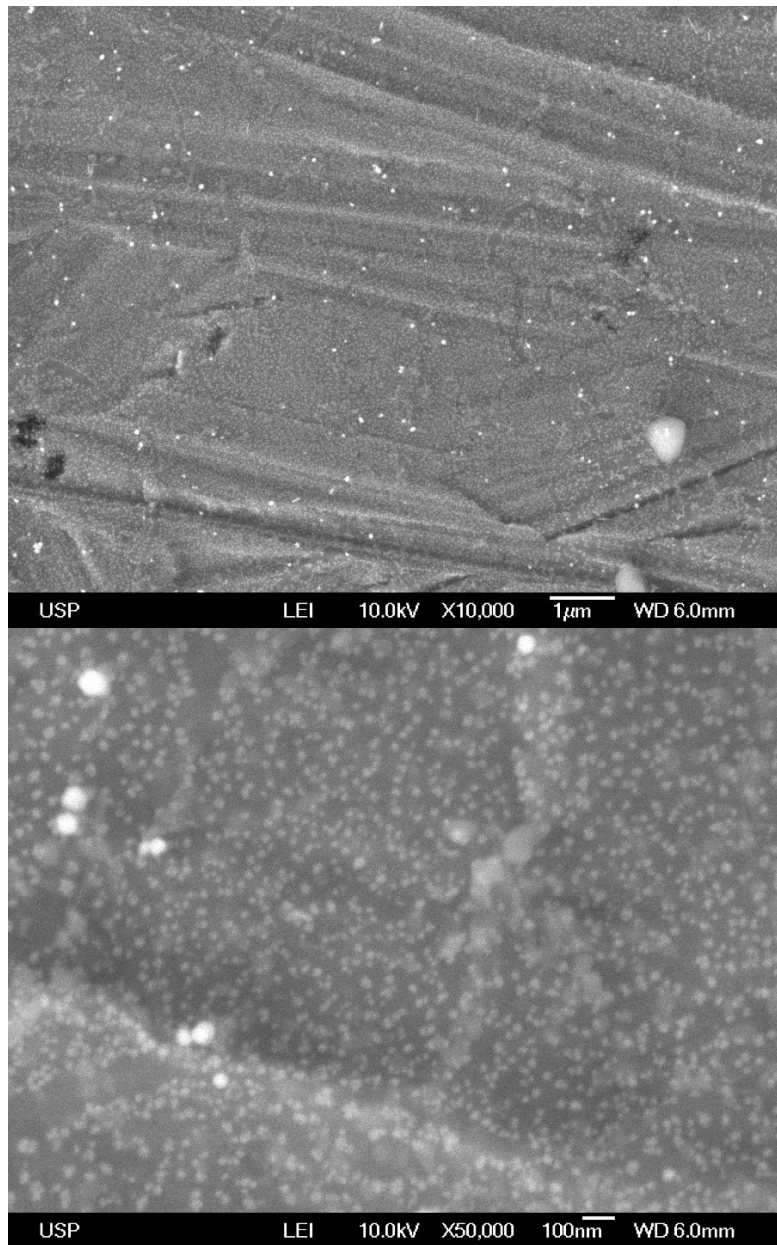


Figura A 17 - 95 °C, pH 7, aos 30 minutos de reação

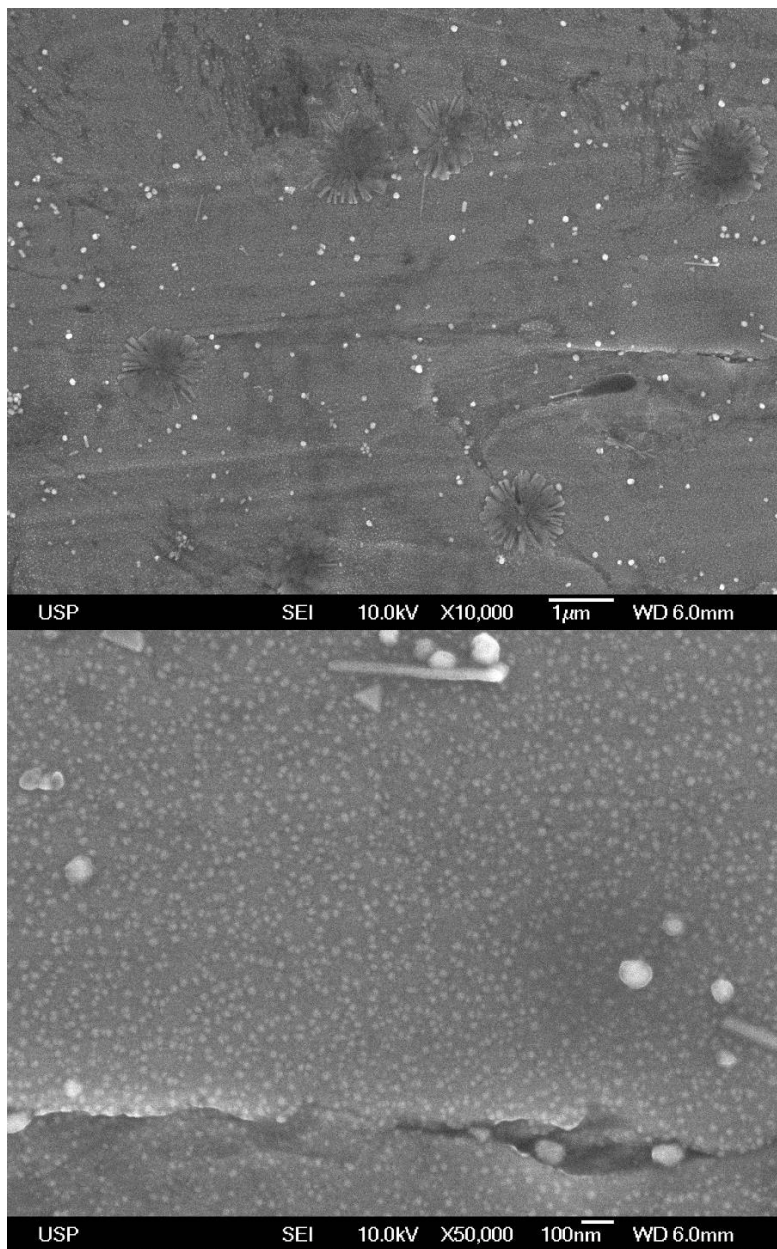


Figura A 18 - 95 °C, pH 7, aos 40 minutos de reação



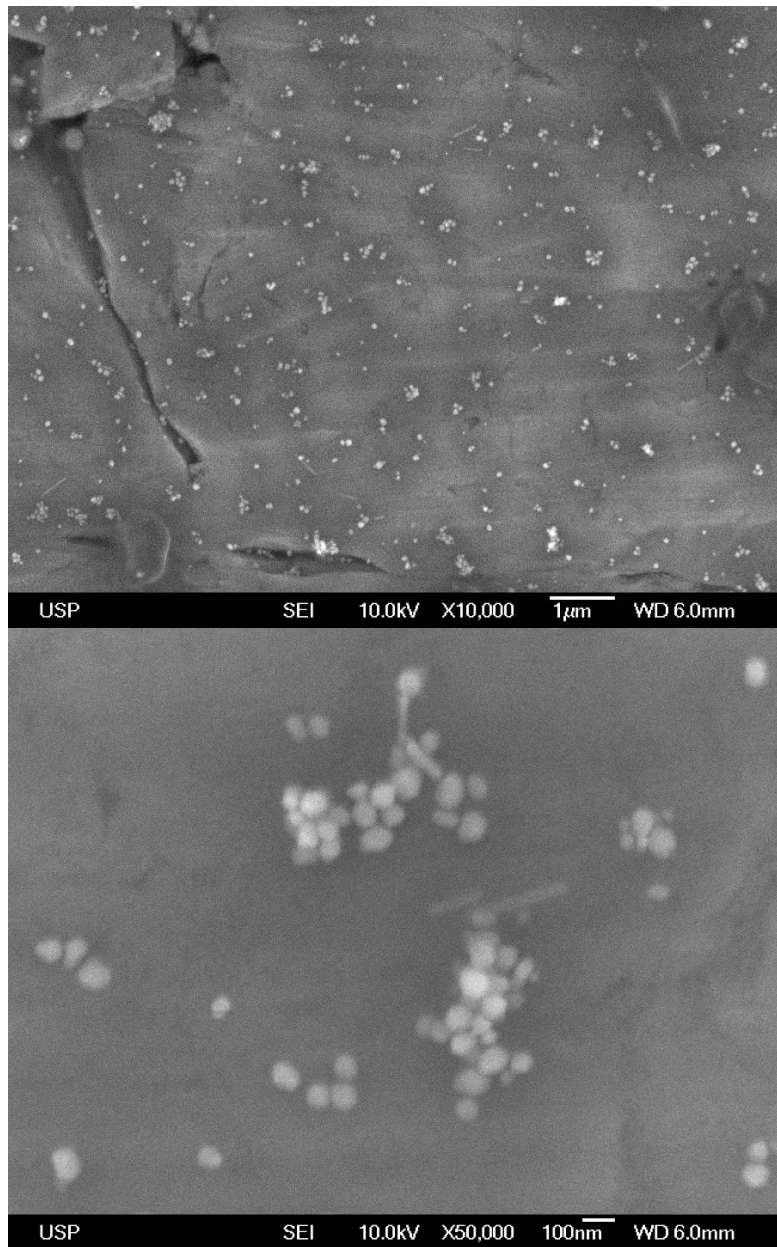


Figura A 19 - 95 °C, pH 7, aos 60 minutos de reação

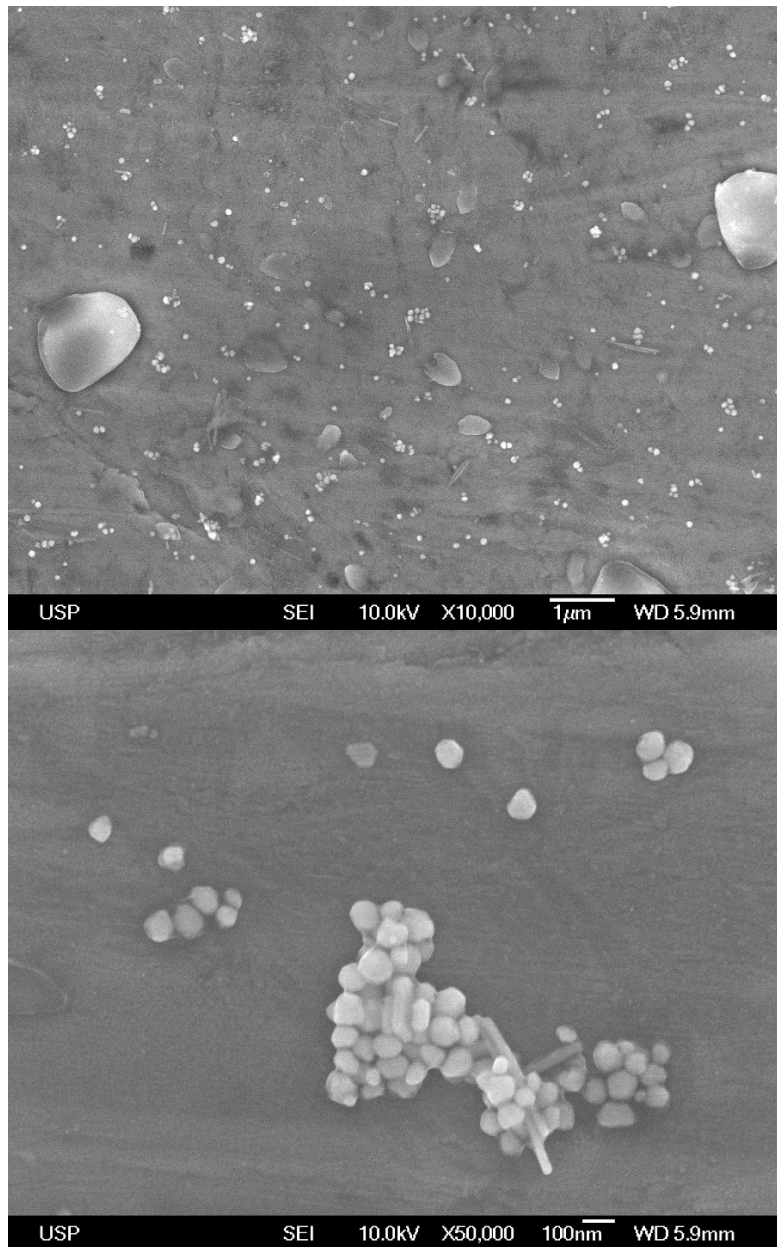


Figura A 20 - 95 °C, pH 7, aos 80 minutos de reação

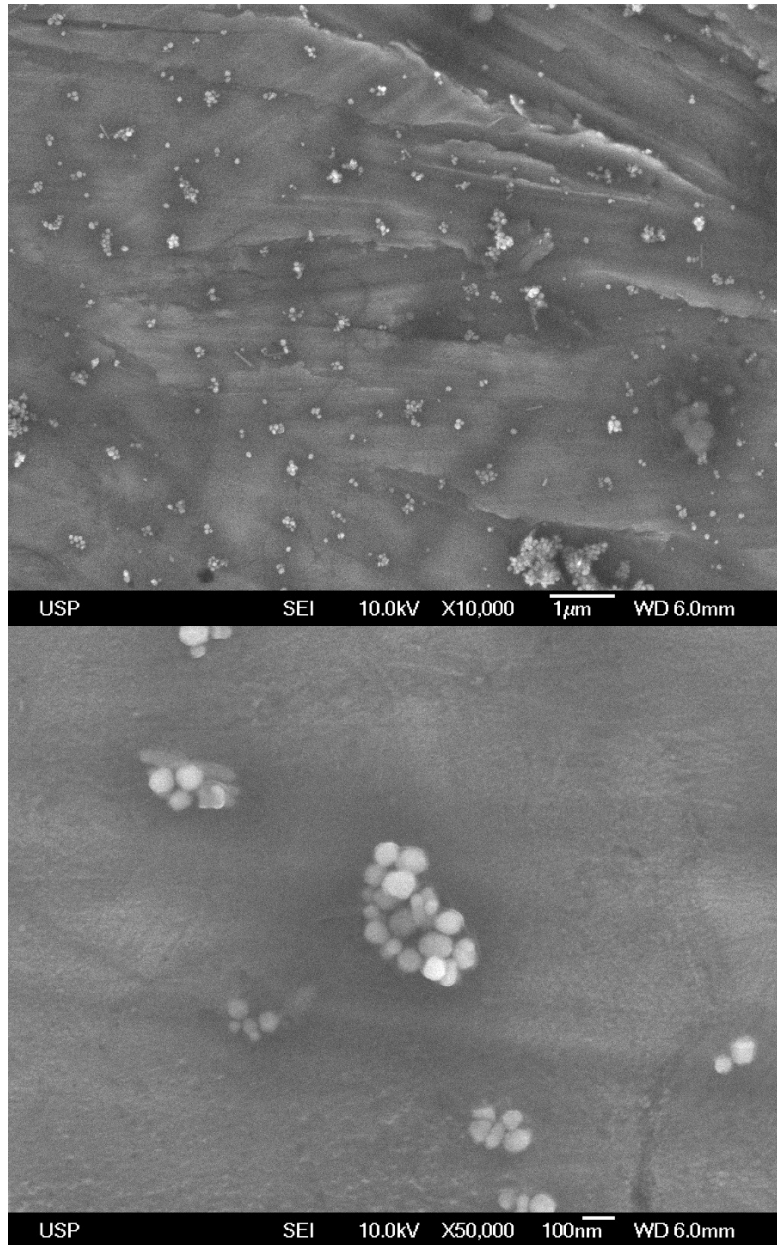


Figura A 21 - 95 °C, pH 7, aos 120 minutos de reação

85 °C, pH 8

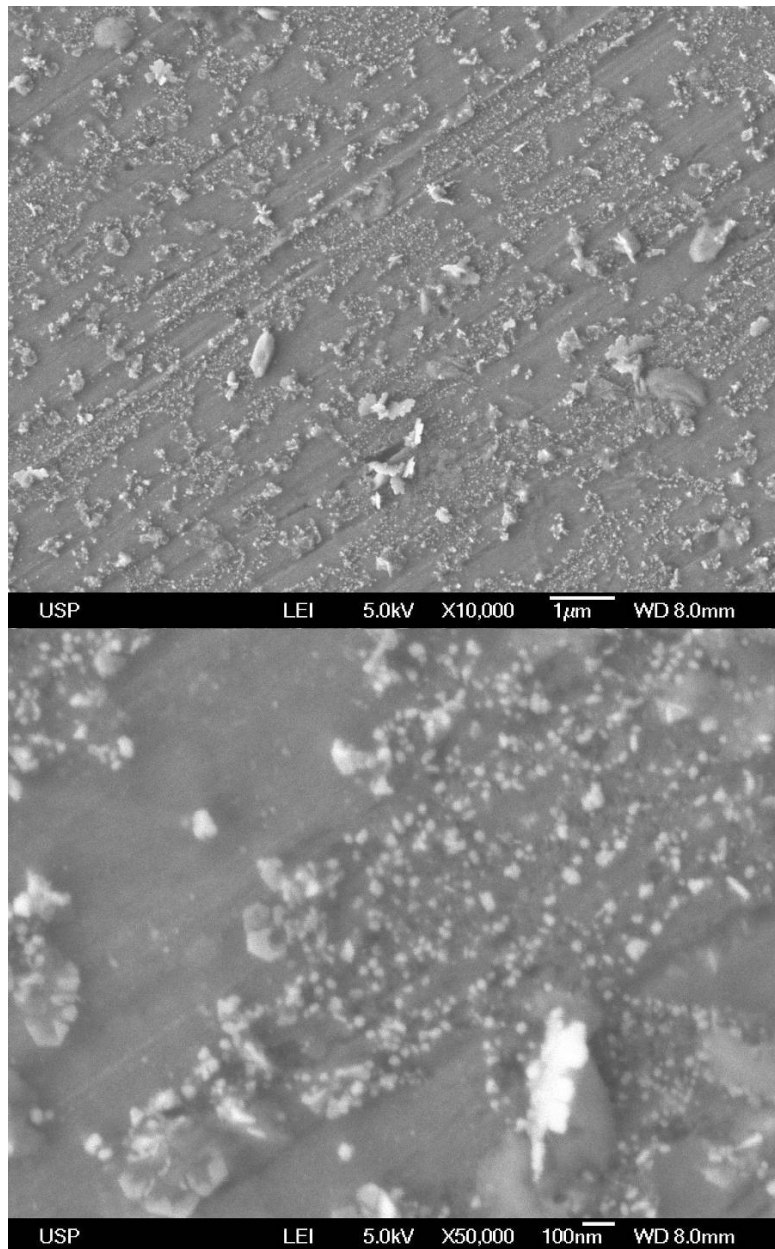


Figura A 22 - 85 °C, pH 8, aos 15 minutos de reação

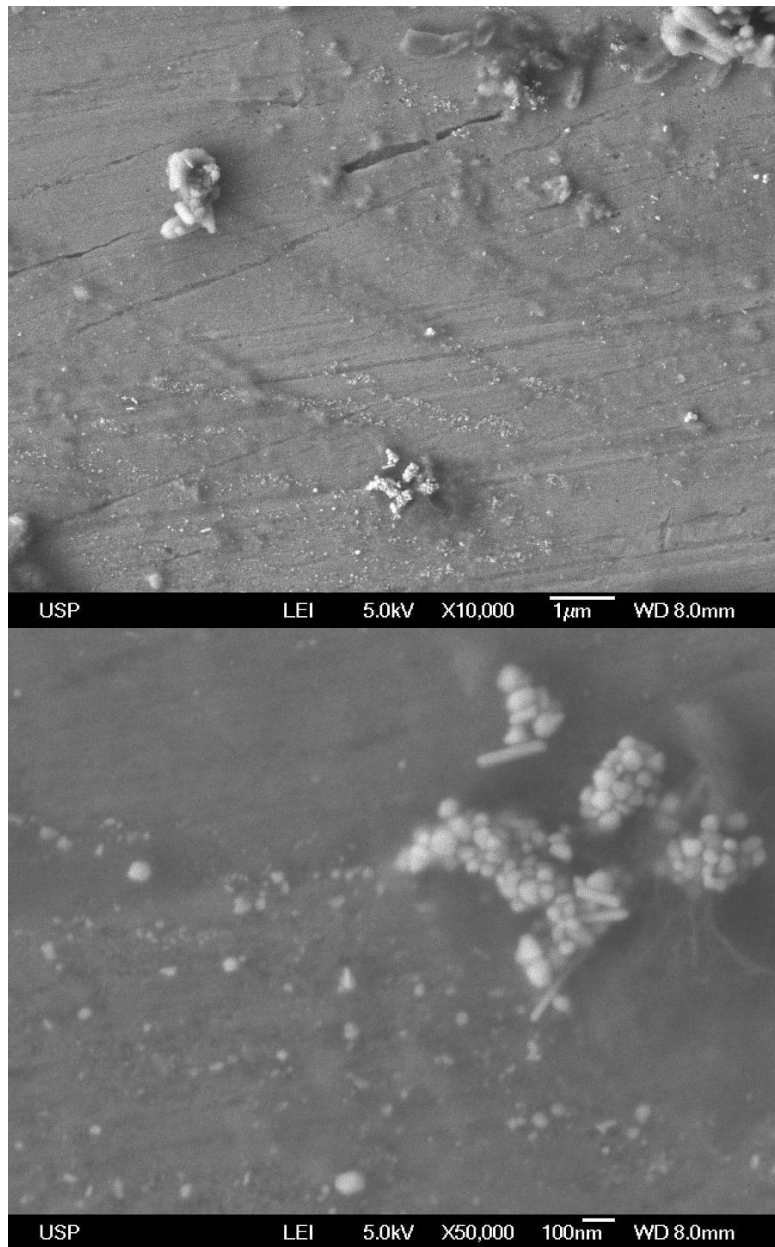


Figura A 23 - 85 °C, pH 8, aos 90 minutos de reação

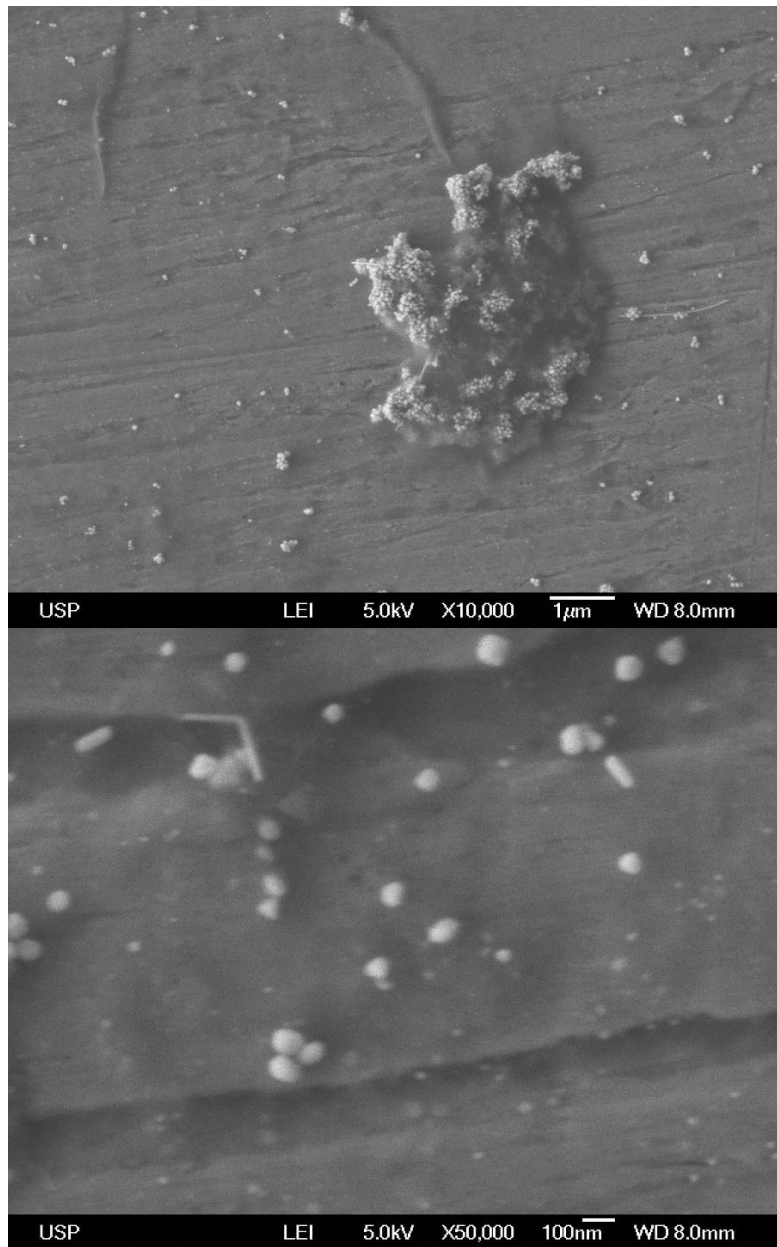


Figura A 24 - 85 °C, pH 8, aos 120 minutos de reação

85 °C, pH 9

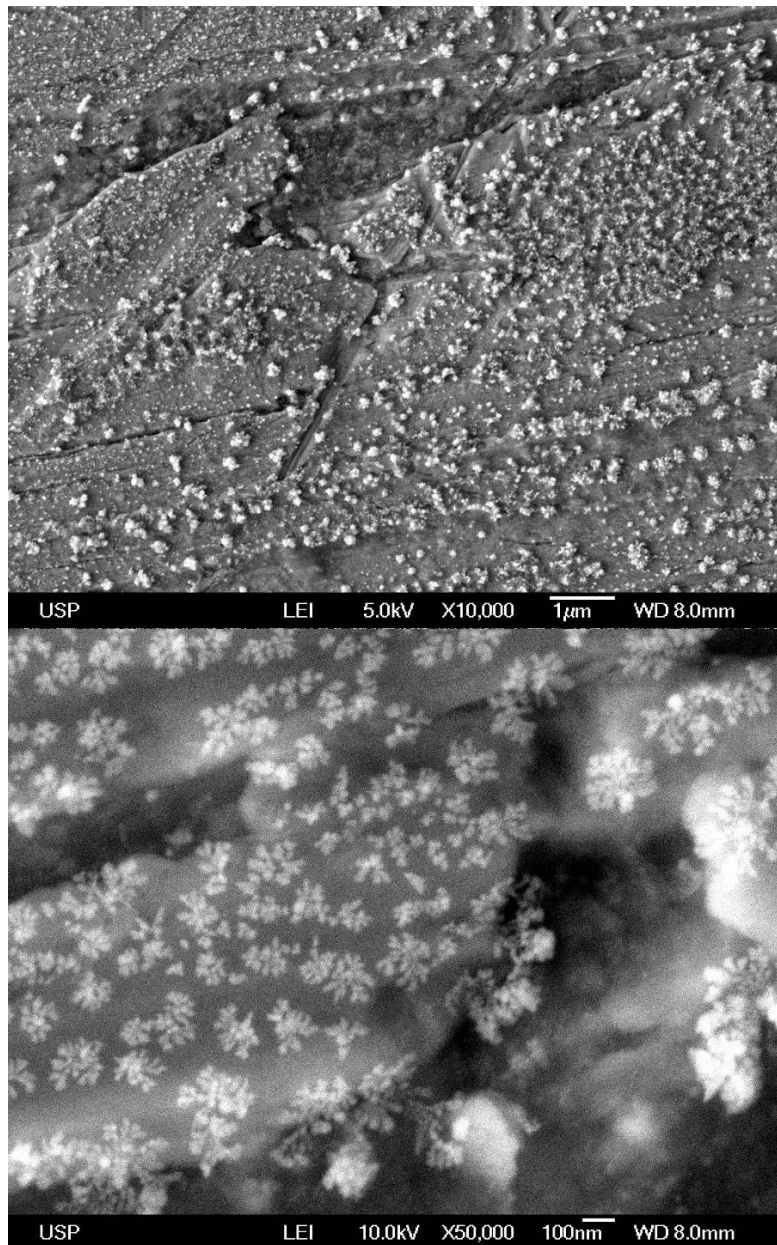


Figura A 25 - 85 °C, pH 9, aos 10 minutos de reação

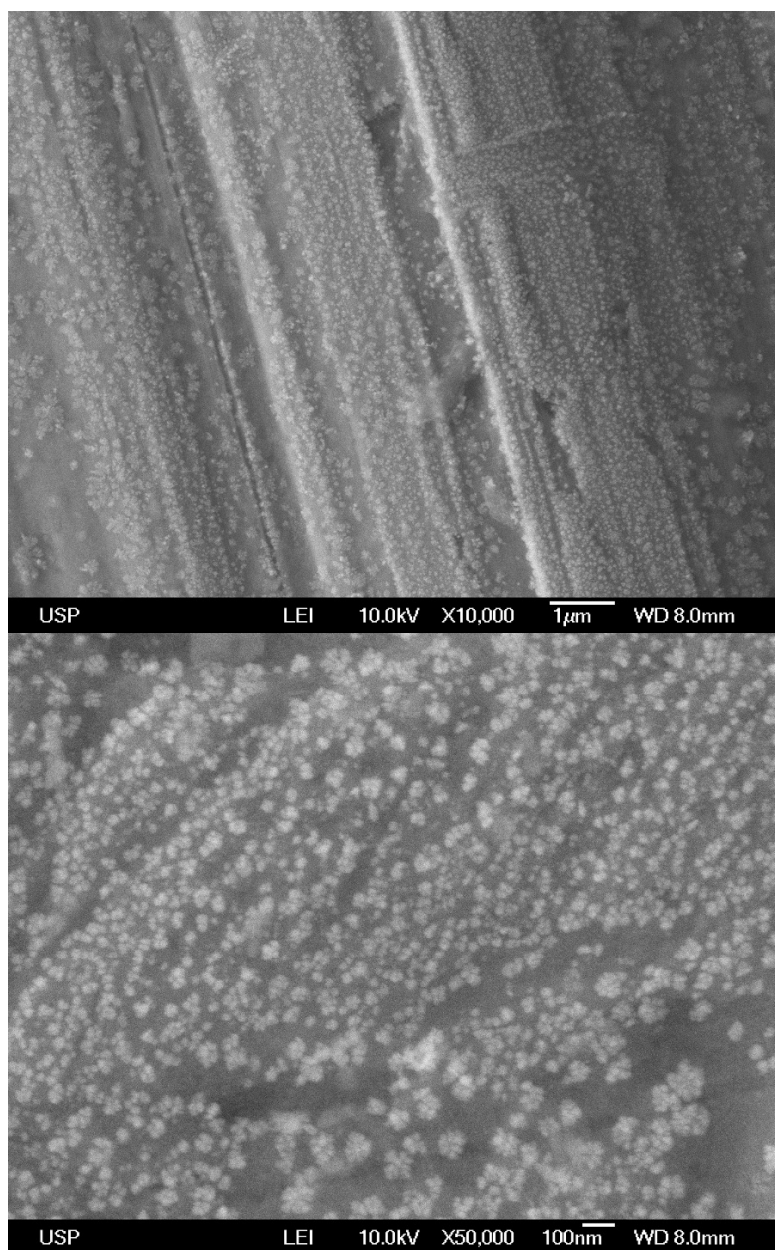


Figura A 26 - 85 °C, pH 9, aos 20 minutos de reação



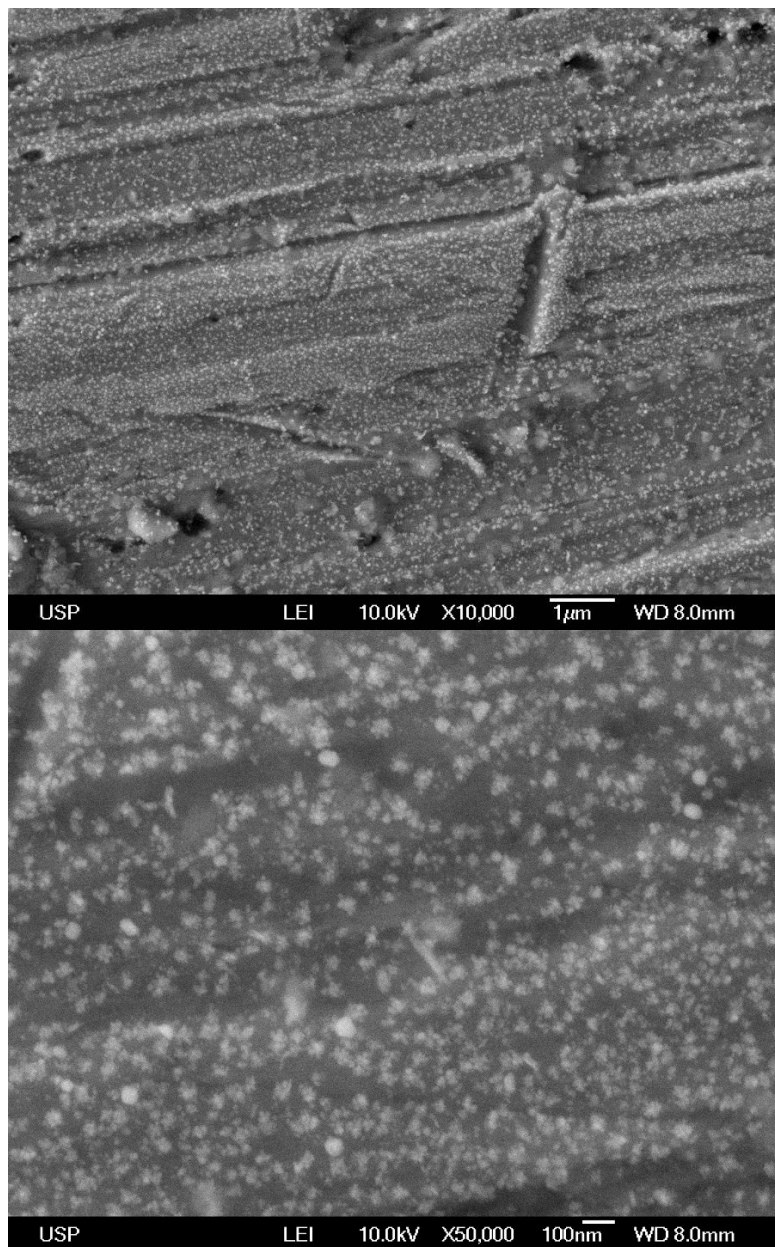


Figura A 27 - 85 °C, pH 9, aos 40 minutos de reação

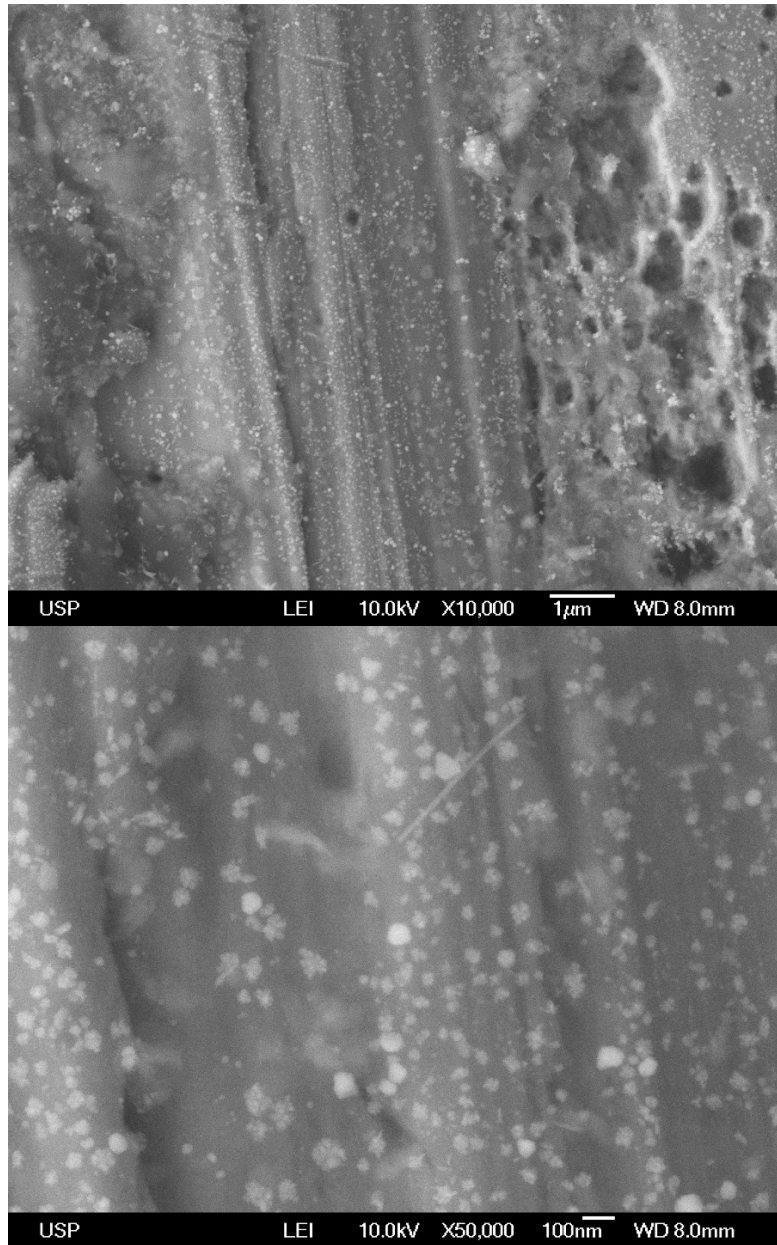


Figura A 28 - 85 °C, pH 9, aos 60 minutos de reação

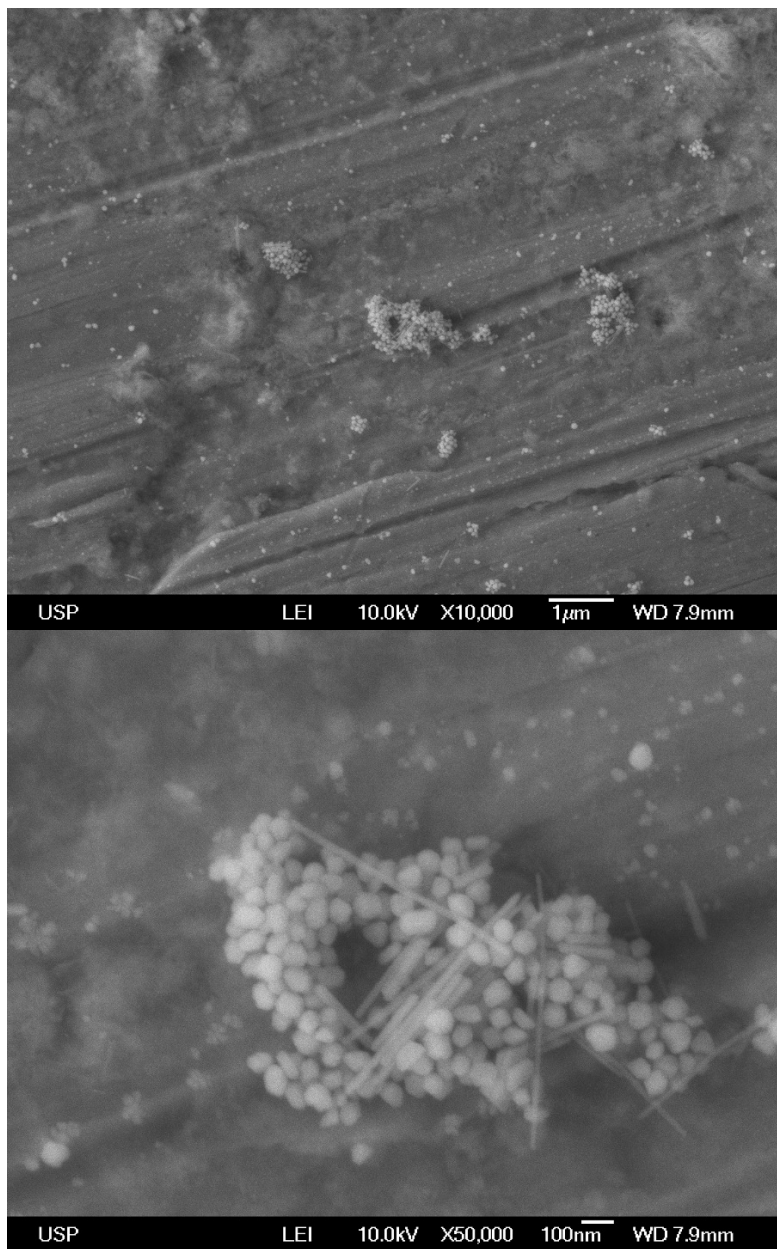


Figura A 29 - 85 °C, pH 9, aos 90 minutos de reação

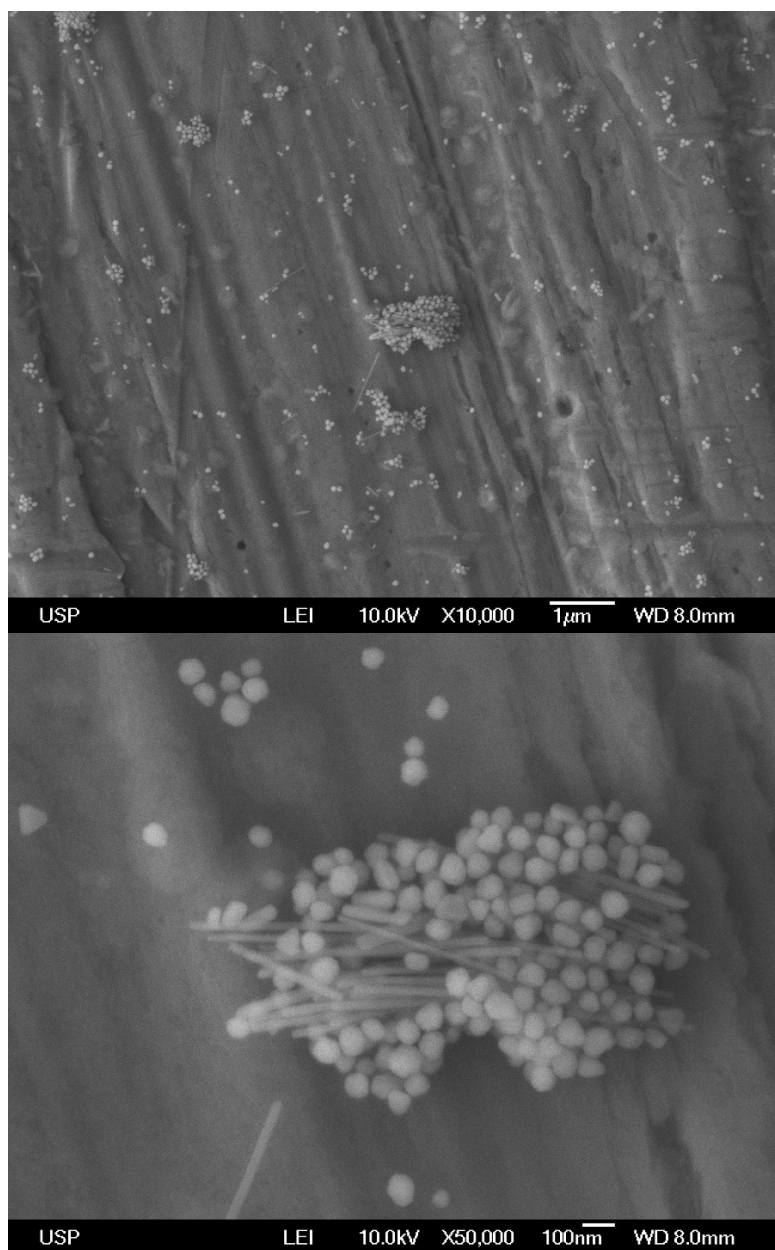


Figura A 30 - 85 °C, pH 9, aos 120 minutos de reação

95 °C, pH 9

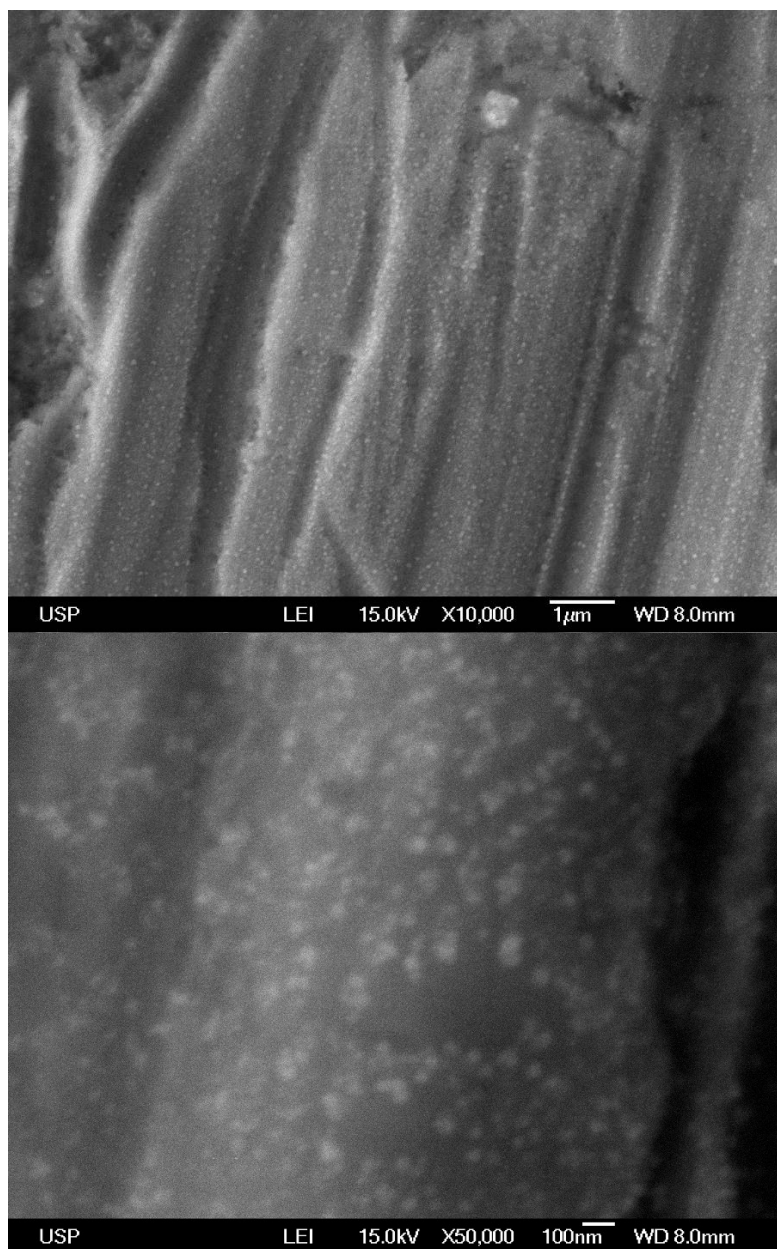


Figura A 31 - 95 °C, pH 9, aos 10 minutos de reação

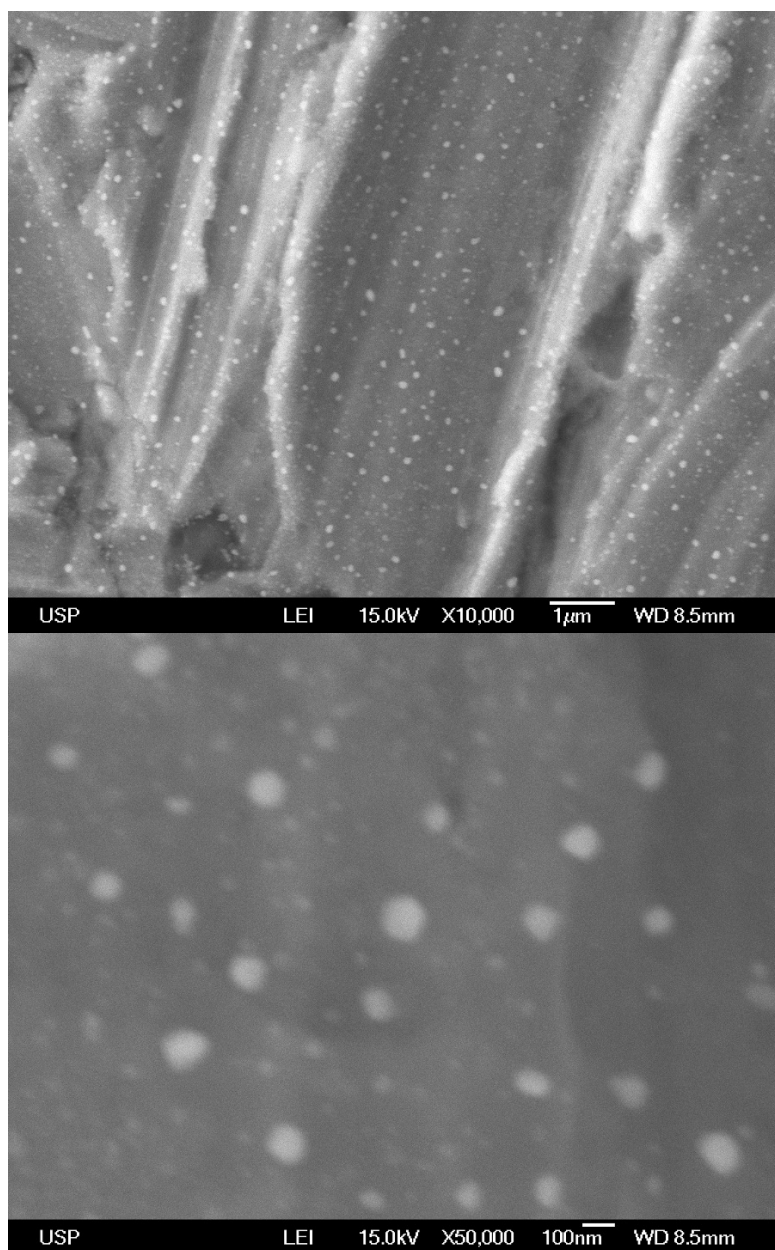


Figura A 32 - 95 °C, pH 9, aos 15 minutos de reação

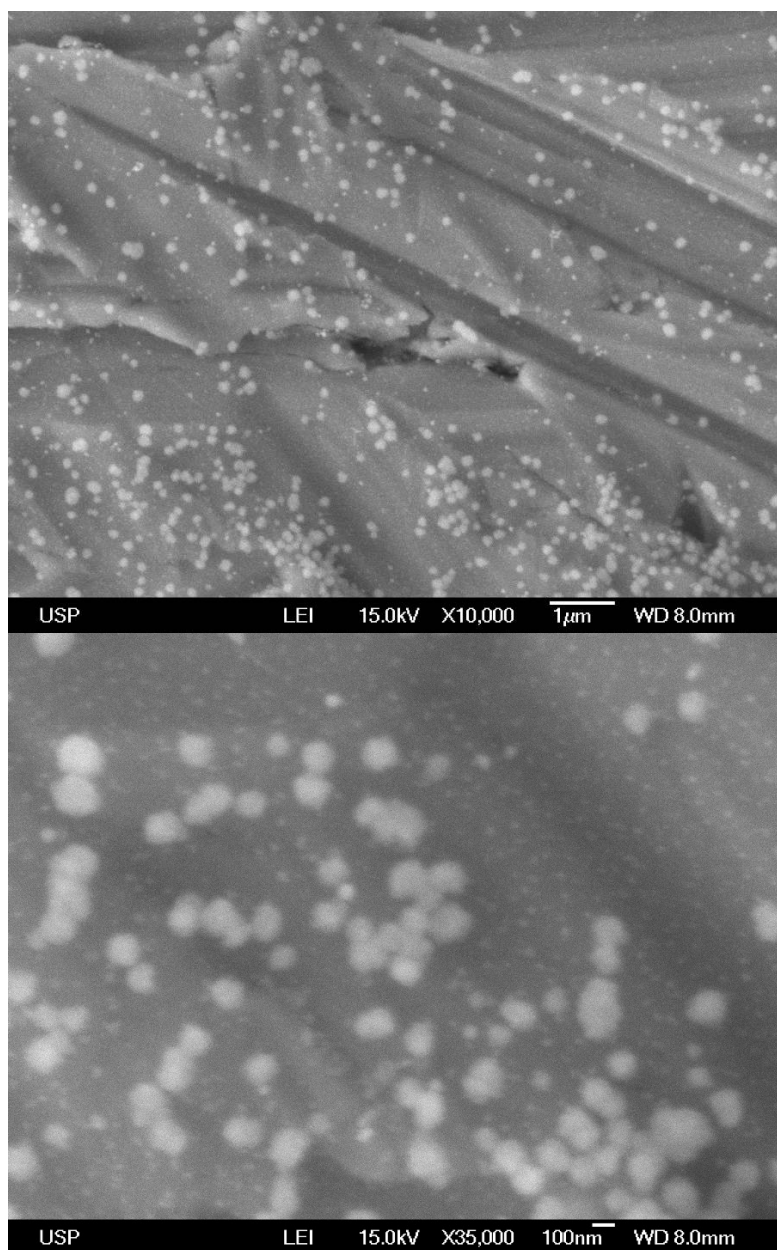


Figura A 33 - 95 °C, pH 9, aos 40 minutos de reação

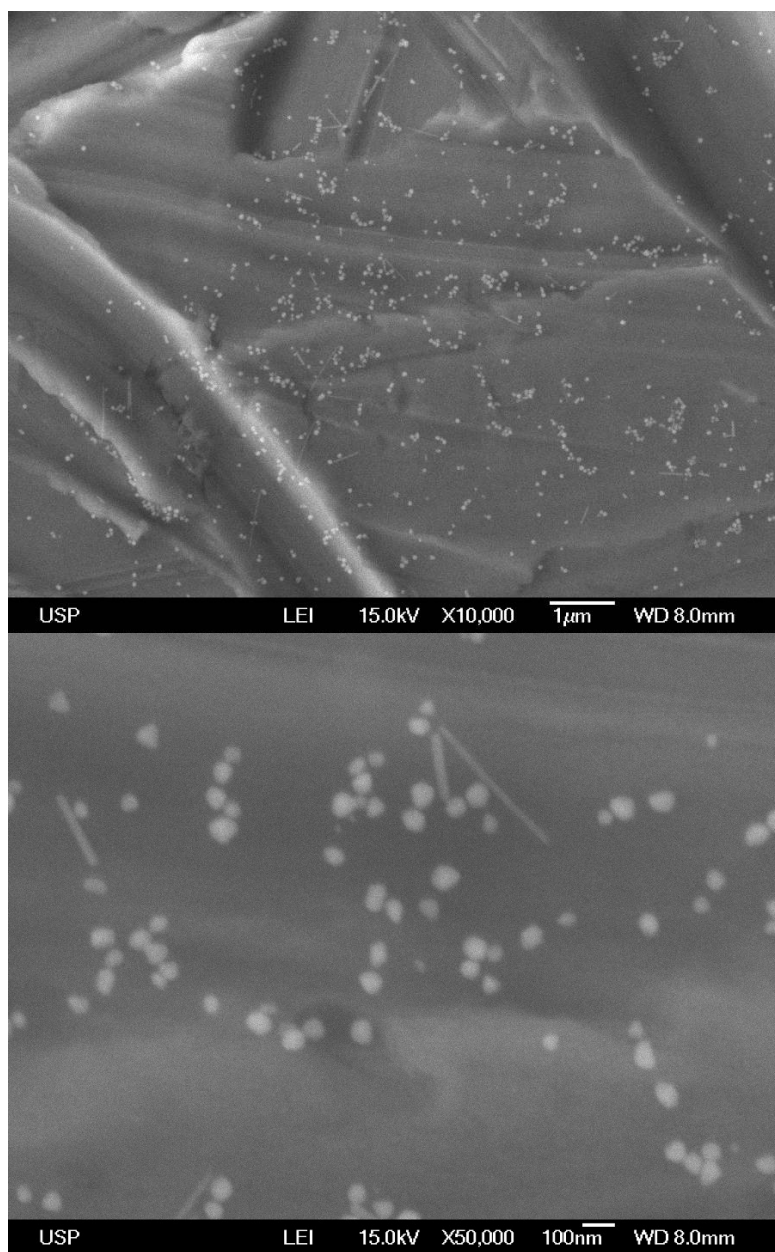


Figura A 34 - 95 °C, pH 9, aos 60 minutos de reação



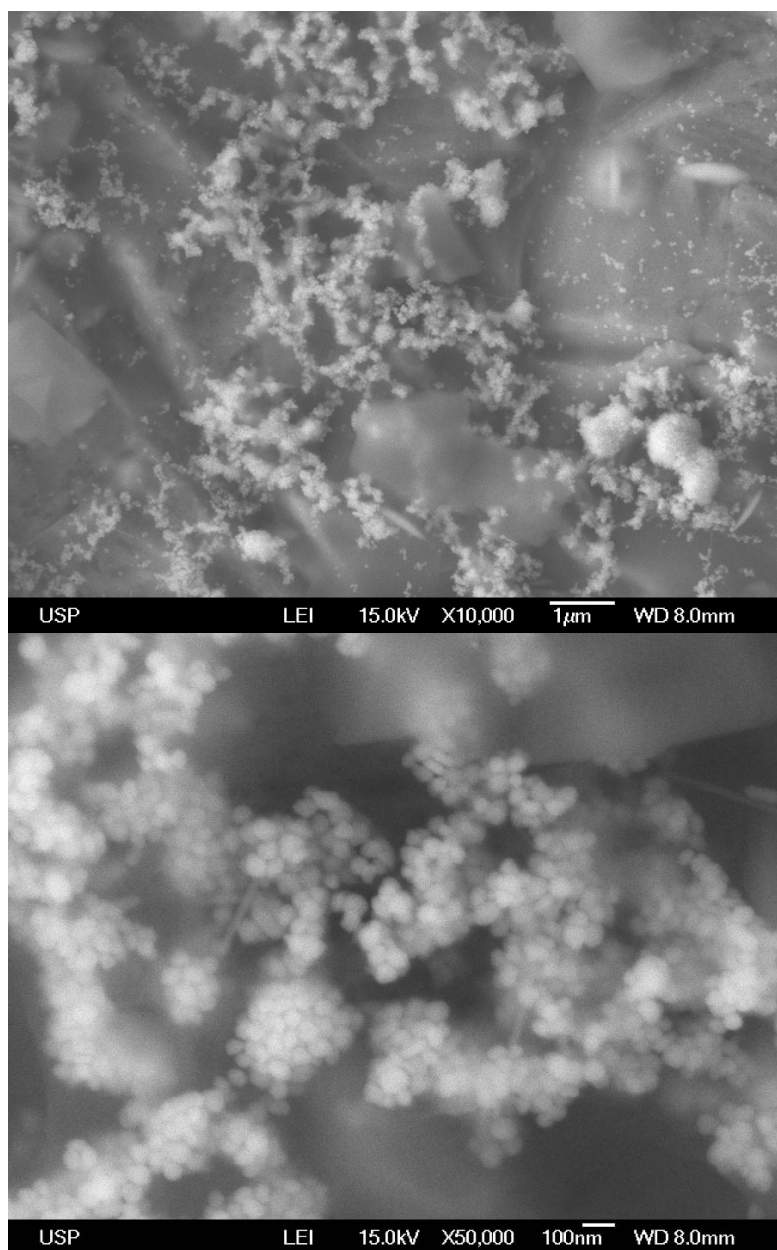


Figura A 35 - 95 °C, pH 9, aos 120 minutos de reação