**Mecanismos de Ação
de Nanopartículas de Prata no
Comportamento de Propriedades
Mecânicas Celulares**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

**Mecanismos de Ação de Nanopartículas de Prata no
Comportamento de Propriedades Mecânicas Celulares**

EDI CARLOS PEREIRA DE SOUSA

Orientador

Prof. Dr. Walter Maigon Pontuschka

Tese apresentada ao Instituto de Física
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Walter Maigon Pontuschka – Orientador (IFUSP)

Prof. Dr. Daniel Reinaldo Cornejo (IFUSP)

Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini (IFUSP)

Profa. Dra. Luciana Reyes Pires Kassab (FATEC/SP)

Profa. Dra. Zélia Maria da Costa Ludwig (UFJF)

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Sousa, Edi Carlos Pereira de

Mecanismos de ação de nanopartículas de prata no comportamento de propriedades mecânicas celulares. São Paulo, 2018.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física.
Depto. de Física Geral.

Orientador: Prof. Dr. Walter Maigon Pontuschka
Área de Concentração: Física da Matéria Condensada.

Unitermos: 1. Nanopartículas; 2. Citotoxicidade imunológica;
3. Microscopia de fluorescência; 4. Reologia; 5. Nanotecnologia.

USP/IF/SBI-049/2018

*Dedico à minha família,
especialmente aos meus pais e às minhas irmãs
por todo incentivo e apoio.*

Agradecimentos

São muitas as pessoas que contribuíram diretamente em algum momento para a realização deste trabalho, devido à sua natureza interdisciplinar e eu devo muito à todas elas, motivo pelo qual não posso deixar de agradecer. De maneira especial, agradeço:

Ao professor Dr. Walter Maigon Pontuschka pela orientação e pela amizade. Mesmo aposentado há mais de dez anos, não mediu esforços para aceitar ser meu orientador quando eu o procurei. Ele me deu liberdade para conduzir o trabalho da maneira que eu queria e me ajudou a explorar melhor os pontos fundamentais da pesquisa. Seu vasto conhecimento científico é prova de que este país possui físicos brilhantes.

À pesquisadora Dra. Patrícia Léo (IPT) pela supervisão e apoio nas atividades desenvolvidas no IPT e pela amizade. Seu empenho no entendimento do trabalho e sua orientação na minha inserção no mundo biológico foi de fundamental importância para conduzir essa pesquisa. Sou grato pelas conversas, discussões científicas e pela seriedade demonstrada em nossa parceria.

Ao professor Dr. Adriano Mesquita Alencar por ter aberto as portas do Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular para o desenvolvimento de parte da pesquisa, pelos direcionamentos científicos, pelas festas, pela amizade e atenção demonstrada pelo meu trabalho.

À minha mãe Maria da Conceição Sousa por sempre batalhar arduamente pela minha educação e ao meu pai Antonio Pereira de Sousa, que também sempre me incentivou a prosseguir. Igualmente agradeço às minhas irmãs Érica Pereira de Sousa e Edi Carla Pereira de Sousa pelo carinho em todos os momentos da minha vida. E também ao Élinton e ao Daniel Roberto.

Ao professor Dr. Pedro Henrique Cury Camargo (IQUSP) e ao Anderson Gabriel Marques da Silva pelo preparo e fornecimento de nanopartículas de prata de tamanho controlado.

Ao Jonny Francisco Ros de Almeida (IPEN) pelo fornecimento de nanopartículas de prata comercial que estudamos.

À professora Dra. Lígia Ferreira Gomes (FCFUSP) pelas conversas, pelos momentos de alegria e descontração e ao Diogo Soga pela amizade.

À professora Dra. Iolanda Midea Cuccovia (IQUSP) por nos permitir realizar as medidas de DLS e zeta potencial e ao professor Dr. Henrique Eisi Toma (IQUSP) pelos valiosos conselhos na escolha das nanopartículas.

Ao professor Dr. Fábio Furlan Ferreira (UFABC) e à Fanny Costa, pela ajuda na realização das medidas de difração de raios X.

À Simone Perché de Toledo pelo auxílio na preparação das amostras e ao Alfredo Duarte (IQUSP) pelo acompanhamento nas medidas de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao professor Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira e ao Paulo Abreu Furtado Garcia pelo auxílio na interpretação das medidas de DLS e pela realização das medidas de SAXS.

Ao professor Dr. Shiguo Watanabe e à Dra. Roseli Fernandes Gennari por nos permitir realizar as preciosas medidas de absorção óptica.

À professora Dra. Ana Regina Blak, pela amizade, pelo enorme carinho e por ter me ajudado com os estudos em CDTE, paralelos ao meu doutoramento.

À professora Dra. Maria de Lourdes Higuchi (InCor) e à bióloga Joyce Kawakami pela amizade e pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus amigos Mariana Sacrini Ayres Ferraz e Marcel Philippi Dorta, pela grande e valiosa amizade, por todo o apoio nos bons e nos maus momentos, pela solicitude, pelas conversas e boas gargalhadas e pelas discussões de cunho científico.

Aos meus amigos do LabM²: Mariana Menegon, Alexandre Barros, Juan Cervantes, Márcia Zotti, Caio Ramos, Adriana Valerio, Isis Vasconcelos, Diana Martinez, Antonio Bloise, Rodrigo Tosi, Vinicius Bassaneze, Myrian Rios e Jennifer Adriane pelo bom convívio.

Aos meus amigos do Instituto: Tárcius Nascimento Ramos, Rebeca Bayeh, Fábris Kossoski, Maria Fernanda Araújo de Resende, Jéssica Niide, João Luis Meloni Assirati, Stefano Ivo Finazzo, Julia Maria Giehl, pelo companheirismo, por toda ajuda e pelas alegrias.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia industrial (IPT): Renato Andrade, Elisangela Ferreira, Antonio Montemor, Claudia Anacleto, Rita de Cassia Paro Alli, Maria Filomena Andrade Rodrigues, Valter de Oliveira, Alfredo Maiorano, Elda Sabino, Débora Linhares pelo excelente convívio e pelo aprendizado.

Aos professores Dr. Nemitala Added, Dr. Sérgio Luiz Morelhão, Dr. Mikiya Muramatsu, Dr. Wayne Allan Seale, Dr. Cristiano Luis Oliveira, pela amizade e conhecimento compartilhado.

A todos os professores que contribuíram como bancas examinadoras em distintos momentos deste trabalho: Dra. Martha Simões Ribeiro (IPEN), Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira, Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini, Dr. Daniel Reinaldo Cornejo, Dra. Zélia Maria da Costa Ludwig e Dra. Luciana Reyes Pires Kassab, minha profunda gratidão.

Às secretárias: Maria de Fátima Juliano da Silva, Silvana Maria Ramos de Oliveira, Dirce Kimie Narimatu, Elza da Silva e ao José Valdir Spadacini por toda a atenção a mim dispensada, sempre que necessitei, durante todos esses anos. Obrigado por toda a convivência e amizade.

À Dra. Zehbour Panossian, ao Dr. Fernando Landgraf e ao Alex Vallone pela oportunidade de estabelecermos a parceria com o IPT, parceria esta que teve outros desdobramentos e trouxe novas oportunidades para o IFUSP, especialmente para o LabM².

A todos os amigos que acompanharam de perto esse doutoramento, que se preocuparam comigo e que estão na minha vida há muitos anos, em especial Midilane Medina, Marcelo Medina, Égon Futigami, João Bento, Paulo Rossi, Luiz Fernando Alvarez, Renan Moreira, Pedro Molina, Marcela Pires, Iná Albuquerque, Neli Maia, Elizabete Campanholo, Marcin Solski e Dejanira dos Santos meu especial agradecimento por terem aparecido no meu caminho.

Aos meus avós maternos: Francisco Bezerra de Sousa (*in memoriam*) e Francisca Olivia de Oliveira (*in memoriam*) que me ensinaram a beleza da simplicidade da vida.

Aos amigos e ex-professores que deixei na FEIS–Unesp, que fizeram e fazem parte da minha vida: Lincon Zadorosny, Alex Sanches, Rafael Zadorosny, Francine Bettio, Natalia Novo, Fabricia Lunas, Reinaldo Massayuki, Fernanda Garcia, Renata Trasse, Neli Ribeiro, Paulo Homem, Aparecida Paz, Lena Araújo, Keizo Yukimitu, Fernando Dessoti, Robyson Machado, Antonio Seridonio, José Malmonge, Washington Carvalho, Lizete Orquiza, Fernanda Bozelli, Adriana Bortoletto, Éder Pires, Vitor Solano, João Carlos Silos, Eudes Borges, Devaney Ribeiro, Ezequiel Costa, Edinilton Cavalcante, Haroldo Nagashima, Francisco Villarreal e Edison Righetto.

À FIPT por financiar integralmente a pesquisa de doutoramento e à FAPESP e ao CNPq por fomentar os projetos do LabM².

A Deus por permitir mais este momento importante e extremamente valioso na minha carreira e na minha vida e pelo meu crescimento físico–mental–espiritual ao longo de todos esses anos.

AUTOBIOGRAFIA EM CINCO CAPÍTULOS

*1. Ando pela rua.
Há um buraco fundo na calçada.
Eu caio...
Estou perdido... sem esperança.
Não é culpa minha.
Leva uma eternidade para encontrar a saída.*

*2. Ando pela mesma rua.
Há um buraco fundo na calçada.
Mas finjo não vê-lo.
Caio nele de novo.
Não posso acreditar que estou no mesmo lugar.
Não é culpa minha?
Leva um tempão para sair.*

*3. Ando pela mesma rua.
Há um buraco fundo na calçada.
Vejo que ele ali está.
Ainda assim caio...
é um hábito...
Meus olhos enfim se abrem!
Sei onde estou.
É minha culpa!
Saio imediatamente.*

*4. Ando pela mesma rua.
Há um buraco fundo na calçada.
Dou a volta.*

5. Ando por outra rua.

[Adaptado do livro “O Livro Tibetano do Viver e do Morrer”.]

RESUMO

Neste trabalho estudamos a interação de dois tipos de nanopartículas de prata metálica, obtidas pelo processo de poliol (IQ-USP) e pelo método eletrolítico (Khemia[®]), em células de músculo liso. Um extenso trabalho de caracterização foi realizado, descrevendo a natureza físico-química dessas nanopartículas. Medidas de absorção óptica mostraram que as nanopartículas exibem bandas suaves em torno de 400 nm, região do azul do espectro eletromagnético, devido à ressonância dos plasmons de superfície, evidenciando a tendência à agregação com o tempo. Microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para obter as imagens das nanopartículas em micrografias. Histogramas foram construídos para determinar o tamanho das NPs e o índice de polidispersividade. Espectros de EDS foram obtidos para a caracterização química das amostras. Difrátogramas de raios X foram obtidos para as AgNPs. Os picos de difração foram indexados e revelaram uma única fase cristalina da prata, com estrutura cúbica e estado de oxidação, Ag⁰. Com o auxílio desses difratogramas, foram calculados o parâmetro de rede e a distância interplanar dos planos de difração. Utilizando a equação de Scherrer e um ajuste gaussiano dos picos de Ag mostrados nos difratogramas de raios X, foi possível obter o tamanho do cristalito para nanopartículas IQ-USP. Experimentos de DLS mostraram distribuição de número monomodal para AgNPs Khemia[®] e, para AgNPs IQ-USP lavadas, distribuição bimodal, estimando-se a distribuição de número e tamanho. Os resultados mostraram que a distribuição dominante é sempre para raios menores, sugerindo partículas menores que se agregam com o tempo e formam maiores dimensões. Resultados de SAXS mostraram que as amostras fornecem boa intensidade de espalhamento. Utilizando modelos teóricos foram calculados o raio médio da distribuição, polidispersividade e raio de giro. Os dados revelaram que as nanopartículas IQ-USP possuem um raio maior que as AgNPs Khemia[®] e não apresentaram agregação. Em contrapartida, AgNPs Khemia[®] apresentaram maior agregação, com polidispersividade relativa de 72%. Para AgNPs IQ-USP, análises de SAXS forneceram tamanho de partícula comparável a TEM e bastante diferente de DLS. As medidas de SAXS para AgNPs Khemia[®] mostram diferenças com as medidas de TEM e DLS. Ficou evidente o efeito da agregação, que tem influências desde o preparo das amostras até o tempo de realização das medidas. Testes de citotoxicidade e estudos de análise morfológica por microscopia de fluorescência evidenciaram as características citotóxicas de cada nanopartícula. Os resultados apresentados pela análise morfológica realizada com microscopia de fluorescência concordam com os testes de citotoxicidade. AgNPs IQ-USP mostraram alta toxicidade até a concentração 9.37 µg/ml, onde as células são apresentadas com fragmentação nuclear. Em concentrações mais baixas, as AgNPs IQ-USP exibiram características morfológicas comparáveis ao grupo controle. Por sua vez, AgNPs Khemia[®] mostram alta toxicidade até a concentração 1.37 µg/ml, com índice IC₅₀ variando na faixa de 1.3 a 6.7 µg/ml. Foi possível observar que concentrações mais altas induzem à fragmentação nuclear, desencadeando processos como apoptose e necrose. Experimentos utilizando a técnica de OMTC demonstraram que as diferentes concentrações de nanopartículas de prata podem modificar a rigidez celular. Isto é evidenciado quando comparamos o grupo controle com os demais grupos, com as diferentes concentrações de NPs. Para concentrações mais altas de nanopartículas, verificou-se um aumento da viscoelasticidade. Os dois tipos de nanopartículas estudadas apresentaram mudanças nas propriedades mecânicas, mas as AgNPs Khemia[®] apresentaram um maior aumento na viscoelasticidade nas diferentes concentrações. Essa mudança na viscoelasticidade foi explicada como sendo devido à maior disponibilidade do cálcio, liberado por células apoptóticas, o qual é utilizado no complexo miosina-actina para gerar contração muscular.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, caracterização, citotoxicidade, microscopia de fluorescência, mecânica celular, viscoelasticidade.

ABSTRACT

In this work we study the interaction of two types of metallic silver nanoparticles, obtained by the polyol process (IQ-USP) and the electrolytic method (Khemia[®]), in smooth muscle cells. An extensive characterization work was carried out, describing the physico-chemical nature of these nanoparticles. Optical absorption measurements showed that nanoparticles exhibit smooth bands around 400 nm, the blue region of the electromagnetic spectrum, due to the resonance of the surface plasmons, evidencing the tendency to aggregate with time. Transmission electron microscopy was performed to obtain images of the nanoparticles in micrographs. Histograms were constructed to determine the size of NPs and the index of polydispersity. EDS spectra were obtained for the chemical characterization of the samples. X-ray diffraction patterns were obtained for the AgNPs. The diffraction peaks have been indexed and showed a single crystal layer of silver, with cubic structure and oxidation state, Ag⁰. By means of these diffractograms, the network parameter and the interplanar distance of the diffraction planes were calculated. Using the Scherrer equation and a Gaussian fit of the Ag peaks shown in the X-ray diffractograms, it was possible to obtain the crystallite size for IQ-USP nanoparticles. DLS experiments showed monomodal number distribution for Khemia[®] AgNPs and, for washed IQ-USP AgNPs, bimodal distribution, estimating the number and size distribution. The results showed that the dominant distribution is always for smaller rays, suggesting smaller particles that aggregate with time and form larger dimensions. SAXS results showed that the samples provide good scattering intensity. Using the theoretical models, the average radius of the distribution, polydispersity and radius of gyration were calculated. The data revealed that the IQ-USP nanoparticles have a larger radius than the Khemia[®] and did not show aggregation. In contrast, Khemia[®] AgNPs showed higher aggregation, with 72% relative polydispersity. For IQ-USP AgNPs, SAXS analyzes provided particle size comparable to TEM and quite different from DLS. SAXS measurements for Khemia[®] AgNPs show differences with TEM and DLS measurements. It was evident the effect of the aggregation that has influences from the sample preparation until the time of performing the measurements. Cytotoxicity tests and morphological analysis studies by fluorescence microscopy evidenced the cytotoxic characteristics of each nanoparticle. The results presented by the morphological analysis performed with fluorescence microscopy agree with the cytotoxicity tests. IQ-USP nanoparticles showed high toxicity up to the concentration of 9.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$, where the cells are presented with nuclear fragmentation. At lower concentrations, the IQ-USP AgNPs exhibited morphological characteristics comparable to the control group. In addition, Khemia[®] AgNPs show high toxicity up to the concentration of 1.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with IC₅₀ in the range of 1.3 to 6.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It was possible to observe that higher concentrations induce nuclear fragmentation, triggering processes such as apoptosis and necrosis. Experiments using the OMTC technique demonstrated that different concentrations of silver nanoparticles can modify cell stiffness. This is evidenced when we compare the control group with the other groups, with the different concentrations of NPs. For higher concentrations of nanoparticles, there was an increase in viscoelasticity. The two types of nanoparticles studied showed changes in mechanical properties, but Khemia[®] AgNPs showed a greater increase in viscoelasticity at different concentrations. This change in viscoelasticity was explained to be due to the increased availability of calcium, released by apoptotic cells, which is used in the myosin-actin complex to generate muscle contraction.

Keywords: silver nanoparticles, characterization, cytotoxicity, fluorescence microscopy, cell mechanics, viscoelasticity.

LISTA DE FIGURAS

2.1	Escala de comprimento mostrando o nanômetro em contexto.	36
2.2	Representação esquemática do processo de produção de nanopartículas de prata de tamanho controlado, sintetizadas utilizando borohidreto de sódio e citrato de sódio como agentes redutores.	39
2.3	Nanopartículas de prata produzidas com diferentes formas pelo processo de poliol.	41
2.4	Ressonância de plasmon de superfície localizada (RPSL) para bandas de AgNPs, AuNPs e CuNPs.	44
2.5	Coloide de prata exibindo diferentes tons de amarelo.	45
2.6	Padrões de amplitude do campo elétrico para nanopartículas de diferentes formas.	47
2.7	Esquema mostrando os níveis de energia eletrônica em metais.	48
2.8	Espectro de cor exibido por <i>quantum dots</i> coloidal.	49
2.9	Máquinas automatizadas de produção de nanopartículas Khemia®.	51
2.10	Nanopartículas de prata.	51
2.11	Esquema de funcionamento do espectrofotômetro de absorção óptica.	52
2.12	Espectro de absorção óptica.	53
2.13	Microscópio utilizado na obtenção de micrografias com EDS acoplado.	55
2.14	Difratômetro de raios X por policristais.	57
2.15	Esquema representativo da camada de Stern	58
2.16	Analizador de tamanho de partículas Zetasizer Nano S, da Malvern Instruments.	61
2.17	Equipamento usado na realização dos experimentos de SAXS	62
2.18	Espectros de absorção óptica das AgNPs.	63
2.19	Micrografia das AgNPs obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.	65
2.20	Histogramas de distribuição de tamanho de nanopartículas.	65
2.21	Micrografia das AgNPs obtidas por TEM, evidenciando as áreas onde foram feitas as análises de EDS.	67
2.22	Espectros de EDS para AgNPs	68
2.23	Difratograma de raios X para nanopartículas de prata.	70
2.24	Desenho esquemático mostrando o tamanho que é obtido por microscopia eletrônica de transmissão e tamanho obtido por análise do pico de difração.	71
2.25	Ajuste gaussiano dos picos de difração para nanopartículas IQ-USP para determinação de FWHM.	71
2.26	Experimento de DLS. Amostra A1 Khemia® – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade.	74
2.27	Experimento de DLS. Amostra A2 Khemia® – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade.	74

2.28	Experimento de DLS. Amostra A3 Khemia® – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade.	74
2.29	Experimento de DLS. Amostra B1 IQ-USP – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade.	76
2.30	Experimento de DLS. Amostra B2 IQ-USP – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade.	77
2.31	Experimento de DLS. Amostra B3 IQ-USP – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade.	77
2.32	Experimento de SAXS. Curvas da (A) intensidade de espalhamento em função do módulo do vetor “q” e (B) distribuição de tamanhos da amostra C1.	78
2.33	Experimento de SAXS. Curvas da (A) intensidade de espalhamento em função do módulo do vetor “q” e (B) distribuição de tamanhos da amostra C2.	78
2.34	Experimento de SAXS. Curvas da (A) intensidade de espalhamento em função do módulo do vetor “q” e (B) distribuição de tamanhos da amostra C3.	79
3.1	Ilustração esquemática de eventuais consequências decorrentes da incubação de AgNPs em fluidos fisiológicos.	96
3.2	Interação de AgNPs com a célula.	100
3.3	Curvas de crescimento celular padrão para células viáveis.	103
3.4	Espectrofotômetro de microplacas <i>Multiskan MCC/340</i>	109
3.5	Ensaio de citotoxicidade por incorporação do vermelho neutro.	109
3.6	Perfis de crescimento celular obtido ao término dos ensaios com a linhagem NCTC–L929.	111
3.7	Comparação detalhada do perfil de crescimento celular obtido ao término dos ensaios com a linhagem NCTC–L929.	112
3.8	Perfis de crescimento celular obtido ao término dos ensaios com a linhagem RASM.	113
3.9	Cultura de músculo liso de aorta de coelho (RASM) isolada e mantida em DMEM na ausência ou presença de suplemento de soro de coelho a 10%.	114
3.10	Gráficos monologarítmicos para a fase log de crescimento celular, obtidos com dados experimentais das linhagens celulares NCTC–L929 e RASM.	115
3.11	Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro, realizado para AgNPs IQ-USP.	118
3.12	Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro, realizado para AgNPs IQ-USP.	119
3.13	Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro, realizado para AgNPs IQ-USP.	120
3.14	Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro, realizado para AgNPs Khemia®.	121
3.15	Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro, realizado para AgNPs Khemia®.	122
3.16	Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro, realizado para AgNPs Khemia®.	122

3.17	Microscopia de fluorescência. Painéis apresentando alterações morfológicas em núcleos de células RASM na presença de diferentes concentrações de nanopartículas de prata.	124
4.1	Constituintes principais do citoesqueleto.	137
4.2	<i>Overlay</i> da arquitetura da actina.	139
4.3	<i>Overlay</i> do perfil mecânico da actina.	140
4.4	Cisalhamento de um fluido simples.	141
4.5	Modelo de Maxwell para um amortecedor newtoniano.	143
4.6	Microesferas e esquema da citometria óptica de torção magnética.	147
4.7	Esquema do aparato experimental utilizado na técnica de OMTC	147
4.8	Comportamento do módulo $\tilde{G}$ para líquidos e sólidos.	148
4.9	Aparato experimental para medidas de OMTC.	149
4.10	Diferenças nos poços com células tratadas com AgNPs Khemia [®] no experimento de OMTC.	151
4.11	Valores das médias módulos de armazenamento e de perda para diferentes concentrações de AgNPs IQ-USP.	152
4.12	Valores das médias módulos de armazenamento e de perda para diferentes concentrações de AgNPs Khemia [®]	153

LISTA DE TABELAS

2.1	Estudos relatando o processo de síntese de nanopartículas de prata por intermédio de plantas.	42
2.2	Estudos relatando o processo de síntese de nanopartículas de prata por intermédio de bactérias e fungos.	42
2.3	Parâmetros decorrentes da análise de difratogramas de AgNPs IQ-USP para estrutura cúbica de face centrada (FCC) e determinação do tamanho do cristalito.	72
2.4	Experimento de DLS. Descrição das amostras estudadas no experimento de DLS, mostrando a distribuições de número e tamanho médio.	73
2.5	Experimento de SAXS. Descrição das amostras estudadas.	77
2.6	Experimento de SAXS. Dados obtidos através do ajuste do modelo.	78
2.7	Comparação dos dados obtidos por SAXS, TEM e DLS.	80
3.1	Parâmetros importantes no estudo de cinética de crescimento celular. . .	115
3.2	Concentrações de AgNPs IQ-USP e Khemia [®] utilizadas nos experimentos deste trabalho.	116

SUMÁRIO

Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	15
1 Contextualização	21
1.1 Motivação e Justificativa	23
1.2 Objetivos da Pesquisa	25
1.3 Colaborações e Parcerias	26
Referências	27
2 Nanopartículas de Prata	35
2.1 Estados de Oxidação	36
2.2 Mecanismos de Síntese e Produção	38
2.3 Propriedades Ópticas e Eletrônicas	43
2.4 Materiais e Métodos	50
2.4.1 Produção de Nanopartículas	50
2.4.2 Absorção Óptica	52
2.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Espectroscopia de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva	54
2.4.4 Difratometria de Raios X	55
2.4.5 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta	57
2.4.6 Espalhamento de Raios X a baixo ângulo	61
2.5 Resultados e Discussões	63
Referências	80
3 Citotoxicidade	93
3.1 Comportamento de NPs de prata em líquidos e meios biológicos	93
3.2 Absorção de nanopartículas de prata em mamíferos	97
3.3 Mecanismos de Interação NP–Célula	99
3.4 Cultivo de células	102
3.5 Cinética de crescimento celular	103
3.6 Modelagem matemática para estudos cinéticos	105
3.7 Materiais e Métodos	105
3.7.1 Ensaios Cinéticos de Crescimento Celular	105
3.7.2 Testes de Citotoxicidade por Captação do Vermelho Neutro	107
3.7.3 Investigação morfológica utilizando microscopia de fluorescência	110
3.8 Resultados e Discussões	111
Referências	126

4	Mecânica Celular	135
4.1	Microrreologia	136
4.2	Citoesqueleto	137
4.3	Mecanismo de movimentação celular e Arquitetura da Actina	138
4.4	Modelo de Maxwell para o estudo de propriedades mecânicas celulares	140
4.5	Citometria Óptica de Torção Magnética	146
4.6	Materiais e Métodos	149
4.6.1	Citometria Óptica de Torção Magnética	149
4.7	Resultados e Discussões	150
	Referências	155
5	Considerações Finais	161
A	Procedimento básico para subcultivo celular	169
B	Equipamentos e meios de cultivos utilizados em subcultivos celulares	171
C	Equipamentos presentes na Sala de Cultura do LabM²	173

Capítulo 1

CONTEXTUALIZAÇÃO

Neste capítulo, introduzimos o contexto científico em que os estudos com nanopartículas de prata se desmembram, desde síntese e caracterização até algumas linhas de investigações tangentes ao campo da Biofísica e Física da Matéria Condensada. Neste sentido, apresentamos a questão de pesquisa deste trabalho, bem como os objetivos principais e os meios que empregamos para alcançar nosso intento, dentro de uma perspectiva amplamente interdisciplinar, cujo caráter lança constantemente novos desafios e esforços de integração de ciências básicas como física, química e biologia na solução de questões sociocientíficas que se apresentam à medida em que a demanda tecnológica aumenta e o refinamento constante das pesquisas científicas se faz cada vez mais necessário.

NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) conquistaram uma acentuada importância nas últimas décadas em pesquisa científica no cenário mundial devido aos mais variados usos, principalmente em eletrônica, catálise, imagem, fotônica e fotografia (Liang et al., 2007; Evanoff & Chumanov, 2005; Dahl et al., 2007). Mais recentemente, têm sido utilizadas em estudos envolvendo a interface física-química-biologia, investigando toxicidade e o comportamento de propriedades celulares (Pastoriza-Santos & Liz-Marzán, 2008; Fabry et al., 2001). Muitos dispositivos médicos e produtos terapêuticos contendo AgNPs oferecem benefícios para a saúde, tais como antimicrobianos, antivirais e propriedades antifúngicas e, por causa de tais propriedades, AgNPs constituem o foco de precauções relacionados com a saúde pública e riscos ambientais (Faunce & Watal, 2010; Oliveira et al., 2013).

Existem diversos produtos comercializados contendo AgNPs nos Estados Unidos, tais como roupas, produtos de limpeza e de higiene pessoal (Faunce & Watal, 2010). Nas células animais, a prata apresenta grande toxicidade e tem sido alvo de diversos estudos *in vitro*, que observaram que AgNPs podem formar complexos prata-proteína, que se depositam na pele e órgãos como pulmão e rins, sendo altamente tóxicas para as células do fígado, células estaminais¹ e células cerebrais (Oliveira et al., 2013).

A exposição das AgNPs a organismos vivos tem sido um tema preocupante, levando autoridades a estabelecerem limites seguros. O *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) definiu o limite de exposição de $0.01 \text{ mg}/\text{m}^3$ para todas as formas de prata (Drake & Hazelwood, 2005). Recentemente, as nanopartículas de prata foram consideradas um dos maiores problemas que podem afetar negativamente a conservação da diversidade biológica (Sutherland et al., 2010), devido à ampla utilização de AgNPs, não somente por causa da intoxicação direta em seres humanos ou produção de resistência bacteriana em ambiente hospitalar, mas devido à sua toxicidade para diferentes tipos de organismos, principalmente aquáticos (Oliveira et al., 2013). As diversas formas de prata podem ser liberadas no meio ambiente em forma de resíduos, e é sabido que o descartado através do desenvolvimento fotográfico tem sido a principal fonte de toxicidade ecológica (Luoma, 2008).

Diversas pesquisas toxicológicas realizadas com nanopartículas de prata com diferentes diâmetros, variando entre 35 e 70 nm têm sido relatadas em ambientes de água doce através do uso de crustáceos (Oliveira et al., 2013). Na faixa de baixas concentrações de 3 – 4 mg/ℓ, a toxicidade não é dependente do tamanho (Li et al., 2010). Estudos

¹Células pluripotentes, com capacidade de se auto-renovarem, de se dividirem indefinidamente e que podem diferenciar-se em vários tipos de células.

envolvendo nanopartículas de prata abordaram a toxicidade da prata (Hussain et al., 2005). A abordagem mais comum quando se trata de sintetizar nanopartículas de prata baseia-se em métodos redutores, utilizando borohidrato de sódio, citrato de sódio, ou irradiação (Lee & Meisel, 1982; Chau et al., 2005). Para evitar a agregação de partículas, a síntese é frequentemente realizada na presença de aditivos, tais como polímeros a exemplo do polivinilpirrolidona (PVP), peptídeos ou moléculas orgânicas (Lodeiro et al., 2010; Oliveira et al., 2011). Esses aditivos recobrem as nanopartículas e impedem, sob certas condições, a agregação ou a coalescência dessas nanopartículas, além de diminuir a toxicidade (Oliveira et al., 2013).

Devido à transferência de elétrons a partir do núcleo de metal das nanopartículas ao aditivo, geralmente nanopartículas metálicas não apresentam emissão de fluorescência. Por outro lado, em alguns casos, a presença de outros tipos de aditivos nas AgNPs melhora as suas propriedades físicas, tal como a luminescência (Tam et al., 2007; Oliveira et al., 2013). Investigações usando nanopartículas fluorescentes têm assim aumentado constantemente nos últimos anos, porque a fluorescência pode ser rastreada *in vivo* e *in vitro* (Leutwyler et al., 1996).

AgNPs exibem uma banda intensa de ressonância de plasmon de superfície localizado (RPSL), devido à oscilação coletiva dos elétrons, na faixa de comprimentos de onda de 300 – 900 nm, com a máxima intensidade aparecendo comumente em torno de 400 a 450 nm (Díez et al., 2009; Oliveira et al., 2013). A localização da banda RPSL depende de vários parâmetros, tais como, o tamanho, a forma e o índice de refração do meio em que estão as nanopartículas (Si et al., 2007; Belser et al., 2009). Maretti et al. (2009) publicou um novo método fácil com base na síntese fotoquímica de AgNPs fluorescentes, que pode ser utilizado em aplicações de imagiologia. No método de Maretti, as AgNPs foram estabilizadas pela ciclo-hexilamina², e o metal é reduzido por radicais cetilo³.

Diversas técnicas podem ser empregadas para o estudo de nanopartículas de qualquer natureza, incluindo as metálicas, sendo algumas delas comumente empregadas, tais como: difratometria de raios X (XRD) (Dorofeev et al., 2012; Liu et al., 2007; Singh et al., 2013; Theivasanthi & Alagar, 2011); técnicas microscópicas como a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Hussain et al., 2011; Baia & Simon, 2007; Mühlfeld et al., 2007) e a microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) (Morones et al., 2005; Mock et al., 2002; Gardea-Torresdey et al., 2003); espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Martinez-Castanon et al., 2008; Saxena et al., 2010; Foldbjerg et al., 2009); espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Shankar et al., 2003; Vigneshwaran et al., 2007), espectroscopia Raman (Emory & Nie, 1997; Nie

²Composto orgânico, uma amina derivada do ciclohexano.

³Em Química Orgânica, um grupo cetilo é um ânion radical com estrutura geral C–O. Este radical é muito instável e aparece em reações químicas como um intermediário da reação.

& Emory, 1997; Cao et al., 2002), espectroscopia de fluorescência (Chen et al., 2007; Gogoi et al., 2006), espectroscopia na região de UV-Visível (Martinez-Castanon et al., 2008; Haiss et al., 2007; Jensen et al., 1999), espectroscopia de absorção atômica (Karimi et al., 2011; Awwad et al., 2013), potencial zeta (Kim et al., 2007; Foldbjerg et al., 2009; Sadowski et al., 2008; Sondi et al., 2003) entre outras.

1.1 Motivação e Justificativa

A nanotecnologia envolve a criação e o uso de estruturas, dispositivos e sistemas que possuam novas propriedades e funções por causa do seu pequeno tamanho, e que confere a capacidade para controlar e manipular a matéria na escala atômica e molecular (Savage et al., 2007). Nanomateriais (NMs) são um grupo heterogêneo de substâncias que variam em tamanho de 1–100 nm e estrutura, como por exemplo, partículas e tubos. Novos NMs com diferentes e interessantes propriedades continuam a ser descobertos e produzidos e, conseqüentemente, é difícil fazer generalizações amplas sobre as propriedades físicas e químicas de NMs, necessitando combinar, dependendo do material, diferentes técnicas para se chegar a uma caracterização estrutural adequada, ressaltando as propriedades físico-químicas. Isso se aplica a nanopartículas, nanotubos, nanofios, derivados de fulereno, e pontos quânticos, que receberam uma enorme atenção para a criação de novos produtos de consumo, juntamente com o avanço de ferramentas analíticas inovadoras para as ciências físicas e da vida (Cui et al., 2005; Wu & Bruchez, 2005; Savage et al., 2007).

Com relação às AgNPs, apesar de existir um grande e crescente número de aplicações para NPs, há uma séria falta de informação sobre os mecanismos pelos quais elas atuam e, conseqüentemente, as suas implicações para a saúde humana. As informações disponíveis a partir dos estudos limitados sobre efeito biológico de NMs em vários modelos experimentais é insuficiente (Savage et al., 2007) para tirar conclusões sobre os potenciais efeitos colaterais da ação das NPs (Gwinn & Vallyathan, 2006), e, por conseguinte, torna-se necessário avaliar os efeitos benéficos ou tóxicos destes novos NMs em sistemas biológicos.

Apesar do uso generalizado de produtos contendo nanopartículas de prata, relativamente poucos estudos têm sido realizados para determinar o efeito biológico da exposição das AgNPs em diferentes linhagens celulares (Hsin et al., 2008). Estudos *in vitro* utilizando fígado e linhagens celulares neuroendócrinas têm demonstrado que altas concentrações (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de AgNPs induzem toxicidade celular após 24 horas de exposição como um resultado do rompimento celular, glutathiona reduzida

(GSH)⁴, redução do potencial mitocondrial⁵, e um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS)⁶ (Takenaka et al., 2001; Hussain et al., 2005).

Em fibroblastos⁷ NIH3T3, AgNPs apresentam citotoxicidade e induz apoptose, liberação de citocromo C para o citosol, e translocação de Bax para dentro da mitocôndria (Hsin et al., 2008). No entanto, em linhagens de células tumorais humanas HCT 16, AgNPs regulam positivamente a proteína antiapoptótica BCL, que parece estar associada com uma diminuição da resposta apoptótica (Hsin et al., 2008). Estes dados sugerem que atividades das AgNPs estão relacionadas a alvos biológicos.

NPs têm ações complexas e diversas no sistema cardiovascular. A exposição a NPs de ferro, ítrio e óxido de cério (CeO₂) tem atenuado progressivamente a disfunção cardíaca e remodelação de um modelo murino⁸ de miocardiopatia isquêmica (Niu et al., 2007). O efeito benéfico de nanopartículas de cério é um resultado da inibição do estresse oxidativo e a resposta inflamatória pelas propriedades antioxidantes do CeO₂ (Niu et al., 2007). Foi recentemente demonstrado que NPs submetidas à translocação dos pulmões para o sangue com um baixo nível de absorção por parte do macrófagos (Nemmar et al., 2004) são absorvidos pelas células endoteliais; em alguns casos, isto resulta na indução da disfunção endotelial, promove a inflamação, trombose, e a formação de placas de ateroma⁹ (Nemmar et al., 2004). Foi demonstrado que nanopartículas de carbono, em concentrações elevadas, alteram a morfologia de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (Yamawaki & Iwai, 2006). Um efeito semelhante foi observado em células endoteliais aórticas humanas (HAEC) após exposição aguda a nanopartículas de óxido de zinco, ZnO e óxido de ítrio III, Y₂O₃ (Gojova et al., 2007).

Exposição a AgNPs também induz a apoptose em células, tal como indicado por um

⁴Glutathione é o antioxidante hidrossolúvel mais importante presente nos sistemas vivos. Existe na maioria das células, sendo encontrado em maior concentração no fígado e tendo um papel importante na metabolização de diversas substâncias.

⁵As mitocôndrias utilizam substratos oxidáveis para produzir um potencial de membrana sob a forma de um gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial. Recentemente, foi demonstrado que o fornecimento de substratos oxidáveis para a mitocôndria depende da concentração de fatores de crescimento externo. A retirada de fatores de crescimento ou perda do fornecimento de glicose extracelular vai levar a uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial. Se o fator de crescimento ou a privação de glicose persistir, em última análise, as células sofrem apoptose, ou morte celular.

⁶A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre durante os processos oxidativos biológicos, sendo assim formadas fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos, mas que também podem se originar a partir de compostos exógenos, como nanopartículas de qualquer natureza.

⁷O fibroblasto é a célula constituinte do tecido conjuntivo e sua função é formar a substância fundamental amorfa, um dos componentes da matriz extracelular que, por sua vez, representa a massa que une as células dos animais e que é composta de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas e integrinas, segregadas pelas próprias células.

⁸Relativo à *Murinae*, família de camundongos que compreendem 519 espécies.

⁹Ateromas são carboidratos, compostos especialmente de cálcio e ferro, que se formam na parede do pâncreas. Acumulam-se progressivamente no pâncreas, podendo chegar à obstrução total do mesmo e, possivelmente, ocasionando isquemias teciduais.

claro aumento da atividade da caspase-3 e fragmentação de DNA (Kalishwaralal et al., 2009). Estes exemplos indicam que os efeitos biológicos benéficos ou prejudiciais das NPs são dependentes da composição da partícula e da natureza do alvo biológico.

Assim, estudos realizados em outras áreas de conhecimento, como a Física, podem ajudar a esclarecer algumas questões que permanecem abertas, de natureza interativa entre as NPs e as células. Nesse contexto, a mecânica celular surge como um ramo da ciência que estuda as deformações celulares, como contrações agonistas¹⁰, um tema amplo envolvendo áreas da Física, Engenharia, Química e Biologia (Rodriguez et al., 2013). Uma dessas propriedades é a viscoelasticidade de células e suas consequências, um tema também conhecido como microrreologia celular e será completamente detalhado no Capítulo 4 desta tese.

1.2 Objetivos da Pesquisa

O objetivo geral dessa pesquisa de doutoramento é a caracterização e estudo do efeito de nanopartículas de prata nas propriedades mecânicas de células de músculo liso de aorta de coelho (RASM). Os objetivos específicos compreendem 3 etapas de estudo:

1. Caracterização estrutural de nanopartículas de prata

indexnanopartículas de prata

Serão caracterizados dois tipos de nanopartículas de prata: uma comercial que será designada por (AgNP Khemia®) e outra não-comercial, produzida pelo Instituto de Química da USP, doravante designada (AgNP IQ-USP). Essa caracterização será realizada por diferentes técnicas experimentais que serão descritas no Capítulo 2 com intuito de conhecer melhor a natureza dessas nanopartículas.

2. Estudos de toxicidade de nanopartículas em células

Serão determinadas as condições de subcultivo celular por intermédio de cinéticas de crescimento celular e analisado o comportamento de células RASM na presença de nanopartículas através de testes de citotoxicidade e microscopia de fluorescência. Os procedimentos serão detalhados no Capítulo 3.

3. Estudo do comportamento de propriedades mecânicas celulares

O comportamento das propriedades mecânicas celulares, basicamente a viscosidade e a elasticidade, na presença de diferentes concentrações de AgNPs, serão estudadas por intermédio da técnica Citometria óptica de torção magnética, que será explanada no Capítulo 4.

¹⁰Quando uma substância química se liga em um receptor e o ativa, essa substância é chamada de agonista. Por sua vez, os receptores designa as proteínas que permitem a interação de determinadas substâncias com os mecanismos do metabolismo celular.

1.3 Colaborações e Parcerias

A ideia original deste estudo foi concebida de forma que as atividades pudessem ser desenvolvidas dentro e fora do Instituto de Física da USP, devido à natureza interdisciplinar, envolvendo, principalmente, a Física, a Química e a Biologia. Nesse sentido, diversas parcerias e colaborações necessitaram ser firmadas e desenvolvidas para dar suporte ao bom andamento do projeto.

A síntese de AgNPs não é objetivo deste trabalho. Enquanto estávamos à procura de nanopartículas de prata ideais (2013), surgiu a oportunidade de utilizar as nanopartículas desenvolvidas pela empresa Khemia®, que está localizada no Centro de Inovação, Empreendedorismo e Tecnologia (CIETEC) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), autarquia associada à Universidade de São Paulo. A empresa produz as nanopartículas pelo método industrial eletrolítico e se interessou pela caracterização básica e as aplicações biológicas previstas no projeto, nos fornecendo a quantidade de produto necessária para realização dos experimentos. Mais informações sobre o produto podem ser obtidas na página oficial da empresa na Web: <http://loja.khemia.com.br/>.

Recentemente, o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) resolveu ampliar a parceria com a Universidade, tendo em vista aumentar o número de colaborações e publicações científicas de seus pesquisadores. Projetos de pesquisas que envolvem temáticas inovadoras estão sendo fortemente incentivados a desenvolverem atividades no IPT. Parte dessa tese de doutoramento foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT, sendo as atividades acompanhadas pela pesquisadora Dra. Patricia Léo, do núcleo de Bionanomanufatura do IPT (LBI). O LBI pertence a este núcleo, o qual é destinado ao estudo de nanotecnologia, biotecnologia (desenvolvimento com organismos vivos), tecnologia de partículas (microencapsulação de componentes químicos e terapia medicinal), micromanufatura de equipamentos e metrologia de ultraprecisão. Mais informações sobre o núcleo podem ser obtidas em: http://www.ipt.br/centros_tecnologicos/BIONANO.

Em meados de 2014, resolvemos introduzir um segundo tipo de nanopartículas em nossos estudos e escolhemos as AgNPs produzidas pelo grupo do professor Dr. Pedro Henrique Cury Camargo, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP). O grupo produz diversos tipos de nanopartículas com diferentes geometrias e tamanho controlado, principalmente para aplicações em catálise¹¹.

Algumas medidas que compõem este trabalho também foram desenvolvidas no

¹¹Catálise, em Química, é o aumento da velocidade de uma reação, devido à adição de uma substância, conhecida como catalisador. Catalisadores, em geral, aceleram a velocidade de transformação dos reagentes. Seja nas indústrias, aumentando a eficiência e produtividade das reações, ou nos laboratórios, diminuindo o tempo de espera para que uma reação ocorra, são de extrema importância. Com a diminuição das dimensões de diferentes materiais à escala nano, algumas vantagens aparecem. Isso acontece devido às propriedades únicas existentes em materiais nessa escala de tamanho.

Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular (LabM²), cujo responsável é o professor Dr. Adriano Mesquita Alencar. O laboratório possui um fluxo contínuo de auxílios de diversas agências de fomento, tais como: FAPESP, CNPq, CAPES e Pró Reitoria de Pesquisa da USP. O fluxo contínuo é fundamental, visto que a manutenção das células tem um custo elevado principalmente no que diz respeito a meios de cultura, gases, descartáveis e reagentes. O laboratório possui toda estrutura para cultivar e manipular diversos tipos de células e vários outros fluidos biológicos ou fluidos em geral, com o controle máximo de pureza. Mais detalhes sobre o laboratório e acesso à produção científica podem ser obtidos no sítio: <http://fig.if.usp.br/~labm2/Laboratorio>.

Outras parcerias foram firmadas com outros laboratórios e institutos para garantir o desenvolvimento desta tese, principalmente pela disponibilidade de centrais multiusuários, como é o caso do Instituto de Ciências Biomédicas; do Laboratório de Cristalografia e Caracterização de Materiais (LCCEM) da Universidade Federal do ABC; do Laboratório de Filmes Finos, Cristais Iônicos e Datação (LACIFID – IFUSP) e da Faculdade de Medicina da USP. O LabM² também mantém colaboração com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (INCOR), o qual disponibiliza algumas linhagens celulares para o laboratório, como a linhagem que trabalhamos no desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

- Awwad, A. M., Salem, N. M., & Abdeen, A. O. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *International journal of Industrial chemistry*, 4(1), 1–6. DOI: [10.1186/2228-5547-4-29](https://doi.org/10.1186/2228-5547-4-29).
- Baia, L. & Simon, S. (2007). Uv-vis and tem assessment of morphological features of silver nanoparticles from phosphate glass matrices. *Modern research and educational topics in microscopy*.
- Belser, K., Vig Slenters, T., Pfumbidzai, C., Upert, G., Mirolo, L., Fromm, K. M., & Wennemers, H. (2009). Silver nanoparticle formation in different sizes induced by peptides identified within split-and-mix libraries. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(20), 3661–3664. DOI: [10.1002/anie.200806265](https://doi.org/10.1002/anie.200806265).
- Cao, Y. C., Jin, R., & Mirkin, C. A. (2002). Nanoparticles with raman spectroscopic fingerprints for dna and rna detection. *Science*, 297(5586), 1536–1540. DOI: [10.1126/science.297.5586.1536](https://doi.org/10.1126/science.297.5586.1536).
- Chau, J. L. H., Hsu, M.-K., Hsieh, C.-C., & Kao, C.-C. (2005). Microwave plasma synthesis of silver nanopowders. *Materials Letters*, 59(8), 905–908. DOI: [10.1016/j.matlet.2004.10.068](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2004.10.068).

- Chen, Y., Munechika, K., & Ginger, D. S. (2007). Dependence of fluorescence intensity on the spectral overlap between fluorophores and plasmon resonant single silver nanoparticles. *Nano letters*, 7(3), 690–696. DOI: [10.1021/nl062795z](https://doi.org/10.1021/nl062795z).
- Cui, D., Tian, F., Ozkan, C. S., Wang, M., & Gao, H. (2005). Effect of single wall carbon nanotubes on human hek293 cells. *Toxicology letters*, 155(1), 73–85. DOI: [10.1016/j.toxlet.2004.08.015](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.08.015).
- Dahl, J. A., Maddux, B. L., & Hutchison, J. E. (2007). Toward greener nanosynthesis. *Chemical reviews*, 107(6), 2228–2269. DOI: [10.1021/cr050943k](https://doi.org/10.1021/cr050943k).
- Díez, I., Pusa, M., Kulmala, S., Jiang, H., Walther, A., Goldmann, A. S., Müller, A. H., Ikkala, O., & Ras, R. H. (2009). Color tunability and electrochemiluminescence of silver nanoclusters. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(12), 2122–2125. DOI: [10.1002/anie.200806210](https://doi.org/10.1002/anie.200806210).
- Dorofeev, G., Streletskii, A., Povstugar, I., Protasov, A., & Elsukov, E. (2012). Determination of nanoparticle sizes by x-ray diffraction. *Colloid Journal*, 74(6), 675–685. DOI: [10.1134/S1061933X12060051](https://doi.org/10.1134/S1061933X12060051).
- Drake, P. L. & Hazelwood, K. J. (2005). Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Annals of Occupational Hygiene*, 49(7), 575–585. DOI: [10.1093/annhyg/mei019](https://doi.org/10.1093/annhyg/mei019).
- Emory, S. R. & Nie, S. (1997). Near-field surface-enhanced raman spectroscopy on single silver nanoparticles. *Analytical chemistry*, 69(14), 2631–2635. DOI: [10.1021/ac9701647](https://doi.org/10.1021/ac9701647).
- Evanoff, D. D. & Chumanov, G. (2005). Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem*, 6(7), 1221–1231. DOI: [10.1002/cphc.200500113](https://doi.org/10.1002/cphc.200500113).
- Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D., & Fredberg, J. J. (2001). Scaling the microrheology of living cells. *Physical review letters*, 87(14), 148102. DOI: [10.1103/PhysRevLett.87.148102](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.148102).
- Faunce, T. & Watal, A. (2010). Nanosilver and global public health: international regulatory issues. *Nanomedicine*, 5(4), 617–632. DOI: [10.2217/nnm.10.33](https://doi.org/10.2217/nnm.10.33).
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J., & Autrup, H. (2009). Pvp-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in thp-1 monocytes. *Toxicology letters*, 190(2), 156–162. DOI: [10.1016/j.toxlet.2009.07.009](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009).
- Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., & Jose-Yacaman, M. (2003). Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, 19(4), 1357–1361. DOI: [10.1021/la020835i](https://doi.org/10.1021/la020835i).
- Gogoi, S. K., Gopinath, P., Paul, A., Ramesh, A., Ghosh, S. S., & Chattopadhyay, A. (2006). Green fluorescent protein-expressing escherichia coli as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir*, 22(22), 9322–9328. DOI: [10.1021/la060661v](https://doi.org/10.1021/la060661v).

- Gojova, A., Guo, B., Kota, R. S., Rutledge, J. C., Kennedy, I. M., & Barakat, A. I. (2007). Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environmental health perspectives*, (pp. 403–409). DOI: [10.1289/ehp.8497](https://doi.org/10.1289/ehp.8497).
- Gwinn, M. R. & Vallyathan, V. (2006). Nanoparticles: health effects: pros and cons. *Environmental health perspectives*, (pp. 1818–1825). DOI: [10.1289/ehp.8871](https://doi.org/10.1289/ehp.8871).
- Haiss, W., Thanh, N. T., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from uv-vis spectra. *Analytical chemistry*, 79(11), 4215–4221. DOI: [10.1021/ac0702084](https://doi.org/10.1021/ac0702084).
- Hsin, Y.-H., Chen, C.-F., Huang, S., Shih, T.-S., Lai, P.-S., & Chueh, P. J. (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ros-and jnk-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in nih3t3 cells. *Toxicology letters*, 179(3), 130–139. DOI: [10.1016/j.toxlet.2008.04.015](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.04.015).
- Hussain, J. I., Kumar, S., Hashmi, A. A., & Khan, Z. (2011). Silver nanoparticles: preparation, characterization, and kinetics. *Adv. Mat. Lett*, 2(3), 188–194. DOI: [10.5185/amlett.2011.1206](https://doi.org/10.5185/amlett.2011.1206).
- Hussain, S., Hess, K., Gearhart, J., Geiss, K., & Schlager, J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in brl 3a rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19(7), 975–983. DOI: [10.1016/j.tiv.2005.06.034](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.034).
- Jensen, T. R., Schatz, G. C., & Van Duyne, R. P. (1999). Nanosphere lithography: surface plasmon resonance spectrum of a periodic array of silver nanoparticles by ultraviolet-visible extinction spectroscopy and electrodynamic modeling. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(13), 2394–2401. DOI: [10.1021/jp984406y](https://doi.org/10.1021/jp984406y).
- Kalishwaralal, K., Banumathi, E., Pandian, S. R. K., Deepak, V., Muniyandi, J., Eom, S. H., & Gurunathan, S. (2009). Silver nanoparticles inhibit vegf induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(1), 51–57. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2009.04.025](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.04.025).
- Karimi, M., Mohammadi, S., Mohadesi, A., Hatefi-Mehrjardi, A., Mazloum-Ardakani, M., Korani, L. S., & Kabir, A. A. (2011). Determination of silver (i) by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration using modified magnetite nanoparticles. *Scientia Iranica*, 18(3), 790–796. DOI: [10.1016/j.scient.2011.06.008](https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.06.008).
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95–101. DOI: [10.1016/j.nano.2006.12.001](https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001).
- Lee, P. & Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391–3395. DOI: [10.1021/j100214a025](https://doi.org/10.1021/j100214a025).
- Leutwyler, W. K., Bürgi, S. L., Burgli, H., et al. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 271(5251), 933–937. DOI: [10.1126/science.271.5251.933](https://doi.org/10.1126/science.271.5251.933).

- Li, T., Albee, B., Alemayehu, M., Diaz, R., Ingham, L., Kamal, S., Rodriguez, M., & Bishnoi, S. W. (2010). Comparative toxicity study of ag, au, and ag–au bimetallic nanoparticles on daphnia magna. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(2), 689–700. DOI: [10.1007/s00216-010-3915-1](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3915-1).
- Liang, H., Tang, Q., Yu, K., Li, S., & Ke, J. (2007). Preparation of metallic silver from ag 2 s slurry by direct hydrogen reduction under hydrothermal conditions. *Materials Letters*, 61(4), 1020–1022. DOI: [10.1016/j.matlet.2006.06.060](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.06.060).
- Liu, C., Yang, X., Yuan, H., Zhou, Z., & Xiao, D. (2007). Preparation of silver nanoparticle and its application to the determination of ct-dna. *Sensors*, 7(5), 708–718. DOI: [10.3390/s7050708](https://doi.org/10.3390/s7050708).
- Lodeiro, C., Capelo, J. L., Mejuto, J. C., Oliveira, E., Santos, H. M., Pedras, B., & Nuñez, C. (2010). Light and colour as analytical detection tools: a journey into the periodic table using polyamines to bio-inspired systems as chemosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(8), 2948–2976. DOI: [10.1039/B819787N](https://doi.org/10.1039/B819787N).
- Luoma, S. N. (2008). Silver nanotechnologies and the environment. *The Project on Emerging Nanotechnologies Report*, 15.
- Maretti, L., Billone, P. S., Liu, Y., & Scaiano, J. C. (2009). Facile photochemical synthesis and characterization of highly fluorescent silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 131(39), 13972–13980. DOI: [10.1021/ja900201k](https://doi.org/10.1021/ja900201k).
- Martinez-Castanon, G., Nino-Martinez, N., Martinez-Gutierrez, F., Martinez-Mendoza, J., & Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(8), 1343–1348. DOI: [10.1007/s11051-008-9428-6](https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6).
- Mock, J., Barbic, M., Smith, D., Schultz, D., & Schultz, S. (2002). Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*, 116(15), 6755–6759. DOI: [10.1063/1.1462610](https://doi.org/10.1063/1.1462610).
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346. DOI: [10.1088/0957-4484/16/10/059](https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059).
- Mühlfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., Vanhecke, D., Blank, F., Gehr, P., & Ochs, M. (2007). Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy. *Part Fibre Toxicol*, 4(11), 1–17. DOI: [10.1186/1743-8977-4-11](https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-11).
- Nemmar, A., Hoylaerts, M. F., Hoet, P. H., & Nemery, B. (2004). Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicology letters*, 149(1), 243–253. DOI: [10.1016/j.toxlet.2003.12.061](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.061).
- Nie, S. & Emory, S. R. (1997). Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced raman scattering. *science*, 275(5303), 1102–1106. DOI: [10.1126/science.275.5303.1102](https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1102).

- Niu, J., Azfer, A., Rogers, L. M., Wang, X., & Kolattukudy, P. E. (2007). Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovascular research*, 73(3), 549–559. DOI: [10.1016/j.cardiores.2006.11.031](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.11.031).
- Oliveira, E., Genovese, D., Juris, R., Zaccheroni, N., Capelo, J. L., Raposo, M. M. M., Costa, S. P., Prodi, L., & Lodeiro, C. (2011). Bioinspired systems for metal-ion sensing: new emissive peptide probes based on benzo [d] oxazole derivatives and their gold and silica nanoparticles. *Inorganic chemistry*, 50(18), 8834–8849. DOI: [10.1021/ic200792t](https://doi.org/10.1021/ic200792t).
- Oliveira, E., Santos, H. M., Garcia-Pardo, J., Diniz, M., Lorenzo, J., Rodríguez-González, B., Capelo, J. L., & Lodeiro, C. (2013). Synthesis of functionalized fluorescent silver nanoparticles and their toxicological effect in aquatic environments (goldfish) and hepg2 cells. *Frontiers in chemistry*, 1. DOI: [10.3389/fchem.2013.00029](https://doi.org/10.3389/fchem.2013.00029).
- Pastoriza-Santos, I. & Liz-Marzán, L. M. (2008). Colloidal silver nanoplates. state of the art and future challenges. *Journal of Materials Chemistry*, 18(15), 1724–1737. DOI: [10.1039/B716538B](https://doi.org/10.1039/B716538B).
- Rodriguez, M. L., McGarry, P. J., & Sniadecki, N. J. (2013). Review on cell mechanics: experimental and modeling approaches. *Applied Mechanics Reviews*, 65(6), 060801. DOI: [10.1115/1.4025355](https://doi.org/10.1115/1.4025355).
- Sadowski, Z., Maliszewska, I., Grochowalska, B., Polowczyk, I., & Kozlecki, T. (2008). Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. *Materials Science-Poland*, 26(2), 419–424.
- Savage, N., Thomas, T. A., & Duncan, J. S. (2007). Nanotechnology applications and implications research supported by the us environmental protection agency star grants program. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(10), 1046–1054. DOI: [10.1039/b704002d](https://doi.org/10.1039/b704002d).
- Saxena, A., Tripathi, R., & Singh, R. (2010). Biological synthesis of silver nanoparticles by using onion (allium cepa) extract and their antibacterial activity. *Dig J Nanomater Bios*, 5(2), 427–432.
- Shankar, S. S., Ahmad, A., & Sastry, M. (2003). Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnology progress*, 19(6), 1627–1631. DOI: [10.1021/bp034070w](https://doi.org/10.1021/bp034070w).
- Si, S., Dinda, E., & Mandal, T. K. (2007). In situ synthesis of gold and silver nanoparticles by using redox-active amphiphiles and their phase transfer to organic solvents. *Chemistry-A European Journal*, 13(35), 9850–9861. DOI: [10.1002/chem.200701014](https://doi.org/10.1002/chem.200701014).
- Singh, F., Gautam, S. K., Kulriya, P. K., & Pivin, J. C. (2013). In situ x-ray diffraction study of the growth of silver nanoparticles embedded in silica film by ion irradiation: The effect of volume fraction. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 311, 5–9. DOI: [10.1016/j.nimb.2013.06.011](https://doi.org/10.1016/j.nimb.2013.06.011).

- Sondi, I., Goia, D. V., & Matijević, E. (2003). Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 260(1), 75–81. DOI: [10.1016/S0021-9797\(02\)00205-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00205-9).
- Sutherland, W. J., Clout, M., Côté, I. M., Daszak, P., Depledge, M. H., Fellman, L., Fleishman, E., Garthwaite, R., Gibbons, D. W., De Lurio, J., et al. (2010). A horizon scan of global conservation issues for 2010. *Trends in ecology & evolution*, 25(1), 1–7. DOI: [10.1016/j.tree.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.003).
- Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., & Heyder, J. (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental health perspectives*, 109(Suppl 4), 547. DOI: [10.2307/3454667](https://doi.org/10.2307/3454667).
- Tam, F., Goodrich, G. P., Johnson, B. R., & Halas, N. J. (2007). Plasmonic enhancement of molecular fluorescence. *Nano letters*, 7(2), 496–501. DOI: [10.1021/nl062901x](https://doi.org/10.1021/nl062901x).
- Theivasanthi, T. & Alagar, M. (2011). Electrolytic synthesis and characterizations of silver nanopowder. *arXiv preprint arXiv:1111.0260*.
- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N., Varadarajan, P., Nachane, R., Paralikar, K., & Balasubramanya, R. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *aspergillus flavus*. *Materials letters*, 61(6), 1413–1418. DOI: [10.1016/j.matlet.2006.07.042](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.07.042).
- Wu, X. & Bruchez, M. P. (2005). Labeling cellular targets with semiconductor quantum dot conjugates. *Methods Cell Biology*, 75, 171–183. DOI: [10.1016/S0091-679X\(04\)75007-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)75007-4).
- Yamawaki, H. & Iwai, N. (2006). Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells. *Circulation Journal*, 70(1), 129–140.

Capítulo 2

NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Apresentamos o conceito de nanotecnologia, o qual já despontava na comunidade científica no final da década de 1950, destacando as nanopartículas de prata como uma classe de nanomateriais que vem continuamente ganhando importância, do ponto de vista científico e tecnológico, devido à inúmeras propriedades, incluindo a antimicrobiana. Abordamos os processos de síntese e produção de nanopartículas e algumas propriedades, como ópticas e eletrônicas. Nos resultados experimentais, descrevemos os processos de caracterização, enfatizando técnicas estudadas, discutindo forma, tamanho, estabilidade e agregação de nanopartículas de prata coloidal.

RICHARD FEYNMAN, nomeado físico estadunidense, estabeleceu em 1959 as bases conceituais da nanotecnologia, quando proferiu a palestra *There's plenty of room at the bottom*, em tradução livre, "Há muito espaço na parte inferior" (Feynman, 1960). Feynman explorou a possibilidade de manipular materiais na escala de átomos e moléculas individuais, imaginando o conjunto da Enciclopédia Britânica escrita sobre a cabeça de um alfinete, prevendo a crescente capacidade de examinar e controlar a matéria à escala nanométrica.

O prefixo *nano* deriva da palavra grega para "anão". Um nanômetro (nm) equivale a um bilhonésimo de um metro, 10^{-9} m; para comparação, um fio de cabelo humano possui aproximadamente 80.000 nm de largura, e uma célula do sangue, aproximadamente 7.000 nm de largura (Salehahmadi & Hajiliasgari, 2013). A Figura 2.1 mostra a escala nanométrica em contexto. Os átomos estão abaixo de um nanômetro de tamanho, enquanto que muitas moléculas, incluindo proteínas, variam de 1 nm para cima.

Nanopartículas de prata são uma classe de nanomateriais e um exemplo dos inúmeros tipos diferentes de NPs que estão sendo manipuladas para uso em uma grande variedade de aplicações de consumo, industriais e biomédicas. A prata é um metal precioso, com o símbolo químico Ag, uma abreviação da palavra latina para a prata, ou seja, *argentum* (Behra et al., 2013). AgNPs são aglomerados de átomos de prata que variam em diâmetro de 1 a 100 nm e estão atraindo interesses, uma vez que suas características mais inovadoras estão associadas com o aumento de suas propriedades antimicrobianas (Edwards-Jones, 2009; Morones et al., 2005). Devido à estas propriedades antimicrobianas, AgNPs são atualmente as NPs mais comumente usadas em aplicações industriais e de consumo. O uso de Ag como um agente antimicrobiano, no entanto, não é um conceito novo (Behra et al., 2013). Diversos utensílios, como panelas e talheres, além de moedas feitas com prata foram usadas em tempos antigos para manter a água estéril e, em particular, nitrato de prata (AgNO_3) tem sido usado desde o século XVII como um essencial medicamento polivalente (Klasen, 2000; Maillard & Hartemann, 2013). Diversos tipos de dispositivos médicos, revestimentos, suplementos alimentares, filtros de ar, materiais utilizados em embalagens alimentares, cosméticos e aparelhos eletrônicos constituem alguns dos usos recentes de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano (Mikkelsen et al., 2011; Behra et al., 2013; Rai et al., 2009).

A exposição humana à Ag foi descrita ocorrendo por via oral, dérmica ou por inalação e a exposição ocupacional é uma preocupação primordial. Os pacientes que inalam ou ingerem Ag em grandes quantidades e durante um longo período de tempo, desenvolvem uma doença chamada *argiria*, significando que a pele apresenta uma coloração

Figura 2.1: Escala de comprimento mostrando o nanômetro em contexto. A escala de comprimento na parte superior varia de 1 m a 10^{-10} m, e ilustra o tamanho de uma bola de futebol em comparação com uma molécula de carbono 60 (C60), também conhecido como fulereno. Para comparação, o mundo é de aproximadamente uma centena de milhões de vezes maior do que uma bola de futebol, que é por sua vez cem milhões de vezes maior do que um fulereno. A escala de 10^{-7} m (100 nm) a 10^{-9} m (1 nm) está expandida abaixo. O comprimento de escala de interesse para as nanociências e nanotecnologias é de 100 nm até a escala atômica – aproximadamente 0.2 nm. (A) Bola de futebol (~ 22 cm); (B) pulga doméstica (1 mm); (C) cabelo humano ($80\ \mu\text{m}$); (D) hemácias do sangue ($7\ \mu\text{m}$); (E) partículas do vírus icosaedral (150 nm); (F) carbono 60 (0.7 nm); (G) partículas de platina e dióxido de titânio (partículas de platina menores que 3 nm de diâmetro estão indicadas nas setas); (H) Logo IBM (cada letra do logo tem ~ 5 nm do topo até a base); (I) Segmento de DNA (~ 2 nm de largura); (J) feixe de nanotubos de carbono (~ 1.4 nm de largura). Figura adaptada de [Dowling et al. \(2004\)](#).

azul ou cinza ([Behra et al., 2013](#); [Albers, 1816](#)). No entanto, não há informações se os pacientes têm sido expostos à AgNPs ou à forma *bulk* deste material. As preocupações ambientais são agravadas devido à utilização de AgNPs em máquinas de lavar roupa e aplicações similares, que podem causar a liberação direta de NPs em células humanas e no ambiente e assim deixar em exposição organismos vivos às AgNPs.

2.1 Estados de Oxidação

Na presença de umidade, AgNPs metálicas na forma atômica (Ag^0) são oxidadas, o que resulta na liberação de íons de prata (Ag^+). A prata elementar tem número de oxidação zero. Na maioria dos seus compostos, o seu número de oxidação é +1 ([Bailar, 1944](#)). Exemplos são cloreto de prata (AgCl), óxido de prata (Ag_2O), brometo de prata (AgBr), iodeto de prata (AgI) e perclorato de prata (AgClO_4). No entanto, existe um

óxido de valência mista (Ag_4O_4), onde 2 dos Ag são +1 e 2 são +3. Os haletos de prata são facilmente reduzidos à prata elementar pela luz, e essa é a base do setor de fotografia. O cloreto de prata serve como material sensível à luz em papéis de impressão fotográfica e, juntamente com o brometo de prata, em certos filmes e placas. O iodeto também é utilizado na fabricação de papéis fotográficos e filmes, bem como em bombardeamento de nuvens para a fabricação de chuva artificial e em alguns antissépticos. Todos os três halogenetos são derivados do nitrato de prata (AgNO_3), que é o mais importante dos sais inorgânicos de prata (McMillan, 1962).

Ao analisarmos um composto iônico, como por exemplo AgCl , pode-se facilmente determinar o estado de oxidação do metal de transição, neste caso, o estado de oxidação da prata (Ag). Uma vez que sabemos que o cloro (Cl) está no grupo dos halogêneos da tabela periódica, percebemos que ele tem uma carga de -1 , ou simplesmente Cl^- . Além disso, ao observarmos que não há carga global para AgCl , (o que é determinado observando a parte superior direita do composto, ou seja, $\text{AgCl}^\#$ (# representa a carga geral do composto), pode-se concluir que Ag tem um estado de oxidação de $+1$. Isso nos dá Ag^+ e Cl^- , em que a soma das cargas positivas e negativas resulta em uma carga global neutra; portanto, $+1$ é tido como um estado de oxidação da prata.

A reação de oxidação da prata é tipicamente lenta e depende fortemente das propriedades da AgNP, tais como o tamanho e revestimento e condições do ambiente (Albers, 1816). A prata iônica não é prata metálica que se encontra em NPs, mas uma solução dissolvida de prata. Um íon de prata é um único átomo de prata em que está faltando um elétron orbital. O número e a disposição dos elétrons orbitais de um átomo de prata determinam suas propriedades físicas. Quando um elétron é removido, as propriedades físicas da prata são drasticamente alteradas. Um íon é a menor unidade de Ag e não é considerado uma nanopartícula, mas alguns produtores industriais de nanopartículas de prata deliberadamente confundem esses conceitos, comercializando partículas extremamente pequenas às quais chamamos “micropartículas” como sendo nanopartículas. Íons e nanopartículas são duas formas completamente diferentes e os benéficos e malefícios da prata, como tal, precisam ser considerados de forma independentes (Levard et al., 2012). Alguns estudos realçam ainda mais outros aspectos que podem contribuir para o impacto ambiental e biológico da Ag (Lima et al., 2012). Assim que AgNPs são liberadas no meio ambiente, como por exemplo, no ar ou na água, em meios experimentais ou em fluidos biológicos, elas começam a transformar-se, o que modifica as suas propriedades e influencia o seu transporte, destino e eventual toxicidade (Levard et al., 2012). Ag é insolúvel em água, ao passo que muitos sais de Ag, tais como por exemplo, AgNO_3 são solúveis em água (Panáček et al., 2006; Nair & Laurencin, 2007). Como visto, Ag existe naturalmente em diversos estados de oxidação, geralmente metálico, como Ag e Ag^+ ; outros estados de oxidação possíveis e são Ag^{2+}

e Ag^{3+} (Eustis et al., 2006; Roper, 1990), estas duas últimas formas são, no entanto, sem importância para as soluções aquosas, coloidais, e sob condições ambientais ou biológicas.

2.2 Mecanismos de Síntese e Produção

Na literatura, encontra-se um número grande de estudos abordando a síntese de nanopartículas de Ag (Panáček et al., 2006; Nair & Laurencin, 2007; Sun & Xia, 2002). Normalmente, existem duas metodologias para sintetizar NPs metálicas: uma delas é o chamado método *bottom-up*, no qual nanoestruturas são obtidas por meio da montagem de unidades básicas menores em estruturas maiores (Behra et al., 2013). O outro é o método *top-down*, que tem início a partir do material na forma *bulk*, cujo tamanho é reduzido no transcorrer do processo. Tais métodos costumam incluir, por exemplo, litografia e fotolitografia (Eustis et al., 2006; Van Hoonacker & Englebienne, 2006).

Um dos métodos mais extensivamente estudados para produzir AgNPs, consiste na redução controlada (Pastoriza-Santos & Liz-Marzán, 2008; Shirtcliffe et al., 1999) de sais de Ag, à qual normalmente é realizada utilizando um agente redutor químico (Nickel et al., 2000; Leopold & Lendl, 2003), mas também, através de eletroquímica (Sun & Xia, 2002; Zhang et al., 2008) ou fotoquímica (Yin et al., 2002; Liu & Lin, 2004). Este processamento químico, que ocorre por via úmida, envolvendo sais Ag reduzidos (em uma ou mais etapas) para metal de Ag, pode ser governado por diversos parâmetros, tais como a escolha do agente de redução, as concentrações de reagentes, temperatura, pH, taxa de mistura e tempo de reação (Nair & Laurencin, 2007; Yin et al., 2002). A fim de adaptar as propriedades das partículas, muitos estudos focaram-se na geração de nanopartículas de diferentes formas, tais como barras, fios, cubos, placas finas ou bipirâmides (Raveendran et al., 2003). Além disso, um substancial esforço tem sido dedicado à fabricação de estruturas de núcleo-revestimento (Rodrigues et al., 2015), como, por exemplo nanopartículas Ag@Au (partículas de núcleo de prata com uma casca de ouro, conhecidas na literatura como *core-shell*) ou Ag@SiO₂ (Sun & Xia, 2002; Sharma et al., 2009; Behra et al., 2013).

Normalmente, o uso de agentes redutores fortes resultam na formação de nanopartículas menores, enquanto o uso de agentes redutores fracos normalmente levam à partículas maiores de Ag (Behra et al., 2013). Isto fica evidente em estudos que investigaram a estabilidade coloidal e a influência de boro-hidreto e citrato em distribuição de tamanho de partícula (Van Hoonacker & Englebienne, 2006; Raveendran et al., 2003).

AgNPs são comercializadas como suspensão coloidal. Coloides são misturas heterogêneas de diferentes fases distintas, com a matéria de uma das fases na forma finalmente dividida (sólido, líquido ou gás), denominada fase dispersa, misturada com

a fase contínua (sólido, líquido ou gás), denominada meio de dispersão e se relacionam com o estudo de nanosistemas. Se as partículas que constituem o sistema tiver tamanhos diferentes, o sistema é denominado polidisperso, e se tiverem tamanhos iguais, monodisperso (Shaw, 1975). Graham, em 1861, introduziu o termo *coloide* em um estudo sobre a difusão da matéria nos estados gasoso e líquido. O termo *coloide*, do grego, significa cola e na época referiu-se às soluções de goma arábica, substância sem estrutura definida e de natureza viscosa, hoje conhecida como macromolécula. A goma arábica, coloide, difundia mais lentamente que soluções de sais, cristalóide (Rosenfeld, 2012). A Figura 2.2 mostra um processo de síntese para AgNPs coloidal, utilizando um método de co-redução, empregando dois redutores diferentes, borohidreto de sódio (NaBH_4) e citrato de sódio para oferecer um melhor controle na nucleação e no crescimento das partículas (Behra et al., 2013). Borohidreto ou dimetilformamida são exemplos de agentes redutores fortes usados para produzir NPs de Ag. Estudos têm demonstrado o impacto da temperatura na velocidade de reação e, consequentemente, na formação de partículas (Pastoriza-Santos & Liz-Marzán, 2008; Abid et al., 2002).

Figura 2.2: Representação esquemática do processo de produção de nanopartículas de prata de tamanho controlado, sintetizadas utilizando borohidreto de sódio e citrato de sódio como agentes redutores. A redução inicial foi realizada utilizando-se NaBH_4 a $60\text{ }^\circ\text{C}$ (estágio I), que induziu a geração de um grande número de nanopartículas de prata. Nesta fase, a redução dos cátions de prata causou a formação de novos núcleos de Ag. Nanopartículas de prata formadas no estágio inicial, posteriormente participaram no processo de crescimento, onde a redução de íons de Ag não utilizados mediada por citrato foi favorecida à temperatura elevada, isto é, $90\text{ }^\circ\text{C}$, em que prevalece o estágio II. O citrato foi, no entanto, introduzido juntamente com NaBH_4 durante o estágio inicial. À temperatura mais baixa, que prevalece no estágio I, o citrato de sódio passiva principalmente as nanopartículas e impede a sua aglomeração. O tamanho e a morfologia das AgNPs podem ser controlados de maneira precisa através do controle da taxa de redução durante o estágio II, com um pH ótimo de 10.5, devendo ser mantido até o final do processo de síntese. Figura adaptada de Agnihotri et al. (2014).

De acordo com [Mulfinger et al. \(2007\)](#), a reação química de redução do nitrato de prata (AgNO_3) mediante o uso de borohidreto de sódio é a seguinte:

Deve-se levar em consideração que o NaBH_4 ao entrar em contato com a água imediatamente desprende H_2 e se converte em sua forma iônica $(\text{BH}_4)^-$ e esta espécie estabiliza as AgNPs por repulsão eletrônica ([Mulfinger et al., 2007](#); [Van Hyning & Zukoski, 1998](#)).

O chamado processo de poliol utiliza etilenoglicol tanto como agente redutor quanto solvente. A reação é realizada a 160°C , utilizando nitrato de prata como fonte de Ag ([Fievet et al., 1993](#); [Troupis et al., 2002](#)). Sun e Xia mostraram em 2002 como esta reação pode ser ajustada através da alteração dos parâmetros da reação. Eles produziram nanocubos individuais de Ag com dimensões controláveis ([Sun & Xia, 2002](#); [Xie et al., 2007](#)). Após aquecimento na presença de ar, o etilenoglicol é convertido em glicolaldeído, que atua como um redutor dominante na síntese de poliol de nanoestruturas de Ag. Poli (vinilpirrolidona), PVP, é comumente utilizado como estabilizador para evitar a aglomeração de partículas coloidais em síntese de poliol. Foi demonstrado que este método é eficaz para fazer nanoestruturas de Ag, Pd, Pt e, como polióis têm constante dielétrica relativamente elevada, podem servir como bons solventes para os precursores metálicos e o PVP. À temperatura elevada, etilenoglicol pode reduzir íons Ag^+ em Ag^0 e estabilizar a estrutura resultante. Além disso, as extensões da força de interação do PVP com diferentes facetas cristalográficas de uma estrutura de Ag são diferentes e poderia, portanto, induzir o crescimento anisotrópico de prata. A Figura 2.3 ilustra AgNPs de diferentes formas, produzidas com este processo e dá mais detalhes. Foi estabelecido que a morfologia das nanopartículas finais é determinada, principalmente, pelo número de defeitos individuais presentes nas sementes iniciais de Ag ([Sajanlal et al., 2011](#)).

Metodologias atuais bastante inovadoras consistem na obtenção de nanopartículas por vias orgânicas. Podemos citar o processo de Tollens para a produção de AgNPs, um método de um só passo ([Yin et al., 2002](#)). Esta reação tem sido utilizada na deposição química de Ag para gerar espelhos refletores em suportes sólidos e combina açúcares redutores e soluções amoniacaais de prata ([Yin et al., 2002](#)). As distribuições de tamanho de partículas obtidas são geralmente estreitas e a escolha de condições apropriadas de reação também é fundamental neste processo. O método de Tollens é um exemplo de uma síntese verde de AgNPs. De acordo com Raveendran et al. ([Raveendran et al., 2003](#)), uma abordagem sintética verde inclui (i) seleção do meio solvente, (ii) seleção de agentes redutores ambientalmente benignos, e (iii) seleção dos estabilizadores de partículas não-tóxicos. A Tabela 2.1 mostra diferentes estudos realizados utilizando diversos tipos de plantas na produção de nanopartículas de prata, representando o

Figura 2.3: Nanopartículas de prata produzidas com diferentes formas pelo processo de poliol: (A) Micrografia SEM de nanofios de Ag. A inserção mostra uma micrografia TEM da seção transversal de um nanofio. Figura reproduzida de [Wiley et al. \(2007\)](#); (B) Micrografia SEM de nanocubos de Ag. Figura reproduzida de [Sun & Xia \(2002\)](#); (C) Micrografia SEM de bipirâmides de Ag de cerca de 75 e 150 nm de comprimento de aresta. Figura reproduzida de [Xiong et al. \(2007\)](#); (D) Micrografia SEM de nanobarras de Ag, com NaBr substituindo NaCl. Figura reproduzida de [Im et al. \(2005\)](#); (E) Micrografia SEM de “nanorices” de Ag. Figura reproduzida de [Lofton & Sigmund \(2005\)](#); (F) Micrografias de nanoplacas de Ag. Figura reproduzida de [Xiong et al. \(2007\)](#). No processo de poliol, o etilenoglicol anidro é aquecido a 160 °C. Então, soluções separadas de AgNO_3 e PVP em etilenoglicol são injetadas no frasco de reação. O primeiro passo do crescimento é a redução de AgNO_3 por etilenoglicol à uma temperatura elevada e a formação de prata elementar. Nas etapas seguintes, estes átomos de prata nucleiam e formam aglomerados (estruturas flutuantes) e partículas quase esféricas. Uma vez que os núcleos atingem um determinado tamanho, tornam-se sementes ou um único cristal, isoladamente geminado. No passo seguinte, os átomos de prata gerados a partir da redução de AgNO_3 se difundem para a superfície dos núcleos e irão se depositar em locais ativos na superfície, formando ligações metálicas com seus vizinhos. Ao ajustar a proporção molar entre PVP e AgNO_3 , a espessura de revestimento de PVP e a localização das cadeias de PVP sobre planos cristalinos adequados podem ser modificados ([Sajanlal et al., 2011](#)). Esta modificação altera a resistência de cada faceta de crescimento e leva à formação de nanoestruturas de prata com formas distintas.

tamanho destas por seu diâmetro, ϕ .

Um estudo realizado por Sharma et al. ([Sharma et al., 2009](#)) resume as abordagens atuais da química verde para sintetizar NPs de Ag focando o método de Tollens acima referido, o método polissacarídeo (utilizando polissacáridos ([Raveendran et al., 2003](#)) como nivelamento e/ou redução), métodos de irradiação (por exemplo, utilizando irradiação a laser ([Abid et al., 2002](#)) de uma solução aquosa de sais de Ag em combinação com um agente tensioativo), polioxometalatos, os quais são solúveis em água e podem se submeter a reações redox multieletrônicas por etapas ([Troupis et al., 2002](#)) e os métodos biológicos ([Xie et al., 2007](#)). Este último conta com a redução de íons de Ag

Tabela 2.1: Estudos relatando o processo de síntese de nanopartículas de prata por intermédio de plantas.

Número	Organismo	ϕ de Partícula (nm)	Referência
1	<i>Medicago sativa</i>	2 a 20	Gardea-Torresdey et al. (2003)
2	<i>Azadirachta indica</i>	50	Shankar et al. (2004)
3	<i>Aloe vera</i>	15 a 20	Chandran et al. (2006)
4	<i>Cinnamomum camphora leaf</i>	55 a 80	Huang et al. (2007)
5	<i>Carica papaya fruit</i>	15	Jain et al. (2009)
6	<i>Cinnamomum zeylanicum bark</i>	50 a 100	Sathishkumar et al. (2009)
7	<i>Jatropha curcas</i>	10 a 20	Bar et al. (2009)
8	<i>Desmodium triflorum</i>	5 a 20	Ahmad et al. (2011)
9	<i>Coriandrum sativum leaf</i>	26	Sathyavathi et al. (2010)
10	<i>Piper betle leaf</i>	3 a 37	Mallikarjuna et al. (2012)

usando extratos de bio organismos, que podem atuar como redutores e agentes de nivelamento, sendo cada vez mais estudados atualmente os fungos e bactérias, que através da enzima nitrato reductase, transformam íons Ag^+ em nanopartículas, Ag^0 (Behra et al., 2013). A Tabela 2.2 mostra estudos realizados com diferentes organismos na obtenção de AgNPs.

Tabela 2.2: Estudos relatando o processo de síntese de nanopartículas de prata por intermédio de bactérias e fungos.

Número	Organismo	Tipo de Organismo	ϕ de Partícula (nm)	Referência
1	<i>P. stutzeri</i> AG259	Bactéria	200	Klaus et al. (1999)
2	<i>Bacillus megaterium</i>	Bactéria	46.9	Fu et al. (1999)
3	<i>Plectonema boryanum</i>	Bactéria	1 a 200	Lengke et al. (2007)
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	Bactéria	50 a 100	Minaeian et al. (2008)
5	<i>Escherichia coli</i>	Bactéria	5 a 25	El-Shanshoury et al. (2011)
6	<i>B. licheniformis</i>	Bactéria	50	Kalimuthu et al. (2008)
7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Bactéria	11.2	Sintubin et al. (2009)
8	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Bactéria	50	Mokhtari et al. (2009)
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Bactéria	10 a 20	Samadi et al. (2009)
10	<i>Brevibacterium casei</i>	Bactéria	50	Kalishwaralal et al. (2010)
11	<i>Verticillium sp.</i>	Fungo	25	Mukherjee et al. (2001)
12	<i>Phoma sp.</i> 3.2883	Fungo	70	Chen et al. (2003)
13	<i>F. oxysporum</i>	Fungo	20 a 50	Durán et al. (2005)
14	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Fungo	100	Vigneshwaran et al. (2006)
15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo	5 a 25	Bhainsa & D'souza (2006)
16	<i>Aspergillus flavus</i>	Fungo	7 a 10	Vigneshwaran et al. (2007)
17	<i>Fusarium semitectum</i>	Fungo	10 a 60	Basavaraja et al. (2008)
18	<i>Coriolus versicolor</i>	Fungo	350 a 600	Sanghi & Verma (2009)
19	<i>Fusarium solani</i>	Fungo	5 a 35	Ingle et al. (2009)
20	<i>Aspergillus clavatus</i>	Fungo	10 a 25	Verma et al. (2010)

Quando se visa aplicações de NPs, fundamental é se dedicar ao desenvolvimento de técnicas de controle de fenômenos de agregação. Em vista de aumentar a estabilidade coloidal das partículas, normalmente agentes de proteção são utilizados. É imprescindível a escolha do material de cobertura utilizado para proteger ou passivar a superfície da NP, uma vez que tem muita importância no tamanho e morfologia e até mesmo nas

aplicações ou interações biológicas específicas (célula–nanopartícula), em geral (Behra et al., 2013). O agente redutor largamente utilizado e estabilizador na síntese de coloides metálicos é o citrato de sódio, tendo sido aplicado para produzir controladamente NPs de Ag (Lee & Meisel, 1982). Outro estabilizante muito comumente usado na síntese de Ag coloidal é o 3–aminopropil–trimetoxi–silano (Pastoriza-Santos & Liz-Marzán, 1999). Variações de parâmetros típicos mostraram que, adaptando a temperatura da reação, AgNPs adsorvidas em esferas de sílica ou partículas de Ag com finas camadas de sílica em formato de conchas poderiam ser obtidas (Behra et al., 2013). Tióis de cadeia longa têm sido estudados extensivamente para revestir e estabilizar NPs metálicas (Nair & Laurencin, 2007).

Liu et al. (Liu et al., 2007) investigaram o impacto de ligantes multidentados de tiol em eficiência de nivelamento. Eles mostraram que, devido aos vários sítios de ligação na superfície da NP, agentes de nivelamento multidentados produziram NPs menores e mais estáveis. Além de tais moléculas pequenas, uma grande variedade de polímeros sintéticos e naturais têm sido investigados como estabilizadores de AgNPs (Behra et al., 2013). Há mais de trinta anos, poli (vinil pirrolidona) (PVP) foi usado pela primeira vez, sendo utilizado para preparar nanopartículas metálicas desde então (Hirai et al., 1979). Alguns outros polímeros normalmente utilizados incluem poliacrilatos, poli (álcool vinílico) e poliacrilamida (Nair & Laurencin, 2007) e, além destes, macromoléculas ramificadas têm sido estudadas como estabilizadores para AgNPs (Behra et al., 2013). Luo et al. (Luo & Sun, 2007) sintetizaram pequenas AgNPs (20–40 nm) usando a terceira geração de poli(propileno)imina com solução de AgNO_3 sem a introdução de reagentes redutores adicionais e reagentes de proteção em síntese assistida por micro-ondas (Behra et al., 2013).

2.3 Propriedades Ópticas e Eletrônicas

As propriedades ópticas de nanopartículas metálicas são determinadas pela interação da radiação eletromagnética com os elétrons livres de condução. Quando existe um acoplamento entre a frequência do campo elétrico alternado da radiação eletromagnética e a oscilação dos elétrons de condução (os quais recebem o nome de plasmon de superfície), a condição de absorção é cumprida e a ressonância de plasmon de superfície localizada (RPSL) ocorre (Kreibig & Vollmer, 1995). Há controvérsias a respeito do uso do termo *RPSL*, isso porque a dimensão dos sistemas é da mesma ordem da profundidade de penetração da radiação eletromagnética em metais na escala nanométrica. Assim, a rigor, embora ainda seja frequentemente usada, a denominação *plasmon superficial* perde o sentido. Os fatores que conduzem a oscilação coletiva dos elétrons são: (i) a aceleração dos elétrons de condução pelo campo elétrico da radiação

incidente, (ii) a presença de forças restauradoras que resultam da polarização induzida, tanto na partícula quanto no meio que a envolve e (iii) o confinamento de elétrons em dimensões menores que o comprimento de onda da luz. A frequência da RPSL depende de vários fatores, tais como: distribuição de tamanho das NPs, tipo de material (prata, cobre, ouro), ambiente químico onde as NPs estão inseridas e formato das mesmas. Para NPs esféricas de prata e de ouro, a RPSL ocorre geralmente no visível (Kreibig & Vollmer, 1995; Mulvaney, 1996), na região do azul, embora possa ser deslocada para o infravermelho próximo, ao qual chamamos de *redshift*, para certas geometrias, como *nanoshells* (Oldenburg et al., 1999) ou *nanorods* (Jana et al., 2001; Perez-Juste et al., 2004). A Figura 2.4 apresenta a RPSL para NPs de ouro, prata e cobre.

Figura 2.4: Ressonância de plasmon de superfície localizada (RPSL) para bandas de AgNPs (425 nm), AuNPs (520 nm) e CuNPs (612 nm). Uma banda altamente intensa e estreita é observada para AgNPs e AuNPs, enquanto que uma banda fraca e alargada é observada para CuNPs. No detalhe, um desenho esquemático de oscilação de plasmons de uma esfera, mostrando o deslocamento da nuvem eletrônica de condução em relação aos núcleos do dipolo. O modo fundamental corresponde a um campo elétrico interno uniforme (modo de polarização uniforme). Assim, os elétrons oscilam (excitados pelo campo externo) por todo o volume da partículas de maneira uniforme. O deslocamento das partículas esféricas em relação ao núcleo positivo da NP, estabelece uma densidade de carga na superfície da NP que, por sua vez, cria uma força restauradora, auxiliando na movimentação dos elétrons. Figura adaptada de Kaur & Pal (2015); Lu et al. (2009).

Os coloides feitos com estes materiais apresentam uma cor muito intensa, a qual está ausente para o material na forma *bulk*, bem como para os átomos. Nanopartículas de ouro coloidais são responsáveis pelos tons vermelhos brilhantes visto em vitrais,

enquanto nanopartículas de prata exibem tipicamente uma coloração amarela. Este é eminentemente um efeito de superfície, logo a deposição de um segundo metal sobre um núcleo ou uma primeira camada metálica pode alterar completamente a condição de ressonância e alterar a cor do espalhamento de nanopartícula. A Figura 2.5 ilustra o espectro de cor para coloides de Ag.

Figura 2.5: *Coloide de Ag em várias tonalidades de amarelo. A cor amarela é característica do coloide de prata e a variação nas cores pode ser explicada, não absolutamente, mas também por mudanças na concentração, aumento de tamanho das partículas e índice de refração. Coloides com mesma concentração de Ag, mas com tamanhos de partículas diferentes, exibem diferentes colorações, tais como coloides preparados com o mesmo tamanho de partícula, mas com diferentes concentrações. À medida que Ag se junta com outros metais para formar nanopartículas bimetálicas ou de forma controlada, a RPSL se altera, se deslocando para comprimentos de onda mais longos e com energia mais baixa (redshift) e conseqüentemente, a cor do coloide muda. Se o índice de refração perto da superfície das NPs também se alterar, o espectro também se desloca para o redshift. Assim, dependendo da preparação e da aplicação, coloides de prata exibem cores muito diferentes, cobrindo eficazmente o espectro visível. Isto não é um efeito quântico, mas apenas uma constatação da RPSL. Figura obtida do site: <<http://nanocomposix.com>>. Acesso em 23/02/2015.*

As propriedades ópticas de nanopartículas de diferentes geometrias podem ainda ser estudadas por uma técnica conhecida como espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), que é muito sensível à superfície e resulta na ampliação do espalhamento Raman por moléculas sobre superfícies (Lu et al., 2009). Estudos recentes utilizando nanocubos de Ag sobre um substrato de Si confirmaram a sua atividade em SERS e revelaram como a SERS é sensível para a geometria de características em nano-escala (McLellan et al., 2007). Diferente de medidas em solução, quando nanocubos são suportados, eles tem uma orientação fixa em relação à polarização do laser. A Figura 2.6 mostra os efeitos da polarização do laser sobre o campo elétrico local de um nanocubo. Estudos de (Lu et al., 2009) mostram que quando um nanocubo é

irradiado com luz polarizada na direção [100], o campo elétrico recolhe em todos os cantos do cubo (Figura 2.6 A); no entanto, quando a luz é polarizada na direção [110], a acumulação ocorre apenas ao longo da diagonal (Figura 2.6 B). Esta dependência de polarização também afeta a intensidade do campo elétrico local. Para o cubo, a amplitude máxima do campo elétrico $|\vec{E}|_{max}$ na polarização [100] é de 26.5, enquanto que o valor é de 37.8 para a polarização [110]. Este resultado indica que a polarização [110] poderia gerar uma intensificação de pico cerca de quatro vezes maior do que a polarização [100], uma vez que SERS é proporcional à $|\vec{E}|^4$. Como o campo não é uniformemente distribuído, a amplitude calculada sobre a totalidade da superfície da partícula é, talvez, um valor mais útil para prever o efeito SERS de uma única partícula. Neste caso, a média dos valores de $|\vec{E}|^4$ para a polarização [100] e [110] são 2653 e 5154, respectivamente. Comparado com uma nanoesfera (Figura 2.6 C), o nanocubo tem uma intensidade do campo elétrico muito maior devido aos seus cantos afiados. Estes cálculos não só demonstram a importância da forma das partículas em controlar a distribuição de campos próximos, mas também sugerem que os sinais de SERS podem variar, se a partícula não é esférica e é posicionada em diferentes orientações relativas à polarização do laser (Lu et al., 2009).

Com relação às propriedades eletrônicas, as nanopartículas metálicas apresentam um estado da matéria na região de transição entre o *bulk* e *clusters* de átomos. Como consequência, as suas propriedades físicas e químicas, gradualmente, alteram a partir do estado sólido para o comportamento molecular e pode ser resumido como dois fenômenos básicos: em primeiro lugar, devido à pequenas dimensões, a razão da superfície em relação ao volume aumenta, e o número de átomos de superfície pode ser semelhante ou mais elevado do que aqueles localizados no núcleo da rede cristalina, e as propriedades de superfície não são negligenciáveis. Quando não há outras moléculas sendo adsorvidas nas NPs, os átomos superficiais são altamente insaturados e suas contribuições eletrônicas no comportamento eletrônico das partículas é totalmente diferente da dos átomos presentes no interior da NP. Estes efeitos podem ser ainda mais acentuados quando os átomos superficiais estão ligados (Marquardt et al., 1986). Isto leva a diferentes propriedades de transporte eletrônico de NPs (Henglein, 1989). O segundo fenômeno que ocorre em NPs metálicas e semicondutoras é totalmente um efeito de natureza eletrônica. A estrutura de banda evolui gradualmente com o aumento do tamanho de partículas, isto é, orbitais moleculares se convertem em estados de banda de energia deslocalizados. Em um metal, a densidade quase contínua de estados de valência e as bandas de condução se dividem em níveis eletrônicos discretos; o espaçamento entre esses níveis e o *band gap* aumenta com a diminuição do tamanho das partículas (Schön & Simon, 1995; Weller, 1993). No caso de semicondutores, o fenômeno é ligeiramente diferente, uma vez que o *gap* já existe no estado *bulk*. No

Figura 2.6: Padrões de amplitude do campo elétrico para uma nanopartícula cúbica de Ag de 100 nm em duas polarizações e uma esfera de Ag de 100 nm quando irradiados no comprimento de onda de 514 nm: (A) um nanocubo de Ag, com a luz incidente, juntamente com o eixo Z e campo elétrico ao longo do eixo X ou na direção [100]. (B) Um nano cubo de Ag com luz incidente ao longo do eixo Z e campo elétrico na direção [110]. (C) Uma nanoesfera de Ag, com a luz incidente ao longo do eixo Z e o campo elétrico ao longo do eixo X. A amplitude do campo incidente foi assumida como 1. (D) Espectros de extinção de campo distante calculados para uma nanoesfera de Ag no ar (linha sólida laranja) e um nanocubo de Ag excitado em duas polarizações: [110] (linha pontilhada azul) e [100] (linha sólida vermelha). Todo o espectro foi calculado para partículas em suspensão no ar. Figura adaptada de [Lu et al. \(2009\)](#).

entanto, esta banda também aumenta quando o tamanho de partícula é reduzido e as bandas de energia convertem gradualmente em níveis eletrônicos moleculares discretos ([Kalyane, 2017](#)). A Figura 2.7 apresenta um esquema representando as bandas de energia associadas aos metais.

Se o tamanho da partícula é menor do que o comprimento de onda de de Broglie, os portadores de carga podem ser tratados como partículas em uma caixa, utilizando o formalismo da Mecânica Quântica, em que o tamanho da caixa é dado pelas dimensões dos cristalitos ([Schön & Simon, 1995](#)). Em semicondutores, o efeito de quantização que aumenta a distância óptica é habitualmente observado para os agregados que variam de

Figura 2.7: Esquema mostrando os níveis de energia eletrônica em metais. Da esquerda para a direita, na parte inferior: átomo, cluster, NP do tipo core-shell e um sólido. Em cor azul sólida está representado os estados desocupados. À esquerda, observa-se o nível de energia discreto do átomo. Conforme os átomos se reúnem em forma de aglomerados, a formação de bandas de energia tem início, de maneira discreta, e centrada nos níveis de energia originais. Com o aumento do número de átomos, os níveis do centro da banda se aproximam e se tornam contínuos, enquanto as regiões no topo e na base da banda ainda estão discretas. No limite em que o número de átomos aumenta consideravelmente, formam um “bulk” e as bandas de energia adquirem um caráter contínuo. Existe uma diferença entre as bandas de energia das NPs metálicas e de NPs semicondutoras. O último nível de energia eletrônica ocupado em $T = 0\text{K}$, denominado nível de Fermi (N_F) em metais, se encontra no centro da banda de condução, que está semipreenchida, enquanto que em semicondutores, o nível de Fermi localiza-se entre a banda de valência e a banda de condução (respectivamente, totalmente preenchida e totalmente vazia em $T = 0\text{K}$). Com o decréscimo nas dimensões, a transição do contínuo para o discreto ocorre na extremidade das bandas e, devido a isto, efeitos de tamanho são percebidos primeiramente por elétrons de NPs semicondutoras. Logo, mesmo com tamanho, NPs metálicas apresentam características de volume devido ao fato de que seus elétrons livres se encontram na região central da banda, onde a discretização eletrônica ainda não é percebida. Figura adaptada de [Pereira \(2009\)](#).

1 a 10 nm. NPs metálicas, consistindo de 50 a 100 átomos, com diâmetro entre 1 e 2 nm começam a perder seu comportamento metálico e tendem a se tornar nanopartículas semicondutoras ([Simon et al., 1993](#)). Partículas que mostram o efeito de quantização de tamanho são conhecidas por pontos quânticos ou *quantum dots*. A Figura 2.8 ilustra *quantum dots* em forma coloidal.

Em tamanhos de partículas muito pequenas, também chamado de aglomerados ou *clusters*, determinados pelos chamados números mágicos, que são mais frequentemente

Figura 2.8: Espectro de cor exibido por quantum dots coloidal. Os quantum dots são nanopartículas ou nanocristais de um material semiconductor com diâmetros na faixa de 2–10 nanômetros (10–50 átomos). Eles foram descobertos pela primeira vez em 1980. Os pontos quânticos exibem propriedades eletrônicas únicas, intermediárias entre as de semicondutores em bulk e moléculas discretas, que são, em parte, o resultado dos índices incomumente altos de superfície-volume para estas partículas. O resultado mais evidente destas propriedades é a fluorescência, em que NPs podem produzir cores distintas determinadas pelo tamanho das partículas. Figura obtida do site: <<http://technicki.com>>. Acesso em 23/02/2015.

observadas do que outros (Kalyane, 2017), os metais têm uma estrutura cheia e fechada na forma cúbica ou hexagonal, que consiste em um átomo central, que é cercado na primeira casca por 12 átomos, na segunda casca por 42 átomos, ou em princípio pela $10n^2 + 2$ átomos na n -ésima casca (Schmid, 1992). Por exemplo, um dos mais famosos clusters metálicos é uma partícula de ouro com 55 átomos (Au_{55}), primeiramente relatada por G. Schmid em 1981 (Schmid et al., 1981). A maneira como os elétrons se comportam no sólido depende de como eles interagem com a rede cristalina, por intermédio de impurezas ou defeitos e também com outros portadores de carga. A redução das dimensões modifica essas interações. É sabido que a densidade de estados para fônons e elétrons diminui com o tamanho, incrementando o tempo de relaxação eletrônica e reduzindo a interação elétron-fônon (Zhang, 1997). Em determinado ponto, no entanto, a interação dos elétrons com a superfície do material sofrerá modificação com a diminuição de tamanho. As interações dos elétrons com o potencial de superfície das nanopartículas se tornam mais relevantes, provocando um mecanismo adicional de redução do tempo de relaxação eletrônica. Sendo assim, pode ocorrer uma competição entre as diferentes interações eletrônicas: o tempo de relaxação é menor para o *bulk* e maior para as nanopartículas, devido à interação elétron-fônon reduzida nas NPs. Se as partículas tem um tamanho ainda menor, o tempo de relaxação também será menor, pois o espalhamento de elétrons pela superfície torna-se dominante (Zhang, 1997).

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Produção de Nanopartículas

As nanopartículas de prata Khemia[®] foram produzidas por intermédio do método eletrolítico. Eletrólise pode ser entendido como qualquer processo químico que ocorra de forma não espontânea, $\Delta G > 0$ (a eletrólise consome energia livre e ocorre à custa de trabalho realizado pela força elétrica), provocado pelo uso de uma corrente elétrica. O processo trabalha com tensões extremamente baixas, utilizando como fonte de tensão contínua ou alternadas, pilhas ou geradores. No processo de obtenção das AgNPs Khemia[®], dois eletrodos de prata pura, comumente chamada de “prata mil”, com 99,99% de pureza, são imersos em água destilada e uma tensão alternada de 1.5 V é utilizada (Figura 2.9). O cátodo descarrega os cátions, onde ocorre redução, cuja semi-reação é:

Os cátions se aproximam do cátodo, absorvendo os elétrons da placa metálica, passando assim, a formar uma substância neutra. A maioria dos processos eletrolíticos tendem a não proporcionar estabilidade para as nanopartículas formadas, e estas tendem a perder elétrons, formando íons Ag^+ devido à falta de repulsão eletrostática.

As nanopartículas Khemia[®] utilizadas no nosso estudo foram produzidas na concentração de 66 ppm (partes por milhão)¹. Parte por milhão é uma medida de concentração que se utiliza quando as soluções são muito diluídas e expressa a massa do soluto disperso, em μg , existentes em 1 g (1 milhão de μg) de solução. Se considera-se a densidade das soluções aquosas (1 g/ $\text{m}\ell$), pode-se ainda escrever:

$$1\text{ppm} = 1\text{mg}/\ell = 1\mu\text{g}/\text{m}\ell.$$

As nanopartículas de prata IQ-USP foram preparadas por intermédio do processo de poliol. Em um procedimento típico, 5 g de polivinilpirrolidona (PVP) foi dissolvido em 37.5 $\text{m}\ell$ de etilenoglicol (EG). Então AgNO_3 (200 mg, 1.2 mmol) foi adicionado e misturado até a completa dissolução. A solução resultante foi aquecida a 125 °C por 2.5 horas, o que ocasionou o aparecimento de uma cor amarela-esverdeada. Depois deixou arrefecer até à temperatura ambiente e diluída em 125 $\text{m}\ell$ de água. A concentração para 1 ℓ de solução foi estimada em: 2.16 mmol/ ℓ . Mais detalhes podem ser consultados no artigo publicado (Rodrigues et al., 2015). A Figura 2.10 mostra os dois tipos de nanopartículas aqui descritas.

¹Exclusivamente para os experimentos de SAXS também foram analisadas AgNPs Khemia[®] na concentração de 56 ppm.

Figura 2.9: Máquinas automatizadas de produção de nanopartículas Khemia®. No lado esquerdo da figura, está uma máquina que tem função de reserva, se destina a eventos e a demonstrações. Ao centro, visualiza-se uma máquina em operação. Há uma terceira máquina semi-automatizada, mostrada ao lado direito, com capacidade de produção de AgNPs e de demais nanopartículas, tais como: AuNPs, ZnNPs, CuNPs; destinada a testes, desenvolvimentos e ensaios na produção de materiais nanoparticulados. As matérias-primas necessárias para produção têm seus maiores custos na água destilada e na energia elétrica consumida (potência média de 200W por máquina automática), sendo o gás carbônico de valor menos significativo. O metal básico a ser eletrolisado tem um desgaste muito pequeno, da ordem de dezenas a centenas de mg/l de composto produzido, a depender da concentração do produto final, que pode atingir 300mg/l. No processo de produção não há necessidade de mão de obra, exceto a necessária para manutenção dos suprimentos de gás e água. *Figura do autor.*

Figura 2.10: Nanopartículas de prata. (A) nanopartículas Khemia®, conforme comercializadas, incolor, protegidas da luz por um frasco de cor âmbar. (B) nanopartículas IQ-USP superconcentradas. A cor escura é de átomos de prata ligados, os quais formam partículas maiores que refletem luz amarela. O detalhe acima do coloide contido no tubo Falcon mais à direita mostra o material parcialmente aderido à parede do frasco, com coloração amarela. *Figura do autor.*

2.4.2 Absorção Óptica

A medida de absorção óptica consiste em determinar a quantidade de luz absorvida por um determinado material. Este tipo de medida só é viável em materiais transparentes e semitransparentes, muito finos e com faces muito bem polidas, para evitar espalhamento. No caso de nanopartículas coloidais, as soluções superconcentradas devem ser diluídas e acondicionadas em cubetas transparentes de plástico, vidro ou quartzo antes das medidas serem efetuadas. Durante as medidas, é necessário considerar o solvente das amostras, uma vez que os espectros podem ser sensíveis ao tipo de solvente, apresentando alterações na largura das bandas, intensidade ou comprimento de onda de absorção (Vilhena, 2006). Outra observação diz respeito ao uso das cubetas: dependendo do tipo de amostra, as cubetas de quartzo são mais indicadas para obtenção dos espectros, depois vêm as cubetas de vidro e, por último, as de plástico.

As medidas de absorção óptica para esse trabalho visaram a obtenção da banda de ressonância de plasmon das AgNPs. Foram realizadas no Laboratório de Cristais Iônicos, Filmes e Datação, no IFUSP. O espectrômetro utilizado foi um *Varian*, modelo *Cary 500 UV-Vis-NIR*, com feixe duplo no modo de absorbância e resolução da ordem de 0.1 nm, que registra comprimentos de onda de 175 a 3500 nm. O aparelho utiliza uma lâmpada de quartzo halogêneo na região do visível e infravermelho e uma lâmpada de deutério na região do UV. Uma célula fotomultiplicadora é utilizada como detector para medidas no intervalo de 175 a 900 nm, enquanto que uma célula fotocondutora de PbS é utilizada para medidas no intervalo de 900 a 2500 nm. Um esquema do equipamento é mostrado na Figura 2.11. As medidas foram realizadas em cubetas de plástico transparente, utilizando água destilada como referência, uma vez que esta é o solvente das nanopartículas que estamos estudando.

Figura 2.11: Esquema de funcionamento do espectrofotômetro de absorção óptica. Uma luz de uma fonte policromática, *F*, atravessa um monocromador, *M*. O feixe monocromático, então, incide sobre a amostra de espessura *d*, atravessando-a e atingindo o detector. Comparando-se a intensidade da luz que chega ao detector, *I*, com a intensidade de referência, *I*₀, pode-se determinar a absorbância da amostra como uma função do comprimento de onda em nanômetros (nm) ou da energia dos fótons, em eV ou cm⁻¹. Figura adaptada de Ccallata (2010).

Figura 2.12: Espectro de absorção óptica. Comprimento de onda (λ) em nm, número de onda (k) em cm^{-1} , energia de transição (E) em eV, absorbância (A) em unidades arbitrárias e coeficiente de absorção (α) em cm^{-1} . Figura adaptada de [Ccallata \(2010\)](#).

É observado experimentalmente que:

$$dI = -\alpha I dx, \quad (2.1)$$

sendo dI a variação da intensidade, I ; dx é o elemento infinitesimal da espessura d da amostra e α é o coeficiente de absorção. Integrando-se a equação diferencial, segue:

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\alpha \int_0^d dx$$

$$\ln \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\alpha d \quad (2.2)$$

Aplicando-se a função exponencial em ambos os lados da equação 2.2, temos:

$$I = I_0 \exp(-\alpha d), \quad (2.3)$$

a qual é conhecida como *Lei de Buger–Lambert–Beer* ([Marfunin, 1979](#)). O coeficiente α é

uma função da concentração dos defeitos ou íons absorvedores presentes no material, tal que $\alpha = \epsilon C$, sendo C a concentração dos absorvedores ($\text{mol} \cdot \ell^{-1}$) e ϵ é o coeficiente de absorção molar ($\ell \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Ccallata, 2010). Um espectro típico de absorção óptica pode ser visto na Figura 2.12, na qual observa-se três regiões espectrais: ultravioleta, visível e infravermelho. Nanopartículas de prata coloidal têm sua banda de absorção em torno de 400 nm, na região do azul.

2.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Espectroscopia de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva

Um microscópio eletrônico de transmissão (MET ou TEM, em inglês) consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10^{-5} mm Hg. Os MET modernos possuem diversas bobinas eletromagnéticas e cerca de cinco ou seis lentes magnéticas. Os elétrons, que possuem intensidade e direção controladas pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra, saem da mesma pela superfície interior. Logo, em seguida, a primeira imagem da distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados é formada pela lente objetiva. As função das lentes restantes é apenas aumentar a imagem ou diagrama de difração para posterior observação em tela (Padilha, 2014). A maioria dos MET utilizados na caracterização de materiais de natureza metálica, cerâmica ou polimérica dispõe de tensões de aceleração de até 200 kV, embora existam alguns aparelhos cuja tensão de aceleração pode chegar até 1000 kV. As partículas metálicas espalham muito mais o feixe de elétrons, do que materiais amorfos como o vidro, de tal forma que podem ser identificadas pelo contraste claro-escuro das micrografias.

A composição das nanopartículas (e diversos outros tipos de materiais) pode ser identificada pelo MET por intermédio de uma técnica conhecida como espectroscopia de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDS), um método de análise qualitativa e quantitativa da composição elementar pela excitação de átomos e detecção de seus raios X característicos. Quando o feixe de elétrons incide sobre o material, elétrons pertencentes às camadas mais próximas do núcleo do átomo são excitados, ocorrendo mudança nos níveis energéticos. Quando estes retornam para a posição de origem, liberam a energia emitida, com determinado comprimento de onda, no espectro do raio X, o qual é medido por um detector instalado na câmara de vácuo do MET. Os elementos constituintes da amostra são distinguidos pelo fato de que os elétrons que constituem um átomo possuem energias distintas. Os espectros de EDS apresentam um espectro devido ao cobre, uma vez que os suportes para análises de microscopia são constituídos por este material. A análise EDS não é destrutiva para a amostra.

Figura 2.13: Microscópio utilizado na obtenção de micrografias com EDS acoplado, instalado na Central Analítica do Instituto de Química da USP. *Figura do autor.*

Para as micrografias apresentadas neste estudo, as amostras foram preparadas depositando-se as nanopartículas sobre tela suporte de cobre, recobertas com filme *Collodion* e carbono e, após secagem por 1 semana, foram obtidas as imagens em campo claro em um microscópio *MET JEOL JEM 2100*, operado a 200 kV, na Central Analítica do Instituto de Química da USP, mostrado na Figura 2.13. Os espectros EDS foram obtidos utilizando o mesmo equipamento e as mesmas amostras.

2.4.4 Difratometria de Raios X

Os raios X são radiações eletromagnéticas que corresponde a uma faixa do espectro que vai desde 10 nm a 0.1 nm (ou 1.0 a 100 Å). Acima dessa faixa temos os raios gama, cujos comprimentos de onda são menores que 0.1 nm. Fenômenos que produzem emissão de raios X consistem de espalhamento de elétrons e saltos quânticos: o primeiro consiste no encurvamento da trajetória de um elétron incidente sobre um núcleo atômico. O encurvamento provoca a desaceleração dos elétrons, fazendo com que estes convertam parte de sua energia cinética em radiação fluorescente (raios X) e calor e essa emissão aparece na forma de um espectro contínuo, denominado radiação branca. O segundo diz respeito à forma como os elétrons incidentes podem arrancar elétrons da camada

mais interna do elemento alvo, deixando suas posições vacantes. Isso acontece porque a diferença de potencial atinge um valor crítico, chamado potencial de excitação. Assim, elétrons das camadas mais externas do elemento podem preencher essas posições vacantes, liberando raios X. Por exemplo, a radiação K_{α} ocorre quando um elétron da camada L preenche uma vacância da camada K. O espectro de raios X produzido desta forma depende do elemento do alvo (material) e é chamado de espectro característico. Assim o espectro de raios X produzido por um difratômetro comercial é constituído por dois espectros superpostos: o espectro contínuo e o característico (Kahn, 2014).

Compostos orgânicos ou inorgânicos podem ser investigados por difração de raios X. Planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, densidade de átomos ao longo de cada plano cristalino são características únicas de cada substância. As informações cristalográficas básicas são mantidas atualizadas pelo *International Center for Diffraction Data*, ICDD. Este banco é abastecido com dados referentes a mais de 70 mil compostos cristalinos. Para fins de identificação, as intensidades difratadas normalizadas e as distâncias interplanares para os diferentes planos (hkl) são as informações mais importantes (h , k e l são conhecidos como índices de Miller). A dificuldade na identificação aumenta progressivamente com a elevação do número de fases cristalinas presentes na amostra, devendo o experimentador buscar pelos elementos presentes em seu material até que todo o padrão do composto seja identificado. Hoje, com o auxílio de *softwares* como o *Jade* e o *Crystallographica* e técnicas de simulações com o uso de *MatLab*, a identificação de fases cristalinas de raios X se tornou mais facilitada. Também, considerando que o padrão do difratograma de um material cristalino é obtido a partir de sua estrutura cristalina, é possível determinar os parâmetros de seu retículo (a , b , c e α , β e γ da célula unitária), uma vez que se tenha as informações do sistema cristalino, grupo espacial, índices de Miller e respectivas distâncias interplanares dos picos difratados. Este procedimento pode ser efetuado por métodos manuais ou, mais facilmente, a partir de uma infinidade de *softwares* computacionais que permitem um rápido processamento para qualquer sistema cristalino, independente de sua complexidade.

Os dados de difração de raios X para nanopartículas coloidais foram coletados no Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais (LCCEM), coordenado pelo Prof. Dr. Fabio Furlan Ferreira, no Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) da Universidade Federal do ABC (UFABC). As medidas foram realizadas utilizando amostras coloidais com auxílio de capilar. Foi utilizado um difratômetro *STADI-P*, da marca *Stoe*, operando no modo de transmissão, utilizando radiação $\text{CuK}_{\alpha 1}$ ($1.54056 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV e corrente de 40 mA, equipado com monocromador de feixe primário (cristal curvo de Ge (111)), fenda de divergência de 0,5 mm e um detector *silicon strip* (Mythen 1K). As varreduras foram realizadas na faixa angular de 25 a 122.635° (2θ), com passo angular de 0.015° e tempo de integração de 120

segundos a cada 3.15° . Este difratômetro (Figura 2.14) foi obtido através de recursos de programa especial Jovens Pesquisadores em Centros Emergentes da FAPESP (proc. n°. 2008/10537-3), coordenado pelo Prof. Fabio Furlan Ferreira.

Figura 2.14: *Difratômetro de raios X por policristais, marca Stoe, modelo STADI-P, operando no modo de transmissão, com radiação monocromática (molibdênio). Figura obtida do site: <http://propes.ufabc.edu.br/cemsa/crbst_68.html>. Acesso em 03/07/2015.*

2.4.5 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta

O espalhamento de luz dinâmico (DLS), é uma técnica não invasiva e bem estabelecida de medição e distribuição do tamanho de moléculas e partículas, normalmente na região submicrométrica e com as tecnologias mais recentes, menores do que 1 nm. A técnica é aplicada na caracterização de partículas, emulsões e moléculas, que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido. O movimento browniano² das partículas em suspensão faz com que a onda eletromagnética seja espalhada com diferentes intensidades; por exemplo, um laser possui uma frequência conhecida, porém quando este incide sobre partículas em movimento, a luz é espalhada em uma frequência diferente (efeito Doppler). Assim, o tamanho das partículas é relacionado com a mudança na frequência da luz. Como as partículas menores se movimentam com uma velocidade média maior, há uma maior mudança na frequência, comparada a partículas maiores e é essa diferença que pode ser usada para compor um histograma de distribuição de tamanhos de uma amostra de partículas. A análise das flutuações na intensidade resulta

²Robert Brown foi um microbiologista que descobriu esse efeito enquanto observava objetos que acreditava serem organismos vivos por microscopia óptica. Mais tarde, foi descoberto que esses organismos eram, na verdade, partículas. O fenômeno foi melhor explicado por Einstein (1905), quando propôs que as partículas fossem constituída por energia. Este movimento aleatório dessas partículas no fluido foi denominado movimento browniano.

na velocidade do movimento browniano e, assim, o tamanho de partículas também pode ser determinado, usando a relação Stokes–Einstein ([Einstein, 1905](#)).

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t} \quad (2.4)$$

com D_h representando o diâmetro hidrodinâmico da nanopartícula D_t é o coeficiente de difusão, encontrado por DLS, k_B é constante de Boltzmann, T a temperatura e η é a viscosidade dinâmica.

O diâmetro hidrodinâmico, assim calculado, é normalmente superior ao diâmetro das partículas obtidos por outras técnicas (tais como microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X), devendo-se isto à esfera de solvatação que se encontra na superfície das partículas. Esta esfera de solvatação forma-se devido à presença de íons em solução que interagem eletrostaticamente com a partícula, formando uma camada em volta da mesma, como descrito anteriormente, que aumenta efetivamente o seu raio ([Dasary et al., 2010](#)).

Figura 2.15: Esquema representativo da camada de Stern, mostrando a relação dos diferentes potenciais em torno da partícula. Figura adaptada de [Jafarbeglou et al. \(2016\)](#).

Quando se estabiliza uma nanopartícula por adição de sais ao meio reacional onde ocorrerá a síntese, uma estrutura de duas camadas é formada sobre a superfície da partícula. Devido à presença da bicamada iônica, formada pela camada mais interna, denominada *camada de Stern* e pela camada mais externa, que é bem difusa, aparecem três potenciais nas fronteiras das camadas, denominados como: potencial de superfície, potencial de Stern e o potencial Zeta (Figura 2.15). Este último é um parâmetro de importância fundamental na estabilidade de partículas. Se o valor do potencial Zeta

é maior que + 30 mV ou menor que -30 mV, o coloide é, geralmente estável (Prathna et al., 2011). O p.H. das substâncias pode afetar diretamente o potencial Zeta. Numa suspensão coloidal com potencial Zeta negativo, pode-se aumentar o valor, adicionando uma base e tornando o meio mais alcalino. Igualmente, se a suspensão possui potencial Zeta positivo, pode-se diminuir o seu valor tornando o meio mais ácido. Assim sendo, manipular o valor do potencial Zeta é uma das maneiras mais adequadas de se estabilizar soluções. Para medir o potencial Zeta aplica-se um campo elétrico na amostra em estudo e mede-se a velocidade das partículas através de efeito doppler. Desta maneira, é possível o cálculo da mobilidade eletroforética das partículas (valor médio). Através de modelos para a partícula espalhadora, é possível o cálculo de seu potencial de superfície (potencial Zeta) .

Em experimentos de DLS a função de interesse é a função de autocorrelação temporal das flutuações da intensidade de espalhamento. Através dela é possível obter informações sobre distribuições de tamanho típicas do sistema. A função de autocorrelação é definida a partir da convolução da intensidade de espalhamento em um instante t pela intensidade de espalhamento em outro instante posterior ($t + t'$) (Pusey, 2002):

$$G^2(t) = \langle I(0)I(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T I(t').I(t' + t)dt', \quad (2.5)$$

sendo $G^2(t)$ definida como a função de autocorrelação de segunda ordem não normalizada, por envolver os quadrados dos campos elétricos. Pode-se demonstrar que, para sistemas monodispersos, a função de autocorrelação pode ser expressa como uma função de decaimento exponencial e de parâmetros experimentais (Pusey, 2002):

$$G^{(2)}(\tau) = B(1 + f e^{-2\Gamma_0 \tau}), \quad (2.6)$$

sendo B e f os parâmetros experimentais e Γ_0 é a constante de decaimento. A constante de decaimento é dada em função do módulo do vetor de espalhamento q , ($q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, sendo θ a metade do ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda da luz incidente) e da constante de difusão (D_0) pela relação $\Gamma_0 = \tau^{-1} = q^2 D_0$. Uma vez que a constante de difusão é determinada, o raio da partícula pode ser determinado através da equação de Stokes-Einstein³ (Pusey, 2002).

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_0}, \quad (2.7)$$

com k_B sendo a constante de Boltzmann, T a temperatura e η é a viscosidade dinâmica. A equação de Stokes–Einstein é deduzida para um sistema de esferas de raio R_0 . Assim,

³Essa equação é a mesma equação 2.4, com a diferença que aqui está sendo considerado o raio da partícula, R_0 . Utilizando a equação 2.4 para calcular o coeficiente de difusão, D_t , e fazendo $D_h = 2R_h$, obteremos a mesma equação 2.7.

R_0 é o raio da esfera associada, ou seja, o raio das esferas que compõem um sistema que produziria o mesmo coeficiente de difusão.

A extrapolação para um sistema polidisperso pode ser feita de modo direto. Vamos assumir que o sistema é composto por diversas partículas com diâmetros $R_1, R_2 \dots R_n$, nas frações parciais $A_1, A_2 \dots A_n$. Cada partícula contribuirá com constantes de decaimento $\Gamma_1, \Gamma_2 \dots \Gamma_n$. A função de autocorrelação de primeira ordem será dada pela soma de todas as contribuições:

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\sum A_i e^{-\Gamma_i \tau}}{\sum A_i}, \quad (2.8)$$

No limite de uma distribuição contínua de tamanhos, ou de constantes de decaimento, a equação 2.8 assume a forma:

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\int P_I(\Gamma) e^{-\Gamma \tau} d\Gamma}{\int P_I(\Gamma) d\Gamma} = \frac{\int P_V(\Gamma) V(R_i) e^{-\Gamma \tau} d\Gamma}{\int P_V(\Gamma) V(R_i) d\Gamma} = \frac{\int P_N(\Gamma) V(R_i)^2 e^{-\Gamma \tau} d\Gamma}{\int P_N(\Gamma) V(R_i)^2 d\Gamma}, \quad (2.9)$$

sendo $V(R)$ o volume, $P_I(\Gamma)$, $P_V(\Gamma)$ e $P_N(\Gamma)$ são as funções de distribuição de intensidade, volume e número respectivamente. Por inspeção temos que, $P_I(\Gamma) = P_V(\Gamma) V(R) = P_N(\Gamma) V^2(R)$. Em muitos casos as distribuições são normalizadas e os denominadores das equações 2.8 e 2.9 podem ser desprezados.

Existem diversas formas de análises que levam em conta formas particulares de distribuições. Em todos os casos, dada uma distribuição, calcula-se $g^{(1)}(\tau)$ e posteriormente $g^{(2)}(\tau)$ e $G^{(2)}(\tau)$. Isso permite o ajuste de dados experimentais obtidos por correladores. Um destes métodos é o método CONTIN, desenvolvido por Provencher (Provencher, 1982) que fornece a distribuição de tamanhos que melhor ajusta a curva de autocorrelação.

As medidas de DLS e potencial zeta foram realizadas em cubetas de plástico no Instituto de Química da USP, utilizando um equipamento *Zetasizer Nano S* (Malvern Instruments) com um laser de He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) de 4 mW e ângulo de detecção de 17 graus, utilizando uma célula de poliestireno com eletrodos metálicos revestidos em ouro (Figura 2.16). Na maioria dos equipamentos de DLS e potencial zeta, a luz da fonte de luz laser ilumina a amostra na célula. O sinal de luz dispersa é coletada com um dos dois detectores, seja em uma direção de 90 graus ou 173 graus. Para as análises, foram utilizados os dois tipos de nanopartículas, previamente sonicadas por 3 minutos, às quais foram introduzidas de maneira lenta na célula a fim de evitar a formação de bolhas de ar no interior desta, de tal forma que os eletrodos ficaram inteiramente imersos na suspensão. Em seguida, a célula foi fechada e colocada no interior do aparelho para realizar 3 medições para cada tipo de NP.

Figura 2.16: Analisador de tamanho de partículas Zetasizer Nano S, da Malvern Instruments. *Figura do autor.*

2.4.6 Espalhamento de Raios X a baixo ângulo

As medidas de SAXS foram feitas usando um equipamento *NanoStar – Bruker* otimizado com uma fonte e sistema ótico *Xenocs*. As amostras foram mantidas em um capilar de quartzo de diâmetro médio 1.5 mm. O intervalo efetivo do módulo do vetor momento de transferência, q , ($q = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, sendo θ a metade do ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda dos raios X), acessível experimentalmente, foi de $0.009 - 0.35 \text{ \AA}^{-1}$. As medidas foram feitas à temperatura ambiente com um detector bidimensional. As intensidades coletadas foram corrigidas usando o espalhamento de *background*, capilar vazio e transmissão da amostra, passando pela posterior normalização para escala absoluta usando como padrão a água (Oliveira, 2011). Para o tratamento dos dados utilizou-se o pacote SUPERSAXS⁴.

Uma curva teórica foi ajustada aos dados experimentais, de onde foi possível realizar o cálculo da distribuição de tamanhos das amostras. Para tal, um modelo que descreve a intensidade de espalhamento de esferas polidispersas foi aplicado (Zemb & Lindner, 2002; Oliveira et al., 2014a):

$$I(q)_{sph} = S_c \int_0^\infty D_N(R) V^2(R) P(q, R) dR, \quad (2.10)$$

sendo S_c o fator de escala global e $P(q, R) = F(q, R)^2$ é o fator de forma de uma esfera:

$$P(q) = F(q)^2 = \left[\frac{3[\sin(qR) - qR\cos(qR)]}{(qR)^3} \right]^2 \quad (2.11)$$

$D(R)$ é a função de distribuição de tamanhos de partículas de raio R e está relacionada

⁴Oliveira et al., *Program package for data treatment, analysis and modeling*. 2009.

à polidispersidade do sistema, dada pela distribuição de Schulz-Zimm ($D(R)$) através da relação:

$$D(x) = \left[\frac{z+1}{x_0} \right]^{z+1} \frac{x^z}{\Gamma(z+1)} \exp \left[-(z+1) \frac{x}{x_0} \right] \quad (2.12)$$

sendo x_0 o centro da distribuição e z está relacionado com a polidispersidade relativa σ_R/R dos raios pelo termo $z = 1/(\sigma_R/R)^2 - 1$. Esta função possui a vantagem de poder descrever distribuições assimétricas, o que é comum em sistemas de nanopartículas.

Para algumas amostras estudadas foi necessário inserir a contribuição de agregados de partículas no sistema. Para a descrição destes agregados pode-se utilizar um fator de estrutura com uma contribuição de aglomerado com raio de giro R_G , dado por (Oliveira et al., 2014b):

$$S(q)_{Gui} = 1 + S_{c1} \exp(-q^2 R_G^2 / 3) \quad (2.13)$$

Assim, teremos o modelo final dado por:

$$I(q)_{Tot} = S(q)_{Gui} I(q)_{sph} + back \quad (2.14)$$

Figura 2.17: Equipamento usado na realização dos experimentos de SAXS. O feixe de raios X é produzido na fonte, é colimado e incide na amostra, que está colocada em vácuo. O espalhamento do feixe pela amostra é coletado pelo detector. Figura adaptada de Oliveira (2016).

No caso da amostra AgNP Khemia® 56 $\mu\text{g}/\text{mL}$, utilizada exclusivamente nos experimentos de SAXS, produzida há 1 ano (data de execução do experimento), foi necessário adicionar um outro termo para um raio de giro adicional. Como veremos adiante, isso pode ser compreendido como tendo agregados com dois tamanhos característicos.

Outras metodologias de modelagem foram tentadas, mas esta abordagem mostrou-se bastante concisa e com um número pequeno de parâmetros.

2.5 Resultados e Discussões

A Figura 2.18 apresenta os espectros de absorção óptica para as partículas de prata Khemia[®] em comparação com nanopartículas de tamanho controlado (IQ-USP). O espectro em (C) pode ser entendido como uma boa referência para nanopartículas com tamanho controlado, em torno de 34 nm, recobertas com polímero (PVP) e lavadas, evidenciando moderada formação de agregados, produzidas no IQ-USP.

Figura 2.18: Espectros de absorção óptica das partículas de prata coloidal Khemia[®] (A) e (B). O espectro mostrado em (C) representa o espectro de referência para nanopartículas com tamanho controlado IQ-USP, em torno de 34 nm, recobertas com polímero PVP. A banda suave de absorção em torno de 407 nm é devida à ressonância de plasmon de superfície, fenômeno atribuído à oscilação coletiva dos elétrons livres, uma vez excitada por uma radiação ionizada. O espectro em (A) mostra que não há formação da banda de absorção característica das nanopartículas Khemia[®] antes do processo de sonicação. Isso pode significar que as partículas estão muito agregadas. O espectro em (B) mostra o surgimento da banda, com intensidade menor, aproximadamente na mesma região que (C), após o processo de sonicação por 3 min e destaca o deslocamento da banda para a região do infravermelho. *Figura do autor.*

As bandas suaves de absorção em torno de 407 nm e 415 nm – região do azul, no espectro eletromagnético – são devidas à ressonância de plasmon de superfície, fenômeno atribuído à presença de elétrons livres nas nanopartículas metálicas e concordam com valores obtidos pela mesma técnica, presentes na literatura (Wan et al., 2016). Na-

nopartículas produzidas pelo método eletrolítico tendem a se agregar com o passar do tempo, pois não existe substância que passive as mesmas, estabilizando-as por repulsão eletrônica. Em medidas de absorção óptica, anteriores à obtenção dos espectros, a banda RPSL não foi identificada para nanopartículas Khemia[®]. Dessa forma, optou-se pelo processo de sonicação, um procedimento que utiliza a energia das ondas sonoras, mais comumente o ultra-som, aplicado sobre determinados sistemas químicos e muito comumente usado para desagregar nanopartículas.

O espectro em (A) representa a amostra AgNP Khemia[®] antes do processo de sonicação, o que possivelmente indica que as partículas estão muito agregadas e o tamanho dos aglomerados são maiores do que 100 nm. O espectro em (B) mostra o surgimento da banda, com intensidade menor, com pico suave em 415 nm aproximadamente na mesma região que (C), após o processo de sonicação por 3 min. A menor intensidade dessa banda pode estar associada à agregação das nanopartículas. De fato, mesmo após a sonicação, nota-se o início do deslocamento da banda para a região do infravermelho (*redshift*), que pode corroborar esta hipótese (Liu et al., 1998). A agregação evidenciada em (C) é decorrente das sucessivas lavagens das AgNPs para retirada do etilenoglicol, que é um elemento tóxico para estudos utilizando células animais. As lavagens retiram parte da camada polimérica, o que contribui para a agregação.

Uma teoria que apresenta o estudo de fenômenos de agregação é a teoria que envolve o amadurecimento de Ostwald (*Ostwald ripening*) (Ratke & Voorhees, 2013). De forma resumida, o aparecimento de espalhamento de partículas em determinada matriz provoca o aumento da energia do sistema, o que pode ser um fenômeno devido à absorção ressonante. Átomos que estão em maior profundidade na estrutura apresentam estado de energia diferente daqueles que estão na superfície, devido à interrupção na periodicidade no arranjo estrutural da rede. Logo, essas partículas não crescerão e tenderão a coalescer, apresentando como consequência uma diminuição na energia livre global do sistema (Ratke & Voorhees, 2013).

Igualmente, a teoria de Mie estuda esse processo de agregação das AgNPs, considerando o aumento do tamanho das nanopartículas devido aos dímeros e trímeros que as compõem, implicando na não validade do regime dipolar e surgindo a ressonância quadrupolar, a qual introduz fenômenos de não-linearidade óptica (Hao & Schatz, 2004; Atay et al., 2004).

A Figura 2.19 apresenta as micrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão para os dois tipos de nanopartículas que estamos estudando. O contraste claro-escuro das micrografias, obtidas com altíssima resolução, evidencia a natureza policristalina dos materiais. O tamanho médio das NPs, obtidos por essa técnica são muito distintos, sendo possível distinguir partículas envoltas em manchas com tonalidade de cinza mais claro, que serão explicados mais adiante por EDS.

Figura 2.19: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando morfologia e tamanho. (A) nanopartículas de prata IQ-USP. (B) nanopartículas de prata Khemia[®]. *Figura do autor.*

Histogramas foram construídos para obter o tamanho médio das nanopartículas e são mostrados na Figura 2.20.

Figura 2.20: Histogramas de distribuição de tamanho de nanopartículas para: (A) nanopartículas de prata IQ-USP e (B) nanopartículas de prata Khemia[®]. As linhas em azul representam ajustes gaussianos. *Figura do autor.*

As imagens de microscopia foram tratadas com o auxílio do *software Image J*. Esse *software* possui diversos *plugins*, com os quais, uma infinidade de trabalhos diferentes podem ser executados. Ele possui um *plugin* para análise de tamanho de partículas que não apresentem agregação, mas antes as imagens devem ser binarizadas. Como as NPs estão agregadas, as informações de contorno de borda seriam facilmente perdidas. No entanto, foi possível utilizar outro método no mesmo *software* para analisarmos o tamanho das partículas. Inicialmente se faz uma calibração da imagem, convertendo os valores de pixels em valores de nanômetro, utilizando como referência a barra de escala

fornecida pelo equipamento de MET. Após isso, traça-se manualmente uma reta sobre cada diâmetro, automaticamente marcando as partículas. O *software* fornece como resultado dessa marcação diversos parâmetros, no entanto, aqui só utilizamos o diâmetro como variável para definir tamanho de partícula. Para cada tipo de AgNP, mais de 200 contagens foram feitas, utilizando várias micrografias. Esse número não é ideal. Um bom histograma pode ser construído com mais de 1000 dados de entrada, porém não tínhamos esse número e o valor que obtivemos pode ser considerado representativo para os tamanhos das partículas. Os histogramas mostraram uma distribuição larga de tamanho para ambas as nanopartículas. Os ajustes se mostraram adequados, com bom coeficiente de correlação dos dados.

A equação de ajuste das curvas gaussianas que foi utilizada para ajustar os histogramas é dada por:

$$y = y_0 + \frac{A}{\omega \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp \left[-2 \left[\frac{(x - x_c)}{\omega} \right]^2 \right] \quad (2.15)$$

sendo:

y_0 o desvio da linha de base;

x_c o centro do pico da curva gaussiana;

ω é igual a 2 vezes o desvio padrão da distribuição gaussiana (2σ) ou cerca de 0.849 a largura do pico a meia-altura (FWHM);

A é a área sob o pico.

O tamanho médio das nanopartículas, obtido por parâmetros dos ajustes gaussianos realizados, com coeficiente de correlação, R^2 , superior a 0.95 para ambos os ajustes foram: AgNPs IQ-USP, $\langle D \rangle = (30.9 \pm 8.2)$ nm e índice de polidispersividade de 0.26 e para AgNPs Khemia[®], $\langle D \rangle = (15.2 \pm 5.9)$ nm e índice de polidispersividade de 0.38. Na prática, quanto maior o índice de polidispersividade, mais larga é a distribuição de tamanhos das NPs. O índice de polidispersividade (IP) foi calculado com a equação:

$$IP = \frac{\langle D^2 \rangle}{\langle D \rangle^2} \quad (2.16)$$

sendo $\langle D^2 \rangle$ o valor médio dos quadrados dos diâmetros medidos e $\langle D \rangle^2$ o quadrado da média aritmética dos diâmetros medidos.

Apesar da notável presença de agregação, a maioria das nanopartículas de prata IQ-USP possui um contorno definido. Essa agregação ocorreu, como já comentado anteriormente, mas apenas reforçando a hipótese, pelo fato do solvente dessas nanopartículas ser citotóxico, sendo necessário efetuar sucessivas lavagens com água destilada e centrifugações para poder remover essa substância das NPs. Isto, eventualmente pode ter contribuído para a retirada de parte da camada polimérica que recobria as NPs.

EDS realizados em regiões distintas das amostras (Figuras 2.21 e 2.22), mostraram o aparecimento de enxofre e silício, sugerindo a formação de sulfeto de prata. Embora, sejam distintas, levando em consideração as análises TEM, as nanopartículas possuem formas regulares (aproximadamente esféricas), mas tamanhos distintos.

Figura 2.21: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando as áreas onde foram feitas as análises de EDS. (A) nanopartículas de prata IQ-USP. (B) nanopartículas de prata Khemia[®]. *Figura do autor.*

As análises de EDS detectaram, como esperado, uma maior quantidade de prata nas amostras, dependendo da região analisada. Foi encontrada uma pequena quantidade de enxofre em ambos os tipos de nanopartículas, sugerindo a formação de sulfeto de prata. Também, nas AgNPs IQ-USP foi detectado carbono, e muito provavelmente está relacionado ao revestimento polimérico dessas nanopartículas. Além disso, nas AgNPs Khemia[®] foi detectado oxigênio, nitrogênio e silício, além do enxofre e carbono, sugerindo, possivelmente a formação de óxidos e carbonatos de prata. Estes elementos podem ser encarados como uma pequena contaminação das amostras, que ocorre devido Ag ser muito reativa. Eles podem estar presentes no ar, devido à poluição e contaminarem as amostras durante a secagem das NPs no preparo das telas para medidas de microscopia, na água em que se é lavada as vidrarias de laboratório ou mesmo no ambiente laboratorial em que essas NPs são produzidas, onde também são produzidos outros tipos de nanopartículas. Contudo, a formação de óxido de prata e sais não apresentam RPSL (Tulve et al., 2015), assim, as bandas RPSL que obtivemos mostradas na Figura 2.18 são indício significativo para sugerirmos que as amostras se constituem em grande parte e efetivamente de nanopartículas de prata.

Todas essas espécies formadas podem eventualmente contribuir para a agregação dessas nanopartículas, modificando as cargas e, conseqüentemente, a natureza interativa da força iônica, que são responsáveis por esse fenômeno de agregação (de Oliveira & Cardoso, 2013). No entanto, a técnica de microscopia eletrônica de transmissão deve ser encarada e estudada com alguns cuidados. Embora seja bastante comum vários autores

Figura 2.22: Espectros de EDS para diversas regiões apresentadas nas micrografias de TEM. Esquerda (A, B e C): nanopartículas de prata IQ-USP. Direita (D, E, F): nanopartículas de prata Khemia® Observe a correspondência das medidas com as regiões indicadas na Figura 2.21. *Figura do autor.*

caracterizarem diversos tipos de nanopartículas com relação ao tamanho, utilizando apenas microscopia eletrônica de transmissão, tal medida só seria aplicável para os coloides puros, os quais não contêm metais iônicos (cátions). Como é difícil obter um coloide de prata com 100% de pureza e estabilidade, as partículas descritas em tais

imagens não representam as partículas em solução. As partículas de óxido de prata mostradas nas imagens, bem como outras variações, podem não estar presentes na solução original, mas são criadas durante a preparação das amostras. Para utilizar a técnica TEM, toda a água presente na amostra deve ser evaporada antes, então, quando isto acontece, quaisquer íons de prata (cátions) presentes na amostra vão combinar com os ânions e podem formar compostos de prata, dentre eles, o óxido de prata (Ag_2O). Uma vez que o número de partículas de óxido de prata é maior do que os de nanopartículas de prata atômica Ag^0 , são partículas compostas por óxido de prata que podem predominar nas imagens de TEM.

O ânion mais comum presente em uma solução coloidal de prata é o hidróxido. Logo, o composto assim formado será o hidróxido de prata, que é instável e reduz a óxido de prata e hidrogênio, sendo que o composto final é óxido de prata (Wang et al., 2005). O processo pode ter início com um único íon de prata forçado a se combinar com um único ânion que forma um único cristal do composto. Esse cristal não terá carga iônica, portanto, não estará sujeito à nenhuma força de repulsão. A falta de repulsão eletrostática fará com que os cristais sejam atraídos um para o outro, por força de van der Waals de natureza atrativa, o que pode fazer com que eles se agreguem e formem pequenas partículas do composto.

Soluções de prata iônica consistem, em maior parte, de prata iônica e uma quantidade reduzida de Ag^0 ; isso significa que, para cada nanopartícula de prata presente na amostra, existem milhares de partículas em outros estados de oxidação. Além disso, a qualidade de imagem de microscopia de transmissão dependerá da maneira como a amostra é preparada pelo experimentador. O feixe de elétrons também interage com a amostra e, por vezes, é possível ver as partículas coalescendo durante a medida.

Os difratogramas de raios X obtidos para as nanopartículas que estão sendo estudadas são apresentados na Figura 2.23. É interessante determinar alguns parâmetros decorrente da análise de difratogramas para as estruturas cúbicas, como o parâmetro de rede e a distância interplanar. Pela Lei de Bragg (Equação 2.17), pode-se determinar a distância interplanar (Bykkam et al., 2015):

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta, \quad (2.17)$$

sendo:

d_{hkl} a distância interplanar; θ o ângulo de Bragg; λ o comprimento de onda dos raios X.

O parâmetro de rede, a , se relaciona com a distância interplanar pela equação:

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (2.18)$$

Figura 2.23: Difratoograma de raios X para nanopartículas de prata. (A) DRX para nanopartículas de prata IQ-USP. (B) DRX para nanopartículas de prata Khemia®. Os respectivos planos de difração correspondentes aos picos difratados estão indicados. *Figura do autor.*

Utilizando a equação de Scherrer (Equação 2.19), determinamos o tamanho do cristalito através da análise dos picos dos difratogramas de raios X (Monshi et al., 2012).

$$G_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta_{hkl} \cos \theta} , \quad (2.19)$$

sendo:

G_{hkl} o tamanho médio dos domínios (cristalitos) ordenados, que podem ser menores ou iguais ao tamanho do grão;

K é um fator de forma adimensional, com um valor próximo da unidade. O fator de forma tem um valor típico de cerca de 0.9, mas varia com a forma real do cristalito;

λ o comprimento de onda dos raios X;

β_{hkl} a largura do pico a metade da altura (FWHM), depois de subtrair o alargamento da linha instrumental, e deve ser calculado em radianos. Esta quantidade também é, às vezes, denotada como $\Delta(2\theta)$ e

θ o ângulo de Bragg, em radianos.

Figura 2.24: Esquema mostrando o tamanho que é obtido por microscopia eletrônica de transmissão e tamanho obtido por análise do pico de difração. No caso de sistemas monocristalinos, o tamanho do cristalito e o da partícula são os mesmos. Figura adaptada de [Akbari et al. \(2011\)](#).

A Figura 2.25 apresenta uma curva gaussiana ajustada sobre o difratograma da AgNP IQ-USP para a determinação de FWHM e possibilitar o cálculo do tamanho do cristalito. O mesmo ajuste não pôde ser efetuado para as AgNPs Khemia® devido ao ruído e à baixa intensidade dos picos de difração, que acarreta na não convergência das gaussianas. Assim sendo, o tamanho do cristalito só será apresentado para nanopartículas IQ-USP. O cálculo do tamanho do cristalito para sistemas policristalinos fornece apenas uma noção simples da dimensão da nanopartícula, quando comparado com medidas de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 2.24), não sendo realmente aplicável para todos os sistemas com tamanho nanométrico e também não podendo ser utilizado para calcular tamanho de grãos superior a 100 nm.

Figura 2.25: Ajuste gaussiano dos picos de difração para nanopartículas IQ-USP para determinação de FWHM. Ajuste realizado com o software OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation). *Figura do autor.*

Tabela 2.3: Parâmetros decorrentes da análise de difratogramas de AgNPs IQ-USP para estrutura cúbica de face centrada (FCC) e determinação do tamanho do cristalito. A distância interplanar, d_{hkl} , utilizada para o cálculo de a , $a = 4.0862 \text{ \AA}$, foi determinada pela Equação 2.17.

(hkl)	2θ (graus)	θ (graus)	d_{hkl} (Å)	G_{hkl} (nm)
(111)	38.11	19.06	2.359	15.71
(200)	44.30	22.15	2.043	8.18
(220)	64.44	32.22	1.445	12.87
(311)	77.40	38.70	1.232	11.06
(222)	81.53	40.77	1.180	10.48

Observando a Figura 2.25, percebemos que diferentes ângulos de difração forneceram diferentes FWHMs, devido o cristal não ser esférico. Isso é dedutível, uma vez que o número de planos de rede que contribuem para a difração determina a largura dos picos difratados. Em materiais nanocristalinos, o resultado do tamanho de cristalito calculado por DRX via Equação 2.19 geralmente é menor do que o tamanho das partículas, obtidas por TEM. Nesses materiais, o termo *grão* é usado de forma similar a cristalito para se referir às regiões mais simples e monocristalinas separadas por limites de grãos. Cada cristalito é ele próprio um “único cristal” e, no caso de nanopartículas, dependendo das condições de preparação, podem ter estrutura policristalina ou monocristalina (Nalwa, 1999). Na verdade, à medida que o tamanho do cristalito se aproxima do tamanho da partícula, teremos um único cristal. Os planos atômicos de um cristalito podem ser investigados usando microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM).

Os valores de potencial zeta obtidos para as nanopartículas Khemia® e IQ-USP ficaram na faixa de -16.5 a -19.8 mV e -30.9 a -57.1 mV, respectivamente. Esse comportamento, de forma inequívoca, sugere a presença de fortes cargas elétricas na superfície das partículas, impedindo a aglomeração por repulsão eletrostática (Agnihotri et al., 2014). A estabilidade da solução pode ser verificada quando o valor de potencial zeta é inferior a -30 mV ou superior a + 30 mV (Prathna et al., 2011). Neste caso, as nanopartículas IQ-USP podem ser consideradas estáveis (desde que não seja necessário lavá-las. Em caso de lavagem, a estabilidade é comprometida, dependendo do intervalo de tempo entre as lavagens e a realização das medidas de potencial zeta), enquanto as AgNPs Khemia® exibem tendência à agregação, que pode ocorrer devido às colisões frequentes de partículas vizinhas, sugerindo que a estabilidade coloidal dessas nanopartículas tende a diminuir com o tempo de armazenamento, sendo não recomendável a realização de medidas em lotes de nanopartículas produzidas por quaisquer processo e armazenadas há mais de 1 ano.

Com relação aos experimentos de DLS, a partir das curvas de autocorrelação obtidas experimentalmente, foram calculadas as distribuições de tamanho com respeito ao número, volume e intensidade das partículas. A Tabela 2.4 apresenta as amostras de nanopartículas que foram estudadas nos experimentos de DLS, mostrando as distribuições de número e tamanho médio. As amostras A1, A2 e A3 são do mesmo lote de nanopartículas Khemia[®] e as amostras B1, B2 e B3 são do mesmo lote de nanopartículas IQ-USP. Todas as medidas de DLS foram obtidas no mesmo dia, após processo de sonicação das amostras que se encontravam armazenadas e protegidas da luz e, no caso das nanopartículas IQ-USP, também lavadas.

Tabela 2.4: *Experimento de DLS. Descrição das amostras estudadas no experimento de DLS, mostrando a distribuições de número e tamanho médio.*

Amostra	Fornecedor	Tamanho indicado por microscopia (nm)	Diâmetro médio – DLS (nm)	Proporção – DLS (%)
A1	Khemia [®]	15.2 ± 5.9	88 ± 20	100
A2		15.2 ± 5.9	92 ± 21	90
A3		15.2 ± 5.9	62 ± 23	100
B1	IQ-USP	30.9 ± 8.2	14 ± 3	73
			48 ± 13	27
B2	IQ-USP	30.9 ± 8.2	7 ± 1	82
			40 ± 4	18
B3	IQ-USP	30.9 ± 8.2	11 ± 4	78
			43 ± 9	22

As amostras A1 e A3 (Khemia[®]) (Figuras 2.26 e 2.28, respectivamente) apresentaram distribuições de número monomodal. Já as amostras B1, B2 e B3 (IQ-USP) (Figuras 2.29, 2.30 e 2.31, respectivamente) demonstraram distribuições bimodais. Os diâmetros médios das distribuições variaram de 40 a 48 nm para estas amostras. O ângulo de medição utilizado nos experimentos foi 90°, pois a detecção neste ângulo fornece um melhor equilíbrio entre partículas com tamanhos menores (< 50 nm) e maiores (> 100 nm). Este detalhe faz toda diferença em medidas de sistemas polidispersos. Se as nanopartículas forem monodispersas, o ângulo de medição não é relevante. Antes de efetuar as medidas de DLS, as amostras foram diluídas em água, o solvente utilizado para preservar as AgNPs. Em amostras com uma concentração muito alta de nanopartículas, os resultados obtidos são muito imprecisos, devido ao espalhamento múltiplo, que é uma das fontes de erro nos experimentos de DLS.

Figura 2.26: Experimento de DLS. Amostra A1 Khemia® – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade. *Figura do autor.*

Figura 2.27: Experimento de DLS. Amostra A2 Khemia® – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade. *Figura do autor.*

Figura 2.28: Experimento de DLS. Amostra A3 Khemia® – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade. *Figura do autor.*

A amostra A2 (Figura 2.27) apresentou uma distribuição de número secundária menos pronunciada evidenciada pelo “ombro” na curva em aproximadamente 45 nm, podendo indicar partículas com dois tamanhos característicos e com frações de número de partículas similares. Os resultados indicaram que as amostras AgNPs Khemia® (A1, A2 e A3, Figuras 2.26, 2.27 e 2.28, respectivamente) formam agregados de grandes dimensões. As diferenças entre os tamanhos obtidos por TEM e DLS são provavelmente consequência do fato de as amostras em solução terem agregado ao longo do tempo.

Para o caso de distribuições bimodais, é possível estimar a contribuição percentual de cada distribuição. As estimativas foram feitas utilizando-se as curvas de distribuição de número da seguinte forma: a curva de distribuição de número da amostra B1 (Figura 2.29), por exemplo, apresenta dois picos, sendo cada um referente à duas distribuições distintas. A proporção do total de partículas correspondente à distribuição referente ao pico esquerdo (centrado em 14 nm), por exemplo, foi determinada calculando-se a razão entre a área desse pico e a área total da curva e multiplicando-se por cem. Esta abordagem foi utilizada para os dados de DLS obtidos nas amostras B1, B2 e B3 (Figuras 2.29, 2.30 e 2.31, respectivamente).

Os dados indicam que a distribuição dominante para as amostras IQ-USP é sempre para raios menores, variando entre 73 a 82% na fração de distribuição de número de partículas. Isto sugere que temos uma fração de partículas menores que provavelmente se agregam, formando aglomerados com maiores dimensões. As medidas foram efetuadas em AgNPs IQ-USP lavadas há 15 dias, estocadas num intervalo de 8 meses, o que sugere a rápida agregação das nanopartículas após a eventual remoção da camada de PVP pelas sucessivas lavagens para eliminação do etilenoglicol. Os dados de DLS das amostras das NPs IQ-USP (B1, B2 e B3, Figuras 2.29, 2.30 e 2.31, respectivamente) forneceram resultados interessantes; como indicado pelas distribuições obtidas, sempre temos uma fração dominante entre 7 e 14 nm de diâmetro; e frações menores para diâmetros maiores. Essa diferença entre os tamanhos se deve, possivelmente, à sonicação das amostras, antes da realização dos experimentos, para promover a desagregação, uma vez que já estavam lavadas. A desagregação, possivelmente, não se deu de maneira uniforme, acarretando o surgimento de partículas menores e maiores.

A excelente vantagem do uso de DLS para caracterização de nanopartículas, consiste na possibilidade de investigar a dispersibilidade dos dados e, em posse destes, calcular a média de um grande conjunto de partículas contidas em um determinado volume examinado. Por ser uma técnica não perturbativa, é possível determinar funções de distribuição de tamanho sem necessitar conhecer informações a respeito das propriedades ópticas das partículas. Contudo, a técnica de DLS, quando se presta a analisar nanopartículas de prata, apresenta diversos problemas que devem ser levados em consideração a fim de serem minimizados, antes e durante a realização das medidas.

O primeiro problema, como já mencionado, tem a ver com a concentração da amostra e ao espalhamento múltiplo, que acarreta erro no diâmetro reportado, que tende a ser maior quanto maior a concentração. Outro problema diz respeito ao cálculo do diâmetro hidrodinâmico, utilizando a equação de Stokes-Einstein (Einstein, 1905) experimentalmente. Conforme discutido na página 58 deste trabalho, a presença de íons interage de maneira eletrostática com as NPs e formam uma camada em torno dela, que aumenta seu raio, interferindo na qualidade e veracidade da medida.

Khlebtsov & Khlebtsov (2011) observaram que o maior problema do uso da técnica DLS é a confiança do resultado e a necessidade de que sejam fornecidas estatísticas que não distorçam o tamanho real das NPs. Em seus estudos com nanopartículas de ouro, os autores concluíram que medidas de DLS de NPs não esféricas com tamanhos maiores do que 30 – 40 nm resultam no aparecimento de um falso pico em uma faixa de tamanho de cerca de 5 – 10 nm, gerando uma incompatibilidade entre os dados de TEM e DLS. O estudo demonstrou ainda que a largura da distribuição DLS não corresponde aos dados de microscopia eletrônica de transmissão e é superestimada.

No caso de nanopartículas de prata, a comparação entre dados de TEM e DLS ainda encontra um problema adicional, que decorre necessariamente da preparação de amostras de TEM, conforme discussão iniciada no fim da página 67 até a página 69 desta tese, que envolve, durante a secagem, o crescimento das partículas e distorção em suas formas e tamanhos. Este problema ocorre com as nanopartículas de prata devido à alta reatividade delas; com as nanopartículas de ouro, os dados obtidos por TEM são mais fidedignos, enquanto os dados de DLS devem ser investigados com mais cuidado, devido aos fenômenos de agregação.

Figura 2.29: Experimento de DLS. Amostra B1 IQ-USP – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade. *Figura do autor.*

Figura 2.30: Experimento de DLS. Amostra B2 IQ-USP – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade. *Figura do autor.*

Figura 2.31: Experimento de DLS. Amostra B3 IQ-USP – Curvas de (A) correlação e (B) distribuições de número, volume e intensidade. *Figura do autor.*

Nas figuras 2.32 (A), 2.33 (A) e 2.34 (A) são mostrados os dados experimentais de SAXS (círculos abertos). Vemos que as amostras estudadas forneceram uma boa intensidade de espalhamento. Em conjunto com os dados experimentais é colocado um ajuste, utilizando o modelo teórico indicado na Seção 2.4.6. As amostras estudadas foram as seguintes:

Tabela 2.5: Experimento de SAXS. Descrição das amostras estudadas.

Amostra	Fornecedor	Concentração
C1.	Khemia [®]	56 $\mu\text{g/ml}$
C2.	Khemia [®]	66 $\mu\text{g/ml}$
C3.	IQ-USP	360 $\mu\text{g/ml}$

Nas figuras 2.32 (B), 2.33 (B) e 2.34 (B) são mostradas as distribuições de tamanhos obtidas com o ajuste dos dados experimentais. Os resultados obtidos dos ajustes são mostrados na Tabela 2.6. Nesta tabela temos o raio médio da distribuição (R), a polidispersidade de tamanhos (σ_R), o raio de giro dos agregados (R_G), o *background* constante (BACK) e os fatores de escala correspondentes, como indicado nas equações mostradas na Seção 2.4.6.

Tabela 2.6: Experimento de SAXS. Dados obtidos através do ajuste do modelo.

Amostra	S_c	R (Å)	σ_R	R_G (Å)	$S_c R_g$	BACK
C1.	$(44 \pm 1) \cdot 10^{-3}$	20.0 ± 0.8	2.7 ± 0.6	$R_{G1} = 218 \pm 14$ $R_{G2} = 95 \pm 4$	$S_c R_{q1} = 10 \pm 2$ $S_c R_{q2} = 6.8 \pm 0.9$	$(20.0 \pm 0.8) \cdot 10^{-4}$
C2.	$(28 \pm 4) \cdot 10^{-2}$	40 ± 23	29 ± 1	260 ± 8	42 ± 6	$(88 \pm 5) \cdot 10^{-5}$
C3.	74 ± 2	138 ± 1	33.0 ± 0.3	—	—	$(174 \pm 7) \cdot 10^{-5}$

Figura 2.32: Experimento de SAXS. Curvas da (A) intensidade de espalhamento em função do módulo do vetor “ q ” e (B) distribuição de tamanhos da amostra C1. *Figura do autor.*

Figura 2.33: Experimento de SAXS. Curvas da (A) intensidade de espalhamento em função do módulo do vetor “ q ” e (B) distribuição de tamanhos da amostra C2. *Figura do autor.*

Figura 2.34: Experimento de SAXS. Curvas da (A) intensidade de espalhamento em função do módulo do vetor “ q ” e (B) distribuição de tamanhos da amostra C3. *Figura do autor.*

Os dados indicam que a amostra C3 (IQ-USP) possui um tamanho médio de partículas maior que as demais (Khemia)[®]. Além disso, ao contrário dos experimentos de DLS, esta amostra não apresentou a formação de agregados (ao menos nos tamanhos acessíveis à técnica de SAXS), não sendo necessário neste caso incluir o fator de estrutura adicional. A amostra C1 (Khemia)[®] possui a menor polidispersidade no raio, mas, por outro lado, apresentou a formação de agregados de dois tamanhos característicos. A formação de agregados para as amostras Khemia[®] era esperada, uma vez que estas amostras não possuem nenhum tipo de estabilização. As amostras das NPs IQ-USP, por outro lado, são recobertas com PVP, que gera estabilização estérica (Jones, 2002) e, embora pertençam ao mesmo lote de nanopartículas usadas nos experimentos de DLS e TEM, foram lavadas na semana de realização do experimento, enquanto que as NPs IQ-USP utilizadas nos experimentos de DLS foram lavadas há mais tempo. Isto, eventualmente, pode ter contribuído para o fato dessas NPs não terem apresentado agregação nos experimentos de SAXS. Contudo, quando se resolve comparar estes resultados de SAXS com os resultados fornecidos por outras técnicas, tais como DLS e microscopia de transmissão, existem ainda todas as questões levantadas anteriormente à respeito destas técnicas e de seus usos em nanopartículas de prata, que devem ser levadas em consideração.

As amostras Khemia[®] possuem partículas com distribuições centradas em raios menores do que a amostra do IQ-USP. A amostra C2 (Khemia[®]) possui um raio central de 40 Å e grande polidispersidade (29 Å), ou seja, polidispersidade relativa de 72%, o que faz com que a distribuição se desloque até valores de ~ 160 Å (Figura 2.33 B). Além disso, agregados com grandes tamanhos foram observados ($R_G \sim 260$ Å). Os dados obtidos demonstram que a abordagem utilizando técnica de SAXS é capaz de descrever as partículas do sistema, indicar a polidispersidade de tamanhos bem como fornecer informações sobre os agregados formados. Como a técnica de SAXS fornece

informações para sistemas com tamanho característico de 10 a 1000 Å, os dados obtidos complementam os resultados de experimentos de microscopia e DLS (Oliveira, 2011).

A Tabela 2.7 compara os valores obtidos através dos dados de SAXS, TEM e DLS:

Tabela 2.7: Comparação dos dados obtidos por SAXS, TEM e DLS.

Amostra	R (Å)	σ_R	RG (Å)	TEM (raio) (Å)	DLS (raio) (Å)
C1.	20.0 ± 0.8	2.7 ± 0.6	$RG_1 = 218 \pm 14$ $RG_2 = 95 \pm 4$	–	–
C2.	40 ± 23	29 ± 1	260 ± 8	75 ± 30	400 ± 75
C3.	138 ± 1	33.0 ± 0.3	–	155 ± 45	55 ± 10 215 ± 25

Quando se analisa os resultados da amostra C3 (IQ-USP) na Tabela 2.7, observa-se que os dados de SAXS ($R = (13.8 \pm 0.1)$ nm $\iff D = (27.6 \pm 0.2)$ nm) fornecem resultados que são, de certa maneira, comparáveis aos dados de TEM ($D = (30.9 \pm 8.2)$ nm, conforme Tabela 2.4) e apresentam valores menores em comparação com os diâmetros maiores de DLS (ver Tabela 2.4).

Os dados de SAXS da amostra C2 (Khemia®) ($R = 40$ Å, $\sigma = 29$ Å, $R_G = 260$ Å) fornecem raio não comparável ao dado obtido por TEM ((75 ± 30) Å, conforme Tabela 2.7). Para esta amostra o agregado formado possui raio de giro de 260 Å e, se assumirmos que este agregado possui forma esférica ($R = \sqrt{5/3}R_G$), correspondem à geometria esférica de raio de ~ 336 Å, o que ainda é um resultado menor, comparado ao raio hidrodinâmico, obtido via DLS.

A amostra C1⁵, em uma concentração $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ menor que a amostra C2, apresentou raio menor, sendo informados dois valores para o raio de giro.

Considerando que estas discrepâncias decorrem das diferentes resoluções e limitações das técnicas utilizadas, bem como do comportamento e reatividade das nanopartículas de prata em solução e, principalmente, do tempo em que se realizam as medidas, pode-se afirmar que os dados são complementares. Os dados de SAXS evidenciaram mais detalhadamente a agregação, e com resultados mais confiáveis do que a técnica de DLS⁶, fornecendo conhecimentos adicionais e extremamente pertinentes para os sistemas estudados. Esses dados são informações sobre médias realizadas de um grande número de partículas compreendidas em um grande intervalo de escalas de tamanho.

⁵Não foram realizadas medidas de TEM ou DLS para esta amostra. Ela foi apenas inserida nos experimentos de SAXS para conhecermos os efeitos de tamanho em NPs armazenadas há 1 ano. O efeito de agregação ficou evidenciado. A concentração também parece interferir nos resultados de tamanho. Esta amostra também não participa de nenhum outro experimento realizado nesta tese.

⁶Observe a discussão sobre as possíveis inconsistências presentes nos resultados de DLS para nanopartículas de prata, que se inicia no final da página 75 desta tese e vai até a página 76.

Referências

- Abid, J.-P., Wark, A., Brevet, P.-F., & Girault, H. (2002). Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation. *Chemical Communications*, 7(7), 792–793. DOI: [10.1039/B200272H](https://doi.org/10.1039/B200272H).
- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), 3974–3983. DOI: [10.1039/C3RA44507K](https://doi.org/10.1039/C3RA44507K).
- Ahmad, N., Sharma, S., Singh, V., Shamsi, S., Fatma, A., & Mehta, B. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles from desmodium triflorum: a novel approach towards weed utilization. *Biotechnology research international*, 2011. DOI: [10.4061/2011/454090](https://doi.org/10.4061/2011/454090).
- Akbari, B., Tavandashti, M. P., & Zandrahimi, M. (2011). Particle size characterization of nanoparticles—a practical approach. *Iranian Journal of Materials Science and Engineering*, 8(2), 48–56.
- Albers, I. (1816). Observations on a change of colour in the skin, produced by the internal use of the nitrate of silver. *Medico-chirurgical transactions*, 7, 284.
- Atay, T., Song, J.-H., & Nurmikko, A. V. (2004). Strongly interacting plasmon nanoparticle pairs: from dipole-dipole interaction to conductively coupled regime. *Nano Letters*, 4(9), 1627–1631. DOI: [10.1021/nl049215n](https://doi.org/10.1021/nl049215n).
- Bailar, J. C. (1944). The oxidation states of silver. *Journal of Chemical Education*, 21(11), 523. DOI: [10.1021/ed021p523](https://doi.org/10.1021/ed021p523).
- Bar, H., Bhui, D. K., Sahoo, G. P., Sarkar, P., De, S. P., & Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using latex of jatropha curcas. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 339(1), 134–139. DOI: [10.1016/j.colsurfa.2009.02.008](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.02.008).
- Basavaraja, S., Balaji, S., Lagashetty, A., Rajasab, A., & Venkataraman, A. (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus fusarium semitectum. *Materials Research Bulletin*, 43(5), 1164–1170. DOI: [10.1016/j.materresbull.2007.06.020](https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2007.06.020).
- Behra, R., Sigg, L., Clift, M. J., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2013). Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(87), 20130396.
- Bhainsa, K. C. & D'souza, S. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus aspergillus fumigatus. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 47(2), 160–164. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2005.11.026](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.11.026).
- Bykkam, S., Ahmadipour, M., Narisngam, S., Kalagadda, V. R., & Chidurala, S. C. (2015). Extensive studies on x-ray diffraction of green synthesized silver nanoparticles. *Advances in Nanoparticles*, 4(01), 1–10. DOI: [10.4236/anp.2015.41001](https://doi.org/10.4236/anp.2015.41001).

- Ccallata, H. S. J. (2010). *Propriedades de ressonância paramagnética eletrônica, de absorção óptica e termoluminescência do cristal de zoisita natural*. Tese de Doutorado. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using aloe vera plant extract. *Biotechnology progress*, 22(2), 577–583. DOI: [10.1021/bp0501423](https://doi.org/10.1021/bp0501423).
- Chen, J., Lin, Z., & Ma, X. (2003). Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of phoma sp. 3.2883 with silver nitrate. *Letters in applied microbiology*, 37(2), 105–108. DOI: [10.1046/j.1472-765X.2003.01348.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01348.x).
- Dasary, S. S., Senapati, D., Singh, A. K., Anjaneyulu, Y., Yu, H., & Ray, P. C. (2010). Highly sensitive and selective dynamic light-scattering assay for tnt detection using p-atp attached gold nanoparticle. *ACS applied materials & interfaces*, 2(12), 3455–3460. DOI: [10.1021/am1005139](https://doi.org/10.1021/am1005139).
- de Oliveira, J. F. A. & Cardoso, M. B. (2013). Partial aggregation of silver nanoparticles induced by capping and reducing agents competition. *Langmuir*, 30(17), 4879–4886. DOI: [10.1021/la403635c](https://doi.org/10.1021/la403635c).
- Dowling, A., Clift, R., Grobert, N., Hutton, D., Oliver, R., O'Neill, O., Pethica, J., Pidgeon, N., Porritt, J., Ryan, J., et al. (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. *London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering Report*, (pp. 61–64).
- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., De Souza, G. I., & Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several fusarium oxysporum strains. *J Nanobiotechnol*, 3(8), 1–7. DOI: [10.1186/1477-3155-3-8](https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-8).
- Edwards-Jones, V. (2009). The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Letters in applied microbiology*, 49(2), 147–152. DOI: [0.1111/j.1472-765X.2009.02648.x](https://doi.org/0.1111/j.1472-765X.2009.02648.x).
- Einstein, A. (1905). Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Annalen der physik*, 322(8), 549–560.
- El-Shanshoury, A. E.-R. R., ElSilk, S. E., & Ebeid, M. E. (2011). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using escherichia coli atcc 8739, bacillus subtilis atcc 6633, and streptococcus thermophilus esh1 and their antimicrobial activities. *ISRN Nanotechnology*, 2011. DOI: [10.5402/2011/385480](https://doi.org/10.5402/2011/385480).
- Eustis, S., Krylova, G., Smirnova, N., Eremenko, A., Tabor, C., Huang, W., & El-Sayed, M. A. (2006). Using silica films and powders modified with benzophenone to photo-reduce silver nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 181(2), 385–393. DOI: [10.1016/j.jphotochem.2005.12.024](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.12.024).
- Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and science*, 23(5), 22–36.

- Fievet, F., Fievet-Vincent, F., Lagier, J.-P., Dumont, B., & Figlarz, M. (1993). Controlled nucleation and growth of micrometre-size copper particles prepared by the polyol process. *Journal of Materials Chemistry*, 3(6), 627–632. DOI: [10.1039/JM9930300627](https://doi.org/10.1039/JM9930300627).
- Fu, J.-K., Zhnag, W.-D., Liu, Y.-Y., Lin, Z.-Y., Yao, B.-X., Weng, S.-Z., & Zeng, J.-L. (1999). Characterization of adsorption and reduction of noble metal ions by bacteria. *Chemical Journal Of Chinese Universities-Chinese Edition*, 20, 1454–1456.
- Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., & Jose-Yacaman, M. (2003). Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, 19(4), 1357–1361. DOI: [10.1021/la020835i](https://doi.org/10.1021/la020835i).
- Hao, E. & Schatz, G. C. (2004). Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *The Journal of chemical physics*, 120(1), 357–366. DOI: [10.1063/1.1629280](https://doi.org/10.1063/1.1629280).
- Henglein, A. (1989). Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. *Chemical Reviews*, 89(8), 1861–1873. DOI: [10.1021/cr00098a010](https://doi.org/10.1021/cr00098a010).
- Hirai, H., Nakao, Y., & Toshima, N. (1979). Preparation of colloidal transition metals in polymers by reduction with alcohols or ethers. *Journal of Macromolecular Science?Chemistry*, 13(6), 727–750. DOI: [10.1080/00222337908056685](https://doi.org/10.1080/00222337908056685).
- Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N., et al. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried cinnamomum camphora leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104. DOI: [10.1088/0957-4484/18/10/105104](https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104).
- Im, S. H., Lee, Y. T., Wiley, B., & Xia, Y. (2005). Large-scale synthesis of silver nanocubes: the role of hcl in promoting cube perfection and monodispersity. *Angewandte Chemie*, 117(14), 2192–2195. DOI: [10.1002/anie.200462208](https://doi.org/10.1002/anie.200462208).
- Ingle, A., Rai, M., Gade, A., & Bawaskar, M. (2009). Fusarium solani: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(8), 2079–2085. DOI: [10.1007/s11051-008-9573-y](https://doi.org/10.1007/s11051-008-9573-y).
- Jafarbeglou, M., Abdouss, M., Shoushtari, A. M., & Jafarbeglou, M. (2016). Clay nanocomposites as engineered drug delivery systems. *RSC Advances*, 6(55), 50002–50016. DOI: [10.1039/C6RA03942A](https://doi.org/10.1039/C6RA03942A).
- Jain, D., Daima, H. K., Kachhwaha, S., & Kothari, S. (2009). Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. *Digest journal of nanomaterials and biostructures*, 4(3), 557–563.
- Jana, N. R., Gearheart, L., & Murphy, C. J. (2001). Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*, 13(18), 1389. DOI: [10.1002/1521-4095\(20010913:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-4095(20010913:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F).
- Jones, R. A. (2002). *Soft condensed matter*, volume 6. Oxford University Press.

- Kahn, H. (2014). *Difração de Raios X (Notas de Aula)*. Disponível em: <<https://goo.gl/ksy2hf>> Acesso em 30/06/2014.
- Kalimuthu, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M., & Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by bacillus licheniformis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 150–153. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2008.02.018](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.02.018).
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R. K., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B., & Gurunathan, S. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using brevibacterium casei. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 257–262. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2010.02.007](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.02.007).
- Kalyane, S. (2017). *Basic of nanotechnology*. Horizon Books.
- Kaur, R. & Pal, B. (2015). Plasmonic coinage metal-tio2 hybrid nanocatalysts for highly efficient photocatalytic oxidation under sunlight irradiation. *New Journal of Chemistry*. DOI: [10.1039/C5NJ00450K](https://doi.org/10.1039/C5NJ00450K).
- Khlebtsov, B. & Khlebtsov, N. (2011). On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid Journal*, 73(1), 118–127. DOI: [10.1134/S1061933X11010078](https://doi.org/10.1134/S1061933X11010078).
- Klasen, H. (2000). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. i. early uses. *Burns*, 26(2), 117–130. DOI: [10.1016/S0305-4179\(99\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00108-4).
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., & Granqvist, C.-G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13611–13614. DOI: [10.1073/pnas.96.24.13611](https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13611).
- Kreibig, U. & Vollmer, M. (1995). *Optical properties of metal clusters*. Springer-Verlag.
- Lee, P. & Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391–3395. DOI: [10.1021/j100214a025](https://doi.org/10.1021/j100214a025).
- Lengke, M. F., Fleet, M. E., & Southam, G. (2007). Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver (i) nitrate complex. *Langmuir*, 23(5), 2694–2699. DOI: [10.1021/la0613124](https://doi.org/10.1021/la0613124).
- Leopold, N. & Lendl, B. (2003). 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*, 107(24), 5723–5727. DOI: [10.1021/jp027460u](https://doi.org/10.1021/jp027460u).
- Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V., & Brown Jr, G. E. (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental science & technology*, 46(13), 6900–6914. DOI: [10.1021/es2037405](https://doi.org/10.1021/es2037405).
- Lima, R., Seabra, A. B., & Durán, N. (2012). Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 32(11), 867–879. DOI: [10.1002/jat.2780](https://doi.org/10.1002/jat.2780).

- Liu, C., Yang, X., Yuan, H., Zhou, Z., & Xiao, D. (2007). Preparation of silver nanoparticle and its application to the determination of ct-dna. *Sensors*, 7(5), 708–718. DOI: [10.3390/s7050708](https://doi.org/10.3390/s7050708).
- Liu, Y.-C. & Lin, L.-H. (2004). New pathway for the synthesis of ultrafine silver nanoparticles from bulk silver substrates in aqueous solutions by sonoelectrochemical methods. *Electrochemistry Communications*, 6(11), 1163–1168. DOI: [10.1016/j.elecom.2004.09.010](https://doi.org/10.1016/j.elecom.2004.09.010).
- Liu, Z., Wang, H., Li, H., & Wang, X. (1998). Red shift of plasmon resonance frequency due to the interacting ag nanoparticles embedded in single crystal sio₂ by implantation. *Applied physics letters*, 72(15), 1823–1825. DOI: [10.1063/1.121196](https://doi.org/10.1063/1.121196).
- Lofton, C. & Sigmund, W. (2005). Mechanisms controlling crystal habits of gold and silver colloids. *Advanced Functional Materials*, 15(7), 1197–1208. DOI: [10.1002/adfm.200400091](https://doi.org/10.1002/adfm.200400091).
- Lu, X., Rycenga, M., Skrabalak, S. E., Wiley, B., & Xia, Y. (2009). Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles. *Annual review of physical chemistry*, 60, 167–192. DOI: [10.1146/annurev.physchem.040808.090434](https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.040808.090434).
- Luo, Y. & Sun, X. (2007). Rapid, single-step preparation of dendrimer-protected silver nanoparticles through a microwave-based thermal process. *Materials Letters*, 61(8), 1622–1624. DOI: [10.1016/j.matlet.2006.07.087](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.07.087).
- Maillard, J.-Y. & Hartemann, P. (2013). Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Critical reviews in microbiology*, 39(4), 373–383. DOI: [10.3109/1040841X.2012.713323](https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.713323).
- Mallikarjuna, K., Dillip, G., & Narasimha, G. (2012). Phytofabrication and characterization of silver nanoparticles from piper betle broth. *Research Journal of Nanoscience and nanotechnology*, 2(1), 17–23. DOI: [10.3923/rjnm.2012.17.23](https://doi.org/10.3923/rjnm.2012.17.23).
- Marfunin, A. S. (1979). *Physics of minerals and inorganic materials: an introduction*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Marquardt, P., Börngen, L., Nimtz, G., Sonnberger, R., Gleiter, H., & Zhu, J. (1986). Microwave absorption by small metal particles. *Physics Letters A*, 114(1), 39–42. DOI: [10.1016/0375-9601\(86\)90339-7](https://doi.org/10.1016/0375-9601(86)90339-7).
- McLellan, J. M., Li, Z.-Y., Siekkinen, A. R., & Xia, Y. (2007). The sers activity of a supported ag nanocube strongly depends on its orientation relative to laser polarization. *Nano letters*, 7(4), 1013–1017. DOI: [10.1021/nl070157q](https://doi.org/10.1021/nl070157q).
- McMillan, J. (1962). Higher oxidation states of silver. *Chemical Reviews*, 62(1), 65–80. DOI: [10.1021/cr60215a004](https://doi.org/10.1021/cr60215a004).
- Mikkelsen, S. H., Hansen, E., Christensen, T. B., Baun, A., Hansen, S. F., & Binderup, M.-L. (2011). *Survey on basic knowledge about exposure and potential environmental and health risks for selected nanomaterials*. Danish Ministry of the Environment.

- Minaeian, S., Shahverdi, A., Nohi, A., & Shahverdi, H. R. (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by some bacteria. *J. Sci. IA*, 17(66), 1–4.
- Mokhtari, N., Daneshpajouh, S., Seyedbagheri, S., Atashdehghan, R., Abdi, K., Sarkar, S., Minaian, S., Shahverdi, H. R., & Shahverdi, A. R. (2009). Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of *klebsiella pneumonia*: The effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process. *Materials research bulletin*, 44(6), 1415–1421. DOI: [10.1016/j.materresbull.2008.11.021](https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2008.11.021).
- Monshi, A., Foroughi, M. R., & Monshi, M. R. (2012). Modified scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using xrd. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2(3), 154–160. DOI: [10.4236/wjnse.2012.23020](https://doi.org/10.4236/wjnse.2012.23020).
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346. DOI: [10.1088/0957-4484/16/10/059](https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059).
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., Ramani, R., Parischa, R., Ajayakumar, P., Alam, M., et al. (2001). Bioreduction of AuCl_4^- ions by the fungus, *verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(19), 3585–3588. DOI: [10.1002/1521-3773\(20011001\)40:19<3585::AID-ANIE3585>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20011001)40:19<3585::AID-ANIE3585>3.0.CO;2-K).
- Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84(2), 322. DOI: [10.1021/ed084p322](https://doi.org/10.1021/ed084p322).
- Mulvaney, P. (1996). Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*, 12(3), 788–800. DOI: [10.1021/la9502711](https://doi.org/10.1021/la9502711).
- Nair, L. S. & Laurencin, C. T. (2007). Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications. *Journal of biomedical nanotechnology*, 3(4), 301–316. DOI: [10.1016/j.drudis.2014.11.014](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014).
- Nalwa, H. S. (1999). *Handbook of nanostructured materials and nanotechnology, five-volume set*. Academic Press.
- Nickel, U., zu Castell, A., Pöppel, K., & Schneider, S. (2000). A silver colloid produced by reduction with hydrazine as support for highly sensitive surface-enhanced raman spectroscopy. *Langmuir*, 16(23), 9087–9091. DOI: [10.1021/la000536y](https://doi.org/10.1021/la000536y).
- Oldenburg, S. J., Jackson, J. B., Westcott, S. L., & Halas, N. (1999). Infrared extinction properties of gold nanoshells. *Applied Physics Letters*, 75(19), 2897–2899. DOI: [10.1063/1.125183](https://doi.org/10.1063/1.125183).
- Oliveira, C. L., Monteiro, A. M., & Neto, A. M. F. (2014a). Structural modifications and clustering of low-density lipoproteins in solution induced by heating. *Brazilian Journal of Physics*, 44(6), 753–764. DOI: [10.1007/s13538-014-0273-z](https://doi.org/10.1007/s13538-014-0273-z).
- Oliveira, C. L., Santos, P. R., Monteiro, A. M., & Neto, A. M. F. (2014b). Effect of oxidation on the structure of human low-and high-density lipoproteins. *Biophysical journal*, 106(12), 2595–2605. DOI: [10.1016/j.bpj.2014.04.049](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.049).

- Oliveira, C. L. P. (2011). Current trends in x-ray crystallography. In A. Chandrasekaran (Ed.), *Investigating Macromolecular Complexes in Solution by Small Angle X-Ray Scattering* (pp. 367–392).: InTech. DOI: [10.5772/1421](https://doi.org/10.5772/1421).
- Oliveira, C. L. P. d. (2016). *Modelagem de dados de espalhamento e cristalização a baixos ângulos*. Tese de Livre Docência. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Padilha, A. F. (2014). *Microscopia Eletrônica de Transmissão (Notas de Aula)*. Disponível em: <<https://goo.gl/3LVUhQ>> Acesso em 28/06/2014.
- Panáček, A., Kvitek, L., Prucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V. K., Nevecná, T., & Zboril, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(33), 16248–16253. DOI: [10.1021/jp063826h](https://doi.org/10.1021/jp063826h).
- Pastoriza-Santos, I. & Liz-Marzán, L. M. (1999). Formation and stabilization of silver nanoparticles through reduction by n, n-dimethylformamide. *Langmuir*, 15(4), 948–951. DOI: [10.1021/1a980984u](https://doi.org/10.1021/1a980984u).
- Pastoriza-Santos, I. & Liz-Marzán, L. M. (2008). Colloidal silver nanoplates. state of the art and future challenges. *Journal of Materials Chemistry*, 18(15), 1724–1737. DOI: [10.1039/B716538B](https://doi.org/10.1039/B716538B).
- Pereira, M. K. (2009). *Ressonância de plasmon de superfície localizado e espalhamento Raman em soluções coloidais de ouro*. Dissertação de mestrado. Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Perez-Juste, J., Liz-Marzan, L., Carnie, S., Chan, D. Y., & Mulvaney, P. (2004). Electric-field-directed growth of gold nanorods in aqueous surfactant solutions. *Advanced Functional Materials*, 14(6), 571–579. DOI: [10.1002/adfm.200305068](https://doi.org/10.1002/adfm.200305068).
- Prathna, T., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M., & Mukherjee, A. (2011). Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 377(1-3), 212–216. DOI: [10.1016/j.colsurfa.2010.12.047](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.047).
- Provencher, S. W. (1982). Contin: a general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*, 27(3), 229–242. DOI: [10.1016/0010-4655\(82\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0010-4655(82)90174-6).
- Pusey, P. N. (2002). Introduction to scattering experiments. *Neutrons, X-rays, and light: scattering methods applied to soft condensed matter*. Amsterdam: Elsevier, 46, 3–22.
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76–83. DOI: [10.3109/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002](https://doi.org/10.3109/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002).
- Ratke, L. & Voorhees, P. W. (2013). *Growth and coarsening: Ostwald ripening in material processing*. Springer Science & Business Media.

- Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). Completely green synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940–13941. DOI: [10.1021/ja029267j](https://doi.org/10.1021/ja029267j).
- Rodrigues, T. S., da Silva, A. G., Gonçalves, M. C., Fajardo, H. V., Balzer, R., Probst, L. F., & Camargo, P. H. (2015). Agpt hollow nanodendrites: Synthesis and uniform dispersion over sio2 support for catalytic applications. *ChemNanoMat*, 1(1), 46–51. DOI: [10.1002/cnma.201500025](https://doi.org/10.1002/cnma.201500025).
- Roper, W. (1990). Toxicological profile for silver. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry US Public Health Service. See <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp146.pdf>.
- Rosenfeld, L. (2012). *Origins of Clinical Chemistry: The Evolution of Protein Analysis*. Elsevier.
- Sajanlal, P. R., Sreeprasad, T. S., Samal, A. K., & Pradeep, T. (2011). Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano reviews*, 2, 5883_1–5883_62. DOI: [10.3402/nano.v2i0.5883](https://doi.org/10.3402/nano.v2i0.5883).
- Salehahmadi, Z. & Hajiliasgari, F. (2013). Nanotechnology tolls the bell for plastic surgeons. *World journal of plastic surgery*, 2(2), 71. DOI: [10.1007/s12262-012-0726-y](https://doi.org/10.1007/s12262-012-0726-y).
- Samadi, N., Golkaran, D., Eslamifar, A., Jamalifar, H., Fazeli, M. R., & Mohseni, F. A. (2009). Intra/extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by an autochthonous strain of proteus mirabilis isolated from photographic waste. *Journal of biomedical nanotechnology*, 5(3), 247–253. DOI: [10.1166/jbn.2009.1029](https://doi.org/10.1166/jbn.2009.1029).
- Sanghi, R. & Verma, P. (2009). Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresource technology*, 100(1), 501–504. DOI: [10.1016/j.biortech.2008.05.048](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.048).
- Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S., Cho, C.-W., Kim, S., & Yun, Y.-S. (2009). Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2), 332–338. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2009.06.005](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.005).
- Sathyavathi, R., Krishna, M. B., Rao, S. V., Saritha, R., & Rao, D. N. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles using coriandrum sativum leaf extract and their application in nonlinear optics. *Advanced Science Letters*, 3(2), 138–143. DOI: [10.1166/as1.2010.1099](https://doi.org/10.1166/as1.2010.1099).
- Schmid, G. (1992). Large clusters and colloids. metals in the embryonic state. *Chemical Reviews*, 92(8), 1709–1727. DOI: [10.1021/cr00016a002](https://doi.org/10.1021/cr00016a002).
- Schmid, G., Pfeil, R., Boese, R., Bandermann, F., Meyer, S., Calis, G., van der Velden, J. W., et al. (1981). Au₅₅ [p(c6h5)3]₁₂ci₆—ein goldcluster ungewöhnlicher gröÙe. *Chemische Berichte*, 114(11), 3634–3642. DOI: [10.1002/cber.19811141116](https://doi.org/10.1002/cber.19811141116).
- Schön, G. & Simon, U. (1995). A fascinating new field in colloid science: small ligand-stabilized metal clusters and possible application in microelectronics. *Colloid and polymer science*, 273(2), 101–117. DOI: [10.1007/BF00657826](https://doi.org/10.1007/BF00657826).

- Shankar, S. S., Rai, A., Ahmad, A., & Sastry, M. (2004). Rapid synthesis of au, ag, and bimetallic au core–ag shell nanoparticles using neem (*azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of colloid and interface science*, 275(2), 496–502. DOI: [10.1016/j.jcis.2004.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.03.003).
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science*, 145(1), 83–96. DOI: [10.1016/j.cis.2008.09.002](https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002).
- Shaw, D. J. (1975). *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. E. Blücher.
- Shirtcliffe, N., Nickel, U., & Schneider, S. (1999). Reproducible preparation of silver sols with small particle size using borohydride reduction: for use as nuclei for preparation of larger particles. *Journal of colloid and interface science*, 211(1), 122–129. DOI: [10.1006/jcis.1998.5980](https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5980).
- Simon, U., Schön, G., & Schmid, G. (1993). The application of au₅₅ clusters as quantum dots. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(2), 250–254. DOI: [10.1002/anie.199302501](https://doi.org/10.1002/anie.199302501).
- Sintubin, L., De Windt, W., Dick, J., Mast, J., van der Ha, D., Verstraete, W., & Boon, N. (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(4), 741–749. DOI: [10.1007/s00253-009-2032-6](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2032-6).
- Sun, Y. & Xia, Y. (2002). Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 298(5601), 2176–2179. DOI: [10.1126/science.1077229](https://doi.org/10.1126/science.1077229).
- Troupis, A., Hiskia, A., & Papaconstantinou, E. (2002). Synthesis of metal nanoparticles by using polyoxometalates as photocatalysts and stabilizers. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(11), 1911–1914. DOI: [10.1002/1521-3773\(20020603\)41:11<1911::AID-ANIE1911>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020603)41:11<1911::AID-ANIE1911>3.0.CO;2-0).
- Tulve, N. S., Stefaniak, A. B., Vance, M. E., Rogers, K., Mwilu, S., LeBouf, R. F., Schwegler-Berry, D., Willis, R., Thomas, T. A., & Marr, L. C. (2015). Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children's potential exposures. *International journal of hygiene and environmental health*, 218(3), 345–357. DOI: [10.1016/j.ijheh.2015.02.002](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.02.002).
- Van Hoonacker, A. & Englebienne, P. (2006). Revisiting silver nanoparticle chemical synthesis and stability by optical spectroscopy. *Current Nanoscience*, 2(4), 359–371. DOI: [10.2174/157341306778699310](https://doi.org/10.2174/157341306778699310).
- Van Hyning, D. L. & Zukoski, C. F. (1998). Formation mechanisms and aggregation behavior of borohydride reduced silver particles. *Langmuir*, 14(24), 7034–7046. DOI: [10.1021/la980325h](https://doi.org/10.1021/la980325h).
- Verma, V. C., Kharwar, R. N., & Gange, A. C. (2010). Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus *aspergillus clavatus*. *Nanomedicine*, 5(1), 33–40. DOI: [10.2217/nnm.09.77](https://doi.org/10.2217/nnm.09.77).

- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N., Varadarajan, P., Nachane, R., Paralikar, K., & Balasubramanya, R. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *aspergillus flavus*. *Materials letters*, 61(6), 1413–1418. DOI: [10.1016/j.matlet.2006.07.042](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.07.042).
- Vigneshwaran, N., Kathe, A. A., Varadarajan, P., Nachane, R. P., & Balasubramanya, R. (2006). Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *phaenerochaete chrysosporium*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(1), 55–59. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2006.07.014](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.07.014).
- Vilhena, F. S. D. S. (2006). *Mecanismos de Nítrósilção de Ferro-porfirinas por SNAP: Cinética de Reação e Estabilidade em Ambiente Aeróbico*. Tese de doutorado. Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.
- Wan, G., Ruan, L., Yin, Y., Yang, T., Ge, M., & Cheng, X. (2016). Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *acinetobacter baumannii*. *International journal of nanomedicine*, 11, 3789. DOI: [10.2147/IJN.S104166](https://doi.org/10.2147/IJN.S104166).
- Wang, H., Qiao, X., Chen, J., & Ding, S. (2005). Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 256(2-3), 111–115. DOI: [10.1016/j.colsurfa.2004.12.058](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.12.058).
- Weller, H. (1993). Quantized semiconductor particles: a novel state of matter for materials science. *Advanced Materials*, 5(2), 88–95. DOI: [10.1002/adma.19930050204](https://doi.org/10.1002/adma.19930050204).
- Wiley, B., Sun, Y., & Xia, Y. (2007). Synthesis of silver nanostructures with controlled shapes and properties. *Accounts of Chemical Research*, 40(10), 1067–1076. DOI: [10.1021/ar7000974](https://doi.org/10.1021/ar7000974).
- Xie, J., Lee, J. Y., Wang, D. I., & Ting, Y. P. (2007). Silver nanoplates: from biological to biomimetic synthesis. *ACS nano*, 1(5), 429–439. DOI: [10.1021/nm7000883](https://doi.org/10.1021/nm7000883).
- Xiong, Y., Siekkinen, A. R., Wang, J., Yin, Y., Kim, M. J., & Xia, Y. (2007). Synthesis of silver nanoplates at high yields by slowing down the polyol reduction of silver nitrate with polyacrylamide. *Journal of Materials Chemistry*, 17(25), 2600–2602. DOI: [10.1039/B705253G](https://doi.org/10.1039/B705253G).
- Yin, Y., Li, Z.-Y., Zhong, Z., Gates, B., Xia, Y., & Venkateswaran, S. (2002). Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the tollens process. *J. Mater. Chem.*, 12(3), 522–527. DOI: [10.1039/B107469E](https://doi.org/10.1039/B107469E).
- Zemb, T. & Lindner, P. (2002). *Neutrons, X-rays and light: scattering methods applied to soft condensed matter*. North-Holland.
- Zhang, J. Z. (1997). Ultrafast studies of electron dynamics in semiconductor and metal colloidal nanoparticles: Effects of size and surface. *Accounts of chemical research*, 30(10), 423–429. DOI: [10.1021/ar960178j](https://doi.org/10.1021/ar960178j).
- Zhang, Y., Peng, H., Huang, W., Zhou, Y., Zhang, X., & Yan, D. (2008). Hyperbranched poly (amidoamine) as the stabilizer and reductant to prepare colloid silver nanoparticles in situ and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(7), 2330–2336. DOI: [10.1021/jp075436g](https://doi.org/10.1021/jp075436g).

Capítulo 3

CITOTOXICIDADE

Uma das maiores preocupações em conduzir experimentos biológicos que envolvem nanopartículas de prata é determinar a toxicidade celular, em outras palavras, o quanto a inserção de nanopartículas metálicas em ambiente celular pode contribuir para alterar os processos e estruturas celulares. Existem níveis seguros para utilização dessas nanopartículas? Neste capítulo, procuraremos responder a essa questão por intermédio da realização de ensaios de citotoxicidade e com ajuda da técnica de microscopia de fluorescência. Este estudo é de fundamental importância neste trabalho e complementará o assunto que iremos tratar no próximo capítulo.

OS EFEITOS CITOTÓXICOS envolvendo nanopartículas de prata têm sido pesquisados cada vez mais nos últimos anos. Muitos medicamentos relevantes feitos à base de nanopartículas metálicas, principalmente de prata e ouro foram investigados por seu aspecto citotóxico. As nanopartículas de ouro e nanofios do mesmo material mostraram não haver toxicidade significativa em células HeLa¹, enquanto que a toxicidade (Hauck et al., 2008; Khan et al., 2007) dependente da dimensão significativa foi observada em fibroblastos, células epiteliais, e células de melanoma (Pan et al., 2007). AgNPs, por sua vez, apresentam diferentes graus de citotoxicidade *in vitro* (Hsin et al., 2008; Park et al., 2007). No entanto, muitos desses estudos ainda necessitam ser completados. Neste capítulo serão apresentados os mecanismos de interação das AgNPs com células e meios líquidos, do ponto de vista citotóxico.

3.1 Comportamento de NPs de prata em líquidos e meios biológicos

Existe na literatura diversos estudos realizados sobre o comportamento de AgNPs em meios biológicos e soluções aquosas, com ênfase inclusive sobre a composição da água doce, águas residuais e de soluções sintéticas semelhantes, em particular de meios de cultura para células e organismos aquáticos, os quais têm ganhado cada vez mais importância, devido ao surgimento de um novo modelo animal para estudos celulares em laboratório, conhecido como *zebrafish*.

Os processos mais importantes para a biodisponibilidade² de AgNPs e os efeitos para organismos aquáticos incluem aglomeração ou agregação de NPs para formar grandes partículas, oxidação de Ag^0 em Ag^+ , dissolução subsequente de íons Ag^+ e reações modificando a reatividade de Ag^0 (Navarro et al., 2008; Lowry et al., 2012). As mais importantes fases sólida Ag^+ a serem consideradas para solubilidade são $\text{AgCl}_{(s)}$ e $\text{Ag}_2\text{S}_{(s)}$ (Behra et al., 2013). A solubilidade destas duas fases sólidas devem ser cuidadosamente considerada nos meios experimentais para estudos biológicos de AgNPs e de efeitos de Ag^+ , bem como para o seu comportamento em sistemas naturais

¹Henrietta Lacks morreu de câncer cervical em 1951. Antes de morrer, um cirurgião retirou amostras desse tumor e entregou ao Prof. George Otto Gey, diretor do *Tissue Culture Laboratory* no *Johns Hopkins Hospital*. Como de costume, Gey colocou as células de Henrietta em uma placa de Petri na tentativa de manter essas células vivas em cultura. Cientistas buscavam manter cultura de células humanas a décadas, mas essas células morriam. As células do tumor de Henrietta eram diferentes: elas duplicavam a cada 24 horas e nunca paravam de crescer. Elas se tornaram as primeiras células humanas imortais crescidas em laboratório e receberam o nome de HeLa (Henrietta Lacks) (Alencar, 2015).

²O termo é definido como a quantidade e velocidade na qual determinado princípio ativo, (que pode ser uma NP, droga, veneno) é absorvido, tornando-se disponível para a sua atuação no sítio de ação alvo.

e, portanto, é adequado o uso de abordagens com um pouco mais de detalhes, para tentar, dessa forma, explicar o assunto.

Para estudar o comportamento de AgNPs em meio aquoso, é necessário discutir a sua estabilidade com relação ao seu tamanho e dispersão coloidal (Tolaymat et al., 2010). NPs de tamanhos menores são suscetíveis de serem transportadas pela água para interagirem facilmente com diferentes organismos. A perda de mobilidade é verificada, devido aos mecanismos de aglomeração contribuírem para o aumento do tamanho das AgNPs; elas perdem mobilidade e tenderão a ser sedimentadas, e portanto, tornam-se menos disponíveis para os organismos, que por sua vez podem afetar plantas marinhas (Behra et al., 2013). Algumas suspensões estáveis de AgNPs, produzidas em laboratórios são estabilizadas utilizando revestimentos de superfície, como discutido no Capítulo 2, que conferem estabilidade devido à construção de uma carga elétrica na superfície das NPs, ou por estabilização estérica³ (Song et al., 2011; Behra et al., 2013). A carga de superfície de AgNPs é, na maioria das vezes, negativa e possui pH neutro. Quando se neutraliza a carga de superfície das AgNPs como uma função do pH, pode ocorrer a aglomeração como ocorre, por exemplo, em AgNPs revestidas por carbonato e para AgNPs revestidas por citrato de sódio a pH baixo (Badawy et al., 2010; Tejamaya et al., 2012). Os revestimentos com polímeros, tal como PVP, parecem ser mais estáveis como uma função do pH e da composição do meio, à medida que são estabilizados estericamente (Behra et al., 2013).

Estudos têm mostrado que um parâmetro muito importante para a estabilidade coloidal é a força iônica (I) (Behra et al., 2013). Com o incremento da força iônica, ocorre a desestabilização de suspensões de AgNPs, de uma maneira semelhante a outros coloides de cálcio. Pesquisas apontaram que concentrações na faixa milimolar de cálcio Ca^{2+} , presentes em água doce, causaram agregação de AgNPs (Badawy et al., 2010).

A dissolução de AgNPs implica uma reação de oxidação na superfície da NP da prata elementar, Ag^0 para Ag^+ , e, possivelmente, uma ligação de Ag^+ a um elemento ligante, de acordo com a reação:

e

em que o oxidante é oxigênio ou de espécie reativas de oxigênio, ou outro oxidante forte, L é um ligante, formando um complexo com Ag^+ (Behra et al., 2013).

A análise dos possíveis efeitos tóxicos das AgNPs levam em conta essas reações.

³O termo *estabilização estérica* remete ao processo pelo qual as NPs podem ser estabilizadas, revestindo-as superficialmente com uma camada de polímero, proteína ou dendrímero. Dessa forma, cria-se uma barreira mecânica que impede a aproximação.

Conforme estudos de [Behra et al. \(2013\)](#), íons Ag^+ aparecem em muitos casos para determinar sua toxicidade, ou pelo menos contribuem substancialmente para os efeitos biológicos adversos observados. A dissolução de AgNPs parece ser fortemente dependente de oxigênio ([Xiu et al., 2011](#); [Liu et al., 2010](#)). A presença de ligantes pode aumentar a taxa de dissolução de AgNPs por formação de complexos Ag^+ ([Gondikas et al., 2012](#)). Ligantes tiol, tais como cisteína se ligam fortemente à Ag^+ ([Lowry et al., 2012](#); [Burchardt et al., 2012](#)). Dissolução de nanopartículas de prata foi fortemente aumentada na presença de uma concentração elevada de cisteína (400 mmol/ ℓ) ([Gondikas et al., 2012](#)). Interações com proteínas como ligantes também podem aumentar a dissolução de AgNPs ([Martinolich et al., 2012](#)). O tamanho de AgNPs afeta a extensão e a cinética de dissolução da AgNP, com as menores partículas sendo dissolvidas mais rapidamente e a um maior grau ([Liu et al., 2010](#); [Marques et al., 2011](#)). A natureza do revestimento, no entanto, parece ser menos importante do que o efeito de tamanho ([Marques et al., 2011](#)).

Sabe-se que a dissolução de AgNPs depende significativamente do pH e, para ser mais eficiente, a pH baixo ([Liu & Hurt, 2010](#)). Estudos mostram que a liberação de íons Ag^+ na presença de oxigênio foi aumentada por um fator 5, se o pH foi reduzido de pH 7 para 4 ([Liu & Hurt, 2010](#)). Em experiências de dissolução de AgNPs utilizando várias amostras de água natural, dissolveu-se Ag^+ com aumento superior a 4 vezes, no caso da água do lago, com pH 6.4 e força iônica baixa, na comparação com água de lago com pH 8 e força iônica alta ([Behra et al., 2013](#)). Estes resultados devem ser considerados tendo em conta o pH de águas naturais na faixa típica 6 – 8.5. No entanto, o pH em fluidos gástricos pode ser tão baixo quanto pH 1.6 (fluido gástrico humano) ([Marques et al., 2011](#)) e pH 0.8 em vísceras ([Bakke et al., 2010](#)). Uma rápida e extensa dissolução de AgNPs seria esperada a esse pH baixo. Além disso, estudos recentes ([Hajipour et al., 2014](#)) mostram que a incubação de NPs no plasma humano, a partir de indivíduos com diferentes doenças e condições médicas, resulta na formação de proteínas coronas⁴ de diferentes composições (Figura 3.1).

Ligantes importantes a serem considerados para Ag^+ são o cloreto, o sulfeto e ligantes orgânicos com grupos tiol ([Bell & Kramer, 1999](#)), bem como ácidos carboxílicos que são utilizados em revestimentos de AgNPs (por exemplo, citrato ou lactato). A ligação por ligantes naturais orgânicos (ácidos fúlvicos e húmicos, outros ácidos orgânicos de baixo peso molecular) é um processo importante em águas naturais ([Herrin et al., 2001](#)). O cloreto é um componente de águas naturais e está geralmente presente nas águas doces, na concentração de 0.1 – 1 mmol/ ℓ , em efluentes 2 – 20 mmol/ ℓ , com valores mais elevados em efluentes industriais, e na água do mar com 0.5 M. Meios de cultura

⁴Quando as nanopartículas são colocadas no meio de cultura que simula o fluido biológico, elas absorvem moléculas e proteínas do meio, formando, ao redor delas, uma camada externa denominada *corona*.

Figura 3.1: Ilustração esquemática de eventuais consequências decorrentes da incubação de AgNPs em fluidos fisiológicos. (A) formação de proteína corona; (B) agregação de nanopartículas; (C) dissociação de nanopartículas; (D) remoção ou troca de ancoragens ligantes. Figura adaptada de [Urban et al. \(2015\)](#).

para células de mamíferos possuem cloreto na faixa de 140 – 200 mmol/ ℓ . Precipitações de $\text{AgCl}_{(s)}$ é um processo de preocupação em estudos toxicológicos realizados em laboratórios, em condições de elevadas concentrações de Cl^- e Ag ([Liu et al., 2010](#)). No entanto, em concentrações nanomolar de Ag, em sistemas naturais, a solubilidade de $\text{AgCl}_{(s)}$ não é excedida.

A solubilidade de Ag_2S é extremamente baixa. A total dissolução de Ag em equilíbrio com Ag_2S é, na maioria das vezes, inferior a 10^{-10} mmol/ ℓ e os níveis de Ag^+ são extremamente baixos ([Behra et al., 2013](#)). Ag^+ dissolvido na presença de sulfeto está presente apenas na forma de complexos Ag – HS (hidrossulfeto). Pequenos traços de HS^- em um meio pode, assim, conduzir reações de Ag^+ e a formação de Ag_2S ocorre na superfície da nanopartícula ([Kaegi et al., 2011](#)).

Os ácidos carboxílicos, tais como o citrato ou lactato, que são usados para revestimentos de AgNPs se ligam fracamente a Ag^+ ([Bell & Kramer, 1999](#); [Yang et al., 2011](#)). Yang et al. ([Yang et al., 2011](#)) usaram a constante de estabilidade de complexo para o complexo Ag^+ –citrato, e um excesso de 100 vezes o citrato sobre Ag^+ . O cálculo resulta em apenas 10% dos complexos Ag^+ com citrato. Em suspensões contendo estas moléculas como revestimentos ou como ligantes dissolvidos, Ag^+ será, portanto, em grande parte disponível para células. No entanto, os revestimentos podem servir como tampão⁵ de íons, que em parte se ligam a Ag^+ e, em seguida, liberam para as células. A ligação de Ag^+ por ácidos húmicos também parece ser fraca, se Ag^+ é principalmente ligado por grupos carboxílicos, em vez de grupos tiol ([Behra et al., 2013](#); [Chen et al., 2012](#)).

Com relação aos meios biológicos e cultura de células, o que sabe-se é que são muito

⁵O termo *tampão* remete ao conceito de solução tampão (mais precisamente, de pH tampão ou de íons de hidrogênio tampão) é uma solução aquosa que consiste de uma mistura de um ácido fraco e a sua base conjugada ou vice-versa.

complexos, devido aos ligantes, bem como seu elevado teor de proteínas, além de possíveis agentes quelantes para Ag^+ na solução. A composição química do meio de cultura de células é essencialmente constituída por quatro grupos de componentes: sais inorgânicos, hidratos de carbono, aminoácidos e vários suplementos, tais como vitaminas, ácidos graxos, lipídeos e fatores de crescimento. À medida que cada meio de cultura celular contém uma quantidade definida de sais, vitaminas, nutrientes e substâncias tampão de pH, a adição de soro fetal bovino (SFB), que é comumente utilizado em meio de cultura celulares como um suplemento de crescimento primário, é difícil de caracterizar (Behra et al., 2013). A alta diversidade entre os diferentes lotes é provável, mesmo a partir de um único fabricante, como SFB que é produzido a partir do sangue fetal bovino coletado nos matadouros. No entanto, a mistura complexa indefinida em meios biológicos e culturas celulares leva à transformação de AgNPs em complexos de Ag^+ .

A biodisponibilidade de Ag para organismos expostos também pode ser influenciada por interações de íons Ag^+ presentes nos meios experimentais entretanto são necessários mais estudos para entender melhor os efeitos da formação de complexos Ag^+ sobre a toxicidade de Ag (Behra et al., 2013). Processos de transformação semelhantes aos que afetam o destino de NPs de prata em soluções aquosas ou mesmo dentro de células e compartimentos específicos são esperados que ocorram em fluidos biológicos, uma vez que interagem com a superfície de partículas. Uma questão em aberto relevante para a compreensão de como AgNPs são absorvidos em organismos relaciona-se com a composição química das NPs que atingem uma membrana celular. Atualmente, a literatura tem demonstrado estudos crescentes de interações proteína-NP e também sugere que é a identidade de biomoléculas adsorvidas às NPs que pode se relacionar com os efeitos biológicos observados (Monopoli et al., 2012). Curiosamente, é o comportamento característico de NPs interagentes com moléculas biológicas que está sendo explorado em desenvolvimentos e aplicações na nanotecnologia (ou seja, nanomedicina) (Nel et al., 2009).

3.2 Absorção de nanopartículas de prata em mamíferos

No momento, há poucas referências relacionadas com a biodisponibilidade de AgNPs para animais terrestres, sendo a maioria das informações coletadas de estudos realizados em laboratório, utilizando métodos de exposição altamente controlados. A partir desses estudos, e os poucos que têm olhado para exposições ambientais relevantes, é possível determinar uma imagem aproximada da biodisponibilidade de AgNPs para os mamíferos. Porém, ainda existem muitas questões abertas e falta de modelos que se expressem de forma mais realista (Behra et al., 2013).

Quando os animais terrestres entram em contacto com AgNPs, deve ser considerada a via fisiológica de exposição, uma vez que cada percurso irá conferir biodisponibilidade diferente sobre o hospedeiro. A absorção de AgNPs para os organismos terrestres pode ocorrer através do ar, do solo e da água, e todas estas rotas de captação conferem biodisponibilidade potencialmente diferente. A principal via de absorção em animais terrestres é susceptível de ser através dos pulmões ou através do epitélio gastrointestinal. Além disso, se a retenção das NPs ocorre no animal, potenciais fontes de transferência de NPs para a descendência pode ocorrer através da lactação ou pode ser passado através do nascimento ou a placenta. No entanto, poucos estudos têm realmente focado em biodisponibilidade de AgNPs para animais terrestres com cenários realistas de exposição (Behra et al., 2013).

Pesquisas revelaram que as principais fontes de informação sobre a biodisponibilidade da AgNPs vem de estudos controlados em laboratório, realizados principalmente em ratos ou camundongos, como meio de exposição controlado (Behra et al., 2013). Alguns destes estudos estão resumidos na forma de avaliação por Kruszewski et al. (Kruszewski et al., 2011). A biodisponibilidade de AgNPs administrado por via oral era de 1.2% em ratos tratados com 1 mg.kg^{-1} de AgNPs e 4.2% em animais tratados com 10 mg.kg^{-1} de AgNPs (Park et al., 2011b). Ag foi encontrada em todos os órgãos examinados de ratos expostos à AgNPs, com os mais altos níveis no fígado e no baço de todos os tratamentos de Ag (van der Zande et al., 2012). Neste estudo, as concentrações de Ag nos órgãos foram altamente correlacionados com a quantidade de Ag^+ na suspensão de AgNPs, indicando que principalmente íons Ag^+ , e, em muito menor quantidade, AgNPs, passaram para os intestinos em ratos expostos (van der Zande et al., 2012).

Além disso, estudos mostram que AgNPs injetadas em ratos podem ser translocadas do sangue para todos os órgãos principais e que a concentração de Ag nos tecidos foi significativamente maior em ratos tratados com AgNPs de 20 nm quando comparado com AgNPs de 200 nm (Dziendzikowska et al., 2012). A acumulação de Ag também foi observada em todos os órgãos examinados de coelho, incluindo fígado, rim, baço, pulmão, cérebro e testículos até 28 dias após uma única dose intravenosa (Lee et al., 2012; Behra et al., 2013).

Uma absorção de AgNPs em células de mamífero, tais como células epiteliais de pulmão pode ser demonstrada *in vitro* por TEM, utilizando um sistema de exposição de células ao ar-líquido, para evitar a dissolução das partículas (e a agregação) em meios de cultura celular (Behra et al., 2013). As AgNPs foram endocitadas e altamente agregadas dentro de estruturas vesiculares, mas elas não causaram citotoxicidade ou induziram a liberação e expressão do estresse oxidativo. Para concentrações de exposição de AgNO_3 iguais, foram observados efeitos semelhantes, e concluiu-se que não há efeitos agudos de citotoxicidade para Ag e uma dose de exposição realista pode ser assumida (Herzog

et al., 2013). Uma outra revisão abrangente, recentemente publicada pela Chernousova & Eppe (Chernousova & Eppe, 2013), concorda com estes fatos e mostrou que os riscos para os seres humanos e o meio ambiente parece ser limitado.

Contudo, os danos causados pela presença de AgNPs no interior da célula ou Ag^+ é uma questão que ainda não pode ser devidamente respondida (Behra et al., 2013). O problema é que a maioria dos estudos utilizando cultura de células são realizados em regime de suspensão, e em seguida, é difícil diferenciar entre os efeitos da partícula e efeitos iônicos. Uma possibilidade para superar o problema com as experiências de suspensão é a utilização de sistemas de exposição ao ar líquido, se as células do pulmão são considerados no estudo (Herzog et al., 2013). Fazendo uso desses sofisticados sistemas, a exposição direta de uma solução definida com qualquer AgNPs ou Ag^+ sobre a superfície da célula pode ser controlada, e, portanto, os possíveis efeitos observados podem ser diretamente ligados a um efeito de partícula ou íon (Behra et al., 2013). No momento, os únicos efeitos colaterais para os seres humanos expostos a Ag^+ são depósitos de Ag em co-localização com enxofre e selênio como encontrado em pacientes com *argiria*. Não está adequadamente estabelecida, todavia, a reação química exata que leva à deposição da prata.

3.3 Mecanismos de Interação NP–Célula

Vários estudos têm relatado que AgNPs apresentaram toxicidade significativa contra vários tipos de células. Por exemplo, na citotoxicidade de AgNPs em macrófagos (Yen et al., 2009) e células T humanas (Eom & Choi, 2010). Uma diminuição na viabilidade celular e atividade antiproliferativa em resposta ao tratamento com AgNPs também foi observada em células epiteliais de neurônios, fígado, pele e pulmão (Yang et al., 2010; Asharani et al., 2009). Kim et al. (2010) relataram a acumulação e toxicidade crônica de AgNPs em ratos por 90 dias. Em seu estudo, investigações histopatológicas revelaram uma maior incidência de hiperplasia do canal biliar, necrose, fibrose e pigmentação em animais tratados. Houve também uma acumulação dependente da dose de prata nos tecidos. Outros estudos têm mostrado que as AgNPs podem passar através do epitélio do trato respiratório diretamente para a corrente sanguínea (Medina et al., 2007).

Figura 3.2: Interação de AgNPs com a célula: uma vez que as AgNPs chegam até a membrana plasmática celular, dois processos podem ocorrer: difusão simples e facilitadas, caso as NPs não estejam agregadas; ou, se estiverem agregadas, elas podem penetrar para o interior da célula por endocitose. Este processo permite o transporte das NPs do meio extra para o intracelular, através de vesículas limitadas por membranas, que se chamam vesículas endocíticas. Assim, ocorre a invaginação das NPs e, em seguida, fusão e separação dessas vesículas. Dependendo do tipo de AgNP, uma vez no meio intracelular, a tendência é que as NPs se decomponham, formando os íons Ag^+ , que são muito mais tóxicos para a célula. Uma vez dentro do citoplasma, as NPs ou os íons Ag^+ podem ficar confinados nos vacúolos ou nos lisossomos, que são organelas responsáveis por fazer a digestão de partículas provenientes do meio externo. Se isso não ocorrer, podem interagir com outros alvos, reduzindo o teor de ATP das células, causando danos para a mitocôndria e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nesse caso, a tendência é a formação de agregados na superfície das organelas, aumentando a toxicidade. Uma vez no núcleo, as NPs podem provocar danos no DNA, como aberrações cromossômicas. Por último, podem interferir no ciclo celular, na fase G_2/M , possivelmente devido ao reparo do DNA danificado ou, de forma irreversível, levando à apoptose. Figura modificada de [AshaRani et al. \(2008\)](#).

É aceito e muito bem descrito que AgNPs apresentam, também, a sua toxicidade através da geração de espécies reativas de oxigênio ([Foldbjerg et al., 2009](#)). O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) celulares estão associados à indução da morte celular programada geneticamente (apoptose), assim como a morte celular por necrose em várias linhas celulares ([Ott et al., 2007](#)). A apoptose elimina as células

danificadas ou indesejados por condensação nuclear, formação de bolhas de membrana e fragmentação do DNA no processo de desenvolvimento ou em resposta à infecção ou dano ao DNA (Chipuk et al., 2005; Gopinath et al., 2010).

AshaRani et al. investigaram o efeito citotóxico e genotóxico de nanopartículas de prata nas células humanas. Os seus resultados indicaram disfunção mitocondrial, bem como a indução de ROS pelas nanopartículas de prata, que resultam em danos no DNA e aberrações cromossômicas (AshaRani et al., 2008). Em fibroblastos NIH3T3, AgNPs apresentaram efeitos citotóxicos e induziram a apoptose (Figura 3.2), a liberação de citocromo C para o citoplasma à partir das mitocôndrias, e a translocação de Bax na mitocôndria (Hsin et al., 2008). Em adição à geração de ROS, AgNPs induziu a depleção de antioxidante glutatona (GSH), a disfunção mitocondrial, e a liberação de lactato desidrogenase (LDH) (Hussain et al., 2005; Carlson et al., 2008; Arora et al., 2009). LDH é uma enzima citoplasmática que existe em todos os principais sistemas de órgãos. Quando a morte celular por necrose ocorre ou membranas celulares estão danificadas, LDH é liberada na célula no ambiente extracelular. Portanto, a presença extracelular de LDH é utilizado como marcador de danos nas células ou morte celular (Wang et al., 2010).

Estes estudos realçam, principalmente, que AgNPs têm efeitos tóxicos significativos em células que ocorrem, principalmente, numa forma dependente da dose. No entanto, houve poucos estudos sistemáticos sobre a dependência do tamanho na toxicidade celular de AgNPs. Uma característica importante de materiais de tamanho nano, tais como as nanopartículas, é que as respostas biológicas a estes compostos variam muito com o seu tamanho. O tamanho de partícula das NPs desempenha um papel fundamental nos processos de incorporação celular da membrana intracelular para a membrana nuclear (Chithrani & Chan, 2007; Chen & von Mikecz, 2005). Por exemplo, as nanopartículas de ouro entram em células HeLa via endocitose, mediada por receptor dependente do tamanho e da forma (Chithrani et al., 2006) Yuan et al. (Yuan et al., 2010) também relataram que o tamanho de NPs de hidroxiapatita (HA) teve um efeito predominante na citotoxicidade, apoptose, e nos níveis de proteínas apoptóticas em células de hepatoma HepG2 humanos. Com base em estudos de citotoxicidade de AgNPs, o tamanho das AgNPs deve ser um fator crítico envolvido na determinação das respostas de células. O exame da toxicidade dependente do tamanho celular de AgNPs irá fornecer informações úteis e lógicas a respeito de seus usos específicos, porque muitos estudos recentes têm se concentrado no uso AgNPs para o veículo de entrega de genes e drogas. Como tal, os estudos têm-se centrado no desenvolvimento de AgNPs com tamanhos tão pequenos quanto possível, ainda menores do que 10 nm, para esses fins.

3.4 Cultivo de células

O cultivo de células se iniciou no princípio do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado (Molinaro et al., 2012). Dentro dos tipos de cultura, pode-se destacar a cultura com células primárias e uma cultura com linhagem celular estabelecida ou imortalizada. Uma cultura primária é instituída a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática (Freshney, 1987; Carvalho & Recco-Pimentel, 2007; Molinaro et al., 2012). As células que conseguirem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem ao frasco de cultivo, formarão a primeira monocamada de células daquele tecido. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias. À medida que a cultura é repicada⁶, as células com uma maior capacidade de proliferação irão predominar no frasco de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não possuem uma taxa normal de proliferação (Freshney, 1987). Essas células ainda não perderam as características do tecido de origem, mas possuem alta proliferação. Esse tipo de célula é chamada linhagem celular contínua, e é muito utilizado em pesquisa, pois pode ser mantido em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias) e ainda guarda grande parte das características do tecido original.

A manutenção de culturas celulares em laboratório exige alguns cuidados que necessitam ser tomados no intuito de evitar contaminações que podem surgir, como trabalhar em um ambiente limpo, com materiais estéreis e dentro de uma capela de fluxo laminar, além da observação de procedimentos básicos de biossegurança, como a proteção individual com a utilização de aventais e luvas (Freshney, 1987; Carvalho & Recco-Pimentel, 2007). A boa qualidade dos meios de cultivo também são imprescindíveis para o bom desenvolvimento da cultura e dos repiques. Células aderentes, oriundas de tecidos duros são cultivadas *in vitro* e dependem de ancoragem; por essa razão crescem em monocamadas em frascos de cultivo estéreis, com ajuda de meios de cultivo apropriados. Cada linhagem celular possui necessidades metabólicas diferentes, por isso, existem no mercado diferentes tipos de meios de cultivo para diferentes tipos de linhagens celulares, sendo um dos mais utilizados o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM, o qual necessita ser suplementado com 10% de soro fetal bovino, um

⁶A técnica básica de manutenção de células *in vitro* recebe o nome de repique ou subcultivo. Uma vez que as células atingem uma alta densidade e a monocamada celular apresenta uma alta confluência, uma fração dessas células necessitam ser transferidas para outros recipientes, de forma que o crescimento celular não seja prejudicado.

suplemento complexo, rico em proteínas, que estimula o transporte de glicose, fosfato e aminoácidos, além de aumentar a permeabilidade das membranas. É necessário, ainda, manter as culturas em condições de temperatura e umidade adequadas, ou seja, mantidas em incubador a 37 °C, com 5% de CO₂ (Carvalho & Recco-Pimentel, 2007).

3.5 Cinética de crescimento celular

O estudo cinético de um processo de crescimento celular consiste, inicialmente, na análise da evolução dos valores de concentração celular. Quando se inocula um pequeno número de células em um volume fixo de um meio de cultura e registra-se o número de células viáveis em função do tempo, observa-se que o padrão de crescimento, baseado no número de células, apresenta quatro fases distintas, que compõem um perfil de crescimento celular representados na Figura 3.3.

Figura 3.3: Curvas de crescimento de células OGG (epitélio gengival oral) e JE (epitélio juncional). As células JE estavam em fase lag (1-7 d após a inoculação), fase exponencial (8-12 d) e fase estacionária (12 dias depois). As células OGE estavam em fase lag (1-3 d após a inoculação), fase exponencial (4-11 d) e fase estacionária (12 dias depois). Figura adaptada de Jiang et al. (2014).

Dois parâmetros importantes para a análise é a velocidade específica de crescimento, μ , e o tempo de duplicação, g , pois o crescimento celular muitas vezes é expresso em termos destes fatores (Freshney, 1987). A velocidade específica de crescimento é a medida de quão rápida uma população celular cresce. Altos valores de μ são indicativos de elevadas taxas de crescimento celular. A construção do perfil de crescimento é imprescindível para a manutenção da rotina e para saber o número de células depois de determinado intervalo de tempo (Freshney, 1987). Ela permite a caracterização

de alguns parâmetros próprios de uma população sob determinadas condições de cultivo. Linhagens primárias e permanentes possuem perfil de crescimento diferente; as linhagens permanentes podem ser mantidas indefinidamente, enquanto as linhagens primárias morrem após algumas gerações.

O perfil de crescimento celular é dividido nas seguintes etapas:

1. Fase lag ou fase de latência: é a fase que se segue à inoculação das células em novo meio nutritivo (Figura 3.3). Representa um período de adaptação no qual não ocorre crescimento ou mesmo um declínio da cultura. É um período em que há produção de enzimas e proteínas estruturais, com o aumento da síntese de DNA, ocorrendo intensa atividade metabólica. As condições em que se encontra o inóculo inicial têm uma forte influência na duração desta fase. Uma cultura iniciada a partir de um inóculo retirado em fase exponencial de crescimento terá uma fase de latência muito curta, ou esta poderá nem se verificar se a transferência para o novo meio se verificar nas mesmas condições de temperatura e osmolalidade.

2. Fase log ou fase exponencial: é a fase em que ocorre um aumento constante do número de células na cultura. O ritmo de crescimento da população é uma medida do aumento celular ao longo do tempo. É a fase de maior viabilidade e atividade metabólica das células e, por isso, é o melhor período para estudo e experimentação (Figura 3.3). Nesta fase, é determinado o tempo de duplicação, sendo a velocidade de proliferação, característica de cada linhagem. A duração da fase exponencial em culturas depende do tamanho do inóculo, do ritmo de crescimento, do meio utilizado e das condições físicas de crescimento nomeadamente temperatura e osmolalidade.

3. Fase estacionária: é caracterizada por ausência de crescimento e em pouco tempo as células começam a sofrer alterações bioquímicas. A velocidade de crescimento diminui, o número de células mortas tende a ser equivalente ao número de células novas, e a atividade metabólica decresce (Figura 3.3). Há duas razões possíveis para este fenômeno: (a) que as células tenham exaurido o substrato ou os nutrientes necessários ao crescimento e (b) que o crescimento de novas células seja compensado pela morte de células velhas. Uma limitação em nitrogênio pode resultar numa redução do conteúdo proteico, alterações no conteúdo lipídico e de carboidratos. Para algumas linhagens, a fase estacionária pode ser estendida se o meio for renovado.

4. Fase de declínio ou morte celular: ocorre quando o metabolismo celular já não pode ser mantido (Figura 3.3). Há redução drástica do número de células e o número de células mortas excede o de células vivas. Nesta fase o meio se encontra deficiente em nutrientes e rico em toxinas produzidas pelas células. Durante esta fase, as células morrem a uma taxa que excede à de produção de novas células. A taxa de decaimento é normalmente uma função da população viável e das características do meio. Em alguns casos, a fase de decaimento é inversa à fase log de crescimento.

3.6 Modelagem matemática para estudos cinéticos

Considerando-se apenas a fase exponencial, a velocidade específica de crescimento é constante e conclui-se que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração celular, N , ou seja, segue uma cinética de primeira ordem. Assim, a seguinte equação para este fenômeno pode ser escrita (Huerger et al., 2011):

$$\mu = \frac{r_N}{N} = \frac{dN}{dt} \frac{1}{N} \quad (3.3)$$

com r_N sendo a velocidade instantânea de crescimento celular. A partir de 3.3, tem-se:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (3.4)$$

Separando-se as variáveis e integrando membro a membro, obtém-se:

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = \mu \int_{t_0}^t dt, \quad (3.5)$$

que fornece:

$$\ln \left(\frac{N}{N_0} \right) = \mu(t - t_0) \quad (3.6)$$

Aplicando a função exponencial em ambos os lados da equação 3.6, chega-se a:

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad (3.7)$$

A equação 3.7 representa um crescimento celular equilibrado, onde as células estão completamente adaptadas às condições de crescimento. Pode-se estimar a velocidade específica de crescimento celular, μ , a partir da equação 3.6 que representa uma equação de reta em um gráfico mono-logarítmico de $\ln N$ versus t , com μ representando o coeficiente angular, que é constante e máximo e $\ln N_0$ o coeficiente linear da reta.

Para determinar-se o tempo de duplicação da população celular, g , faça-se na Eq. 3.6 $g = t - t_0$ quando $N = 2N_0$. Assim:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3.8)$$

3.7 Materiais e Métodos

3.7.1 Ensaios Cinéticos de Crescimento Celular

Ensaios cinéticos, visando a construção do perfil de crescimento celular foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) – IPT, utilizando as linha-

gens celulares NCTC-clone L-929 de tecido conectivo de camundongo (fibroblasto), originária da *American Type Culture Collection*, ATCC-(CCL1), adquirida do banco de células do Instituto Adolfo Lutz (Cultcel) e a linhagem RASM (*Rabbit Aortic Smooth Muscle*), de músculo liso de aorta de coelho, linhagem celular isolada pelo Instituto do Coração (InCor), não possuindo depósito em banco de células. Os testes foram realizados visando avaliar o crescimento celular dessas duas linhagens celulares cultivadas na presença de 5% e 10 % de soro fetal bovino. Foram realizados 4 ensaios de crescimento celular nas seguintes condições:

Ensaios 1 e 2: foram construídos perfis de crescimento celular para as linhagem RASM (14a. passagem), cultivadas na presença de 5% e 10% de soro fetal bovino, com meio DMEM *Sigma*, elaborado a partir dos seguintes componentes (*Sigma*): Glicose, Hepes, Glutamina e Bicarbonato de Sódio e esterilizado por filtração, produzido no IPT.

Ensaios 3 e 4: foram construídos perfis de crescimento celular para a linhagem NCTC-clone L929 (11a. passagem), cultivadas na presença de 10% de soro fetal bovino, com meio de cultivo produzido no IPT, com composição idêntica à utilizada no ensaio 1. Um protocolo⁷ descrevendo os procedimentos para realização de subcultivos celulares pode ser consultado no [Apêndice A](#).

O procedimento experimental para os quatro ensaios foi semelhante. Utilizando frascos de cultivo T-25, cujo volume de cultivo perfaz 5 mL por frasco, no primeiro dia foram inoculadas 1.0×10^5 células/mL em meio DMEM suplementado com 5% e 10% de soro fetal bovino (o percentual mudou de acordo com o ensaio realizado) em 18 frascos de cultivo e estes, mantidos na incubadora de células a 37 °C com 5% de CO₂, garantindo assim que todas as amostras iniciassem o ensaio com a mesma concentração celular. Cada ensaio foi realizado em duplicata, ou seja, durante os 8 dias subsequentes após o início de cada ensaio, duas amostras eram retiradas da incubadora para obtenção da concentração celular. O protocolo a seguir, era então, executado:

1. O meio de cultura de cada frasco a ser utilizado no dia era retirado e o p.H. era medido com o auxílio de um pHmetro previamente calibrado;
2. Os frascos de cultura eram então lavados com PBS (tampão fosfato-salina) e, posteriormente, a solução era descartada;
3. Em seguida, após observar a confluência celular em microscópio invertido (Zeiss), as células eram tripsinizadas com 1 mL de tripsina

⁷Todos os protocolos destacados nesta pesquisa foram desenvolvidos e aprimorados experimentalmente ou adaptados a partir de outros conhecimentos de membros do nosso grupo de pesquisa, adquiridos pela experimentação realizada, muitas vezes, em universidades no exterior. Cada protocolo é passível de ser adaptado ao tipo de nanopartícula e aos tipos de células que se utilizam nos experimentos. As calibrações metodológicas são realizadas com base em observações dos sistemas estudados, tentativas e erros.

por aproximadamente 3 minutos. Esta técnica permite a separação das células do fundo do frasco de cultivo pela ação da enzima tripsina, que rompe as ligações das células de suporte e das junções entre as mesmas. Este processo foi realizado com atenção, uma vez que a tripsina também pode destruir células por digestão total, dependendo do tempo em que as células fiquem em contato com a substância;

4. As células eram, então, ressuspensas em 4 ml de DMEM em cada frasco, homogeneizava-se e retirava-se uma alíquota de 1 ml para contagem de células em câmara de Neubauer, onde também era avaliada a viabilidade celular por corante azul de Tripan⁸ a 0.5% em PBS;

5. Após a contagem das células, registrava-se o tempo, as células viáveis, as células mortas e a concentração celular em planilha elaborada para esta finalidade.

Ilustrações de meios de cultivo e materiais utilizados para se manipular as culturas celulares, bem como equipamentos presentes na sala de cultura, podem ser vistas no [Apêndice B](#) e no [Apêndice C](#), respectivamente. O tratamento dos dados foi realizado através de tabelas e gráficos.

3.7.2 Testes de Citotoxicidade por Captação do Vermelho Neutro

O teste de citotoxicidade por captação do vermelho neutro é um teste muito realizado para determinar efeito citotóxico de agentes químicos nos processos metabólicos celulares e na investigação sobre como esses processos podem interferir no desenvolvimento celular, comparando-se com culturas controles não-tratadas. Este ensaio mede a atividade de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos⁹ de células viáveis e tende a simplificar os eventos quantificados, contudo, por ser um método simples, de baixo custo e alta reprodutibilidade, são extensamente empregados em processos de triagem laboratoriais ou testes pilotos ([Freshney, 1987](#)). Este teste fornece uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em uma cultura. É um dos mais utilizados testes de citotoxicidade, com muitas aplicações biomédicas e ambientais. A maioria das células primárias e linhagens celulares de origens diversas podem ser utilizadas com sucesso ([Repetto et al., 2008](#)). Foi realizado 1 ensaio em triplicata para cada tipo de nanopartícula de prata que estamos estudando, no intuito de determinar a

⁸O corante azul de Tripan é um corante vital, uma substância tintorial muito utilizada para avaliar a viabilidade celular em laboratório. As células saudáveis não são coradas, porém as células danificadas ou mortas, cuja membrana plasmática é permeável ao corante, apresentam seu núcleo corado em azul e, desta forma, é possível excluí-las da contagem.

⁹Os lisossomos (do grego lise, quebra, destruição) são bolsas membranosas que contêm enzimas capazes de digerir substâncias orgânicas.

citotoxicidade das AgNPs, utilizando a linhagem celular RASM. Os testes visaram a determinação do IC₅₀, que é a concentração de AgNPs responsável por inibir o crescimento de 50% das células de uma determinada cultura celular. Cada ensaio seguiu o protocolo abaixo ([Borenfreund & Puerner, 1985](#)) (consulte [Apêndice B](#) e [Apêndice C](#) para visualizar imagens de alguns materiais e equipamentos.):

No primeiro dia, foi preparada uma suspensão com 1.0×10^5 células/ml em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços (volumes de 100 µl/poço). As células permaneceram incubadas por 24 horas para aderência e formação da monocamada celular.

No segundo dia, cada uma das suspensões coloidais, contendo as NPs foram então diluídas em série (50, 25, 12.5, 6.25, 3.16, 1.56, 0.78 e 0.39)% (Tabela 3.2) com o meio DMEM, utilizado na manutenção da linhagem celular. Volumes de 100 µl/poço dessa suspensão foram novamente colocados nas microplacas, depois da remoção do meio que já havia sido utilizado no dia anterior para crescimento celular. O meio, agora, deixou de ser suplementado com soro, pois a intenção, nesta etapa, não era promover mais o crescimento celular, mas apenas deixar as células expostas às AgNPs, uma vez que as células já haviam aderido e crescido no fundo dos poços. As microplacas voltaram novamente para a incubadora de células por mais 24 horas.

No terceiro dia o meio contendo as NPs foi retirado, e as microplacas lavadas 2 vezes com PBS. Em seguida, foi adicionada uma solução contendo o vermelho neutro (5 mg/ml) em meio DMEM sem soro. As microplacas voltaram novamente a ser incubadas por 3 horas. Em, seguida, a extração do corante foi realizada, utilizando uma solução dessorvente, composta de ácido acético em água e etanol (49% de água, 50% de etanol, 1% de ácido acético). Cada microplaca foi então agitada por 3 minutos e a leitura das densidades ópticas, em 540 nm, efetuadas em um espectrofotômetro Titertek Multiskan MCC 340. As medições das absorbâncias de células expostas apenas ao meio de cultivo (controle negativo) foram consideradas como a viabilidade de 100% de células. Com os valores obtidos, calculou-se a média da percentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%) e o desvio padrão, que foram colocados em função da concentração das NPs em gráfico para obter as curvas de viabilidade celular. Os resultados serão apresentados na Seção 3.8.

Figura 3.4: Espectrofotômetro de microplacas Multiskan MCC/340, disponível no Laboratório de Células do Núcleo de Bionanomanufatura no Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT. O aparelho possui uma ampla faixa de comprimento de onda, software interno com algoritmos de correções e uma velocidade de leitura rápida. *Figura do autor.*

Figura 3.5: Ensaios de citotoxicidade por incorporação do vermelho neutro. (A) corante vermelho neutro preparado, acima. Abaixo, estão dispostas algumas microplacas preenchidas. (B) preenchimento de microplacas com o corante vermelho neutro, utilizando uma micropipeta multicanal. (C) microplacas prontas para serem colocadas na incubadora de células, contendo diferentes concentrações de nanopartículas de prata e células. À esquerda, microplacas com AgNPs Khemia®. À direita, com coloração degradê amarela, AgNPs IQ-USP. *Figura do autor.*

3.7.3 Investigação morfológica utilizando microscopia de fluorescência

Células de linhagem celular RASM foram estudadas para verificar apoptose, células viáveis e possíveis células necróticas na presença de AgNPs. Para isto, as células foram coradas utilizando um marcador celular denominado Hoescht[®] 33342, que é um poderoso corante de contraste nuclear que emite fluorescência azul (excitação em 350 nm e emissão em 461 nm) quando ligado ao DNA celular, usado para distinguir núcleos apoptóticos e melhor que o corante DAPI, por ser menos tóxico.

Foram realizados dois experimentos, um com AgNPs IQ-USP e outro com AgNPs Khemia[®]. O seguinte protocolo foi seguido:

Foram cultivadas células em poços individuais de 30 mm de diâmetro, com fundo de vidro, ideais para medidas com microscopia.

No primeiro dia, preparou-se uma suspensão celular com concentração de 1.0×10^5 células/mL, à qual foi distribuída em 10 poços (8 poços para cada uma das diluições com AgNPs que seriam realizadas posteriormente e 2 poços para controle). As células foram mantidas incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ durante 48 horas, até que todos os poços estivessem confluentes. O meio de cultivo, contendo 10% de SFB foi renovado na metade deste tempo.

No terceiro dia, colocou-se as AgNPs, nas concentrações estabelecidas na Tabela 3.2, que permaneceram em contato com as células por 24 horas.

No quarto dia, lavou-se com PBS 3 vezes cada poço para garantir que o máximo de nanopartículas fossem removidas. A seguir, foi realizado o preparo de Hoescht[®], como segue (Os procedimentos a seguir foram realizados em ausência de luz).

Preparou-se uma solução estoque de corante Hoescht[®], dissolvendo o conteúdo de um frasco (100 mg) em 10 mL de água deionizada para criar uma solução de 10 mg/mL.

Em seguida, preparou-se a solução de coloração Hoescht[®], diluindo a solução de estoque Hoescht[®] 1: 2.000 em PBS.

Posteriormente, o meio foi removido e foi adicionado um volume da solução de coloração em cada poço, suficiente para cobrir as células.

Depois, as células foram incubadas por 5-10 minutos. Passado este tempo, a solução de coloração foi removida e as células lavadas 3 vezes com PBS. Então, as imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência Leica DMI 4000B.

3.8 Resultados e Discussões

A Figura 3.6 apresenta dois ensaios realizados com a célula NCTC–L929. Foi observada uma concentração celular máxima de 1.1×10^6 células/mL e 9.8×10^5 células/mL, respectivamente, após aproximadamente 6 dias de incubação. Por se tratar de uma mesma célula, os dois ensaios tiveram resultados bastante parecidos. Algumas pequenas sutilezas, no entanto, puderam ser observadas: trata-se de uma concentração celular máxima menor em um dos ensaios (Figura 3.6 (B), bem como uma fase de declínio com maior morte de células. Por conta disto, o tempo de duplicação celular foi um pouco menor (Figura 3.6 (B) e Tabela 3.1). Contudo, esses resultados estão dentro do esperado para esta linhagem celular, à qual se desenvolve com uma velocidade de crescimento um pouco mais rápida em comparação à linhagem RASM; todavia ambas as linhagens continuam crescendo até atingirem 100% da área de cultivo nos frascos, com confluência celular ultrapassando 5×10^5 células/mL, podendo atingir o limite de $\sim 1 \times 10^6$ células/mL.

Figura 3.6: Perfis de crescimento celular obtido ao término dos ensaios com a linhagem NCTC–L929. *Figura do autor.*

Uma comparação mais detalhada dos perfis cinéticos em escala para a linhagem NCTC–L929 pode ser vista na Figura 3.7. No gráfico (A) pode-se observar que as células iniciam o crescimento em uma concentração de 1.1×10^5 cel/mL e após 1 dia (aproximadamente 24 horas) 300 mil novas células surgem, elevando a concentração para 1.4×10^5 cél./mℓ e no terceiro dia, após 72 horas do início da incubação, a fase log é iniciada, estando a cultura a uma concentração 4.1×10^5 cél./mℓ. No gráfico (B) observa-se que as células iniciam o crescimento em uma concentração celular de 1.2×10^5 cél./mℓ e, após 24 horas, não observa-se o surgimento de novas células, no entanto, após 3 dias do início da incubação, a fase log é iniciada estando a cultura a uma concentração celular praticamente igual à que se observa no gráfico (A). Esse atraso no crescimento pode ser

considerado normal, pois a fase lag pode durar desde algumas horas até alguns dias, devido ao período de adaptação das células no frasco de cultivo. Não é comum notar, no entanto, declínio na curva, ou seja, diminuição do número de células, a menos que a cultura apresente contaminação por fungos ou bactérias, motivo pelo qual, as outras fases de crescimento celular, neste caso, não são observadas. Em ambos os ensaios, a fase log durou cerca de 96 horas, sendo que no primeiro ensaio a concentração celular saltou de 4.1×10^5 cél./mℓ para 1.1×10^6 cél./mℓ, enquanto que no segundo ensaio, para a mesma concentração inicial, a concentração obtida ao final desta fase foi 9.0×10^5 cél./mℓ.

Figura 3.7: Comparação detalhada do perfil de crescimento celular obtido ao término dos ensaios com a linhagem NCTC–L929, em escala. As fases lag, log e estacionária podem ser visualizadas. *Figura do autor.*

A Figura 3.8 apresenta os ensaios cinéticos realizados com a célula RASM utilizando meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com 5% de SFB Figura 3.8(A) e 10% de SFB Figura 3.8(B). Para as células cultivadas com 5% de SFB, foi observada uma concentração celular máxima de 4.8×10^5 cél./mℓ após aproximadamente 5 dias de incubação e a cultura demorou 2 dias para sair da fase lag. Para as células cultivadas com 10% de SFB, foi observada uma concentração celular máxima de 5.5×10^5 cél./mℓ aproximadamente 4 dias de incubação.

Figura 3.8: Perfis de crescimento celular obtido ao término dos ensaios com a linhagem RASM. Células cultivadas com DMEM suplementado com (A) 5% de SFB e (B) 10% de SFB. *Figura do autor.*

Comparando as duas cinéticas realizadas com a RASM, com o meio DMEM (*Sigma*) (Figura 3.8), percebemos que as células cultivadas em meio com 5% de SFB demoraram mais para crescer do que as células cultivadas em meio com 10% de SFB. [Chamley-Campbell & Campbell \(1981\)](#) observaram que nos primeiros 6 dias, as células de músculo liso de aorta de porco adulto cultivadas com 5% de SFB que eles estudaram permaneceram com fenótipo contrátil e não se dividiram. Observaram ainda que a mudança no fenótipo ocasionalmente se tornava reversível se as células fossem inoculadas em uma alta densidade. Além disso, em comparação com a NCTC–L929, ambos os ensaios realizados com a RASM no LBI mostraram que esta linhagem celular atinge a metade da concentração da NCTC–L929 e depois entra na fase estacionária. Estes ensaios foram realizados como preparação para os ensaios de citotoxicidade, na tentativa de se cultivar as células em presença das AgNPs com a menor percentagem de soro fetal bovino possível, devido à interação das nanopartículas com as proteínas deste fluido (ver Seção 3.1), porém, os resultados mostraram que tentar cultivar as células com uma menor percentagem de SFB implica em crescimento celular mais lento e concentração celular mais baixa, podendo dificultar a estimativa dos efeitos devido às nanopartículas.

[Yau-Young et al. \(1981\)](#) estudaram a bioquímica e morfologia de células de músculo liso de aorta de coelho (RASM), cultivadas em DMEM na ausência e na presença de soro de coelho a 10%. Eles perceberam que as células isoladas cultivadas na presença de soro se multiplicaram rapidamente e por 9 dias exibiram características típicas de células subcultivadas, incluindo crescimento em multicamadas, atividades de enzimas marcadoras de organelas subcelulares elevadas e proliferação de organelas. Em contrapartida, células isoladas cultivadas na ausência de soro permaneceram quiescentes¹⁰. Essas

¹⁰Estado em que as células adultas maduras podem ficar por tempo indeterminado, permanecendo metabolicamente ativas, mas não se dividindo ou, então, se dividindo apenas quando estimuladas por

células se espalharam lentamente, formando uma monocamada de células orientadas aleatoriamente e retendo características morfológicas diferenciadas. A figura 3.9 ilustra os resultados que eles obtiveram.

Figura 3.9: Cultura de músculo liso de aorta de coelho (RASM) isolada e mantida em DMEM na ausência ou presença de suplemento de soro de coelho a 10%. Microscopia de contraste de fase: (A) Aparência de células recém-isoladas em estado controlado. Na cultura, essas células primeiro arredondaram-se, juntaram-se e depois se espalharam. Na ausência de soro, a maioria das células permaneceram arredondadas e ligeiramente presas ao frasco de cultivo (B, D) e apenas se espalharam lentamente (F, H). Na presença de soro, as células se espalharam rapidamente e proliferaram (C, E), eventualmente apresentando excesso de crescimento e formando “colinas e vales” (G, I). Característica das células do músculo liso subcultivadas: em magnificação menor, as diferenças nos padrões de células na ausência ou presença de soro são evidentes (H, I). Período da cultura: soro ausente, (B) 2 dias, (D) 6 dias, (F) 16 dias, (H) 9 dias; soro presente, (C) 2 dias, (E) 4 dias, (G) 7 dias, (I) 7 dias. (A) barra = 10 μm ; (B - I) barra = 100 μm . Figura adaptada de Yau-Young et al. (1981).

Com a ajuda de gráficos monologarítmicos, obtivemos a velocidades de crescimento e o tempo de duplicação para todos os perfis obtidos com os ensaios. A Tabela 3.1 apresenta uma sistematização desses parâmetros e de outros importantes nos ensaios cinéticos e a Figura 3.10 mostra os gráficos monologarítmicos construídos com os dados dos perfis na fase log de crescimento.

De acordo com a Tabela 3.1, pode-se inferir que ambos os ensaios realizados realizados com a célula NCTC-L929 demonstraram tanto uma velocidade como um tempo de duplicação celular bastante semelhantes. As pequenas diferenças na variação desses parâmetros se dá pelos próprios erros sistemáticos que podem ocorrer durante a aquisição dos dados (contagem das células) como eventuais células não vistas ao microscópio durante a contagem, devido a um plano desfocado. Ao analisarmos os ensaios realizados com a célula RASM, o ensaio realizado com 5% de SFB apresentou uma velocidade de crescimento celular inferior à metade da velocidade do mesmo teste realizado com 10% de SFB. Além disso, o tempo de duplicação da cultura mais que dobrou no teste

sinais extracelulares, com a finalidade de renovação tecidual após morte ou lesão celular

realizado com 5% de SFB em comparação com o realizado com 10%, levando a um crescimento mais lento, fase lag mais demorada e fase estacionária menor e fase de morte celular mais acentuada. Em comparação com a célula NCTC-L929, a célula RASM com 10% SFB apresentou uma velocidade de crescimento maior, e consequentemente, um tempo de duplicação celular um pouco menor, mas ainda aproximado ao encontrado para a célula NCTC-L929. Inferimos assim que, quanto menor a velocidade de crescimento (μ), maior o tempo de duplicação celular (g) e vice-versa.

Figura 3.10: Gráficos monologarítmicos para a fase log de crescimento celular, obtidos com dados experimentais das linhagens celulares NCTC-L929 e RASM. *Figura do autor.*

Tabela 3.1: Parâmetros importantes no estudo de cinética de crescimento celular.

Ensaio / Célula	Figura	SFB (%)	Conc. Máx. (10 ⁵ cél./mℓ)	Dias	Confluência (%)	μ (hora ⁻¹)	g (hora)
1. NCTC-L929	3.6 (A)	10	11	6	100	0.017	40.8
2. NCTC-L929	3.6 (B)	10	9	6	100	0.019	36.4
3. RASM	3.8 (A)	5	4.8	5	60	0.009	77.0
4. RASM	3.8 (B)	10	5.5	4	100	0.023	30.0

Além disso, pode-se utilizar a Equação 3.7 para calcular teoricamente a concentração final de células de cada ensaio, utilizando como base os dados fornecidos na Tabela 3.1 e observando o gráfico da Figura 3.6 (A). Tomando como exemplo a célula NCTC-L929 (Ensaio 1), pode-se escrever:

$$\begin{aligned}
 N &= N_0 \exp[\mu(t - t_0)] \\
 N &= 1.10^5 (\text{células}/m\ell) \exp[0.017(h^{-1})(143)(h)] \\
 N &= 1.10^5 (\text{células}/m\ell) \exp(2.43) \\
 N &= 1.10^5 (\text{células}/m\ell) (11.4) \\
 N &= 1.1 \times 10^6 (\text{células}/m\ell),
 \end{aligned}$$

resultado teórico que coincide com o número de células que a cultura alcançou neste ensaio (Figura 3.6 (A)).

Por esses motivos, quando comparada à célula tida como “padrão” na maioria dos experimentos celulares – fibroblasto NCTC-L929 – a célula RASM se mantém adequada para estudo, quando cultivada com 10% de SFB, apresentando boa concentração celular, ótima confluência, velocidade de crescimento e tempo de duplicação semelhantes à NCTC-L929 nas mesmas condições de cultivo (Chamley et al., 1977). Dessa forma, a célula RASM quando cultivada com 10% de SFB se mostrou adequada para realização dos ensaios de citotoxicidade.

A Tabela 3.2 apresenta os valores de concentrações de nanopartículas IQ-USP e Khemia[®] utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e coloração para microscopia de fluorescência desta tese¹¹. As diluições seriadas foram preparadas em base 2, ou seja, preparou-se uma solução estoque de nanopartículas e esta foi diluída em série em 10 recipientes contendo o mesmo volume de meio DMEM sem soro, de tal forma que a primeira diluição realizada é a mais concentrada e a última, a mais diluída.

Tabela 3.2: Concentrações de AgNPs IQ-USP e Khemia[®] utilizadas nos experimentos deste trabalho.

Diluição em série	1	2	3	4	5	6	7	8
%	50	25	12.5	6.25	3.16	1.56	0.78	0.39
Concentração (μg/ml)	75.00	37.50	18.75	9.37	4.68	2.34	1.17	0.58

Quando realiza-se os ensaios de citotoxicidade, a leitura das densidades ópticas (DO) obtidas no espectrofotômetro deve ser comparada com o controle celular negativo (o qual contém apenas meio de cultivo e células) e considerado como 100% de viabilidade. O controle negativo é importante para verificar a eficácia do ensaio. Geralmente, as absorbâncias do controle devem ser superior a 0.400 u. a. para o ensaio poder ser

¹¹As mesmas concentrações de nanopartículas também foram utilizadas em experimentos do Capítulo 4.

validado e considerado eficiente. Esse valor está muito relacionado à confluência celular. Se as células não tiverem formado uma monocamada confluyente, as absorbâncias de controle serão baixas. A utilização do corante vermelho neutro se faz necessária, uma vez que, por intermédio da coloração visível nos poços da microplaca, pode-se verificar onde existe maior morte celular. A absorção de vermelho neutro depende da capacidade da célula para manter gradientes de pH, através da produção de ATP. Em pH fisiológico, o corante apresenta uma carga líquida próxima a zero, permitindo que ele penetre nas membranas da célula. Dentro dos lisossomos, há um gradiente de prótons para manter um pH menor do que o do citoplasma. Assim, o corante é carregado e é retido dentro dos lisossomos (Repetto et al., 2008). Através da observação experimental, pode-se inferir que onde as nanopartículas de prata estiverem agindo de forma mais eficaz, a coloração torna-se transparente, pois não há captura do vermelho neutro pelos lisossomos. Se, por outro lado, as células estiverem vivas, a coloração dos poços exibe tonalidade de vermelho.

Quando se projeta a média da porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração das AgNPs, pode-se obter um perfil que fornece o índice de citotoxicidade (IC_{50}). As Figuras 3.11, 3.12 e 3.13 apresentam esses gráficos para nanopartículas IQ-USP. As Figuras 3.14, 3.15 e 3.16 apresentam os testes realizados para nanopartículas Khemia®. Os gráficos mostram a porcentagem de células viáveis em função da concentração de nanopartículas. Cada ponto em azul (círculo cheio) corresponde à média das densidades ópticas para cada concentração de AgNPs em relação à média das densidades de controle e representa o percentual de células viáveis em determinada concentração de AgNPs, dado pela seguinte equação (Wan et al., 2016):

$$\% \text{ células viáveis} = \left(\frac{DO}{DC} \right) \times 100 \quad (3.9)$$

sendo:

DO a média das densidades ópticas obtidas para poços com a mesma concentração de AgNPs e

DC a média das densidades de controle.

As incertezas das medidas foram calculadas utilizando teoria de erros (Vuolo, 2000), através da equação:

$$\sigma_{\% \text{ células viáveis}} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{DO}}{DO} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_{DC}}{DC} \right)^2} \times \% \text{ células viáveis} \quad (3.10)$$

sendo:

σ_{DO} e σ_{DC} os desvios padrão da média das densidades ópticas e da média das densidades de controle, respectivamente.

Os dados são ajustados por funções de Hill ([Gadagkar & Call, 2015](#)), que produzem curvas sigmoidais e fornecem um bom ajuste para gráficos que exibem comportamentos do tipo dose–resposta. A fim de facilitar esse ajuste, o eixo das abscissas, onde estão representadas as concentrações, é transformado em log na base onde as respectivas diluições foram efetuadas, no caso, base 2. A equação de ajuste das curvas é dada por:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log_{IC50} - x)p}}, \quad (3.11)$$

sendo:

y a resposta;

A_1 valor inicial ou mínimo de resposta;

A_2 valor final ou máximo de resposta;

$\log_{IC50}$ é o logaritmo de x na resposta a meio caminho entre o valor inicial e o valor final.

p o coeficiente de Hill, que descreve a inclinação da curva.

O IC_{50} é calculado com o auxílio da curva ajustada pela função de Hill, fazendo uso da seguinte equação:

$$y = A_2 - 50\%(A_2 - A_1) \quad (3.12)$$

Dessa forma, o IC_{50} é o valor do eixo x (concentração de AgNPs) no qual a curva de Hill passa, no nível da resposta (% viabilidade celular) calculada com a Equação 3.12.

Figura 3.11: Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro realizado para AgNPs IQ-USP. *Figura do autor.*

Em todos os gráficos apresentados nestes dois ensaios, existe uma mesma curva referente ao SDS (*sodium dodecyl sulfate*), representada nos gráficos por triângulos invertidos cheios, em preto. O SDS é um surfactante, que está entre os principais agentes químicos com capacidade lítica¹². São compostos orgânicos que interferem nas interações proteína-proteína, lípido-lípido e proteína-lípido da membrana plasmática, desintegrando-a. O SDS foi preparado nas mesmas concentrações das AgNPs.

Nishi et al. (1995) estudaram a citotoxicidade do SDS com a incorporação do corante vermelho neutro para células NCTC L-929 e determinaram o valor de $IC_{50} = 59 \mu g/ml$, mostrando que concentrações acima desta induzem morte celular. Em nossos ensaios, o valor de IC_{50} para a curva de SDS foi estimado em $10.5 \pm 3.8 \mu g/ml$, um valor bem inferior ao encontrado na literatura, de forma que o SDS pôde ser utilizado como uma curva de referência para compararmos com as curvas que exibem o comportamento das nanopartículas.

Figura 3.12: Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro realizado para AgNPs IQ-USP. *Figura do autor.*

AgNPs IQ-USP apresentaram um comportamento mais coerente com a curva de SDS, com alguns valores muito próximos. Os valores de IC_{50} para essas nanopartículas foram calculados como sendo: $IC_{50} = 13.5 \pm 1.3 \mu g/ml$ (Figura 3.11); $IC_{50} = 11.8 \pm$

¹²Lise celular é o processo de destruição ou dissolução da célula, causada pela ruptura da membrana plasmática. É um processo natural que ocorre em situações como a digestão ou na luta contra agentes infecciosos e pode ser reproduzida em laboratório, sendo usada em processos de purificação de organelas e proteínas e na extração de ácidos nucleicos (DNA ou RNA).

$2.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3.12) e $\text{IC}_{50} = 9.1 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3.13). Considerando o erro experimental, o IC_{50} variou na faixa de 7.4 a $14.8 \mu\text{g}/\text{mL}$, o que nos informa que até a 4a. diluição realizada (Tabela 3.2), as células sofrem mais dano, havendo, pelo menos, 50% das células por poço da microplaca parcialmente ou totalmente mortas nessa faixa de concentração. De fato, observando os gráficos, percebemos que as concentrações mais altas são mais citotóxicas, verificada pela resposta da baixíssima viabilidade celular.

A leitura das absorvâncias (densidades ópticas) nos poços onde foram depositados uma maior concentração de nanopartículas aparece em torno de ~ 0.100 u. a. Por vezes, dependendo do tipo de nanopartícula que é utilizada e, principalmente, se estados de agregação são verificados, as absorvâncias para concentrações mais altas exibem um resultado falso-positivo, fornecendo valores superiores a 0.400 u. a. Porém, as absorvâncias de controle costumam exibir um valor semelhante. Este valor, no entanto, está correto, uma vez que os poços de controle estão completamente cheios de células. Todavia, o que faz com que as absorvâncias para concentrações mais elevadas de AgNPs exibam um resultado semelhante é a deposição das nanopartículas, que destroem parte das células e se depositam no fundo dos poços, interferindo nas medidas de absorvância. É necessário, portanto, algumas lavagens extras nesses poços, com PBS, antes de ser adicionada a solução dessorvente para lisar as células vivas.

Figura 3.13: Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro realizado para AgNPs IQ-USP. *Figura do autor.*

AgNPs Khemia® apresentaram perfis de viabilidade celular em função da concentração bem distintos, tanto das AgNPs IQ-USP quanto do SDS. É possível observar

que quanto maior o número de concentrações que promovem baixas percentagens de viabilidade celular, mais o perfil se distancia para a esquerda do gráfico, consequentemente se afastando dos valores encontrados para SDS. Podemos observar que, quanto mais para a esquerda do gráfico estiver o perfil, maior a chance das concentrações mais baixas de nanopartículas apresentarem citotoxicidade.

Figura 3.14: Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro realizado para AgNPs Khemia®. *Figura do autor.*

Os valores de IC_{50} para essas nanopartículas (Khemia®) foram calculados como sendo: $IC_{50} = 2.7 \pm 1.4 \mu g/ml$ (Figura 3.14); $IC_{50} = 4.7 \pm 1.2 \mu g/ml$ (Figura 3.15) e $IC_{50} = 4.7 \pm 2.0 \mu g/ml$ (Figura 3.16). Considerando o erro experimental, o IC_{50} variou na faixa de 1.3 a $6.7 \mu g/ml$, o que nos informa que até a 7a. diluição realizada (Tabela 3.2), as células sofrem mais danos.

Os resultados nos mostram que AgNPs Khemia® são pelo menos duas vezes mais citotóxicas que as AgNPs IQ-USP, quando comparamos as faixas de atuação de IC_{50} . Também observou-se que as quatro primeiras diluições se mostraram altamente citotóxicas, promovendo inibição de cerca de 75% da viabilidade celular, ao passo que as mesmas diluições para AgNPs IQ-USP promoveram inibição de cerca de 15%. Viabilidade celular acima de 80% foram verificadas para as concentrações $4.68 \mu g/ml$, $2.34 \mu g/ml$, $1.17 \mu g/ml$ e $0.58 \mu g/ml$ para AgNPs IQ-USP, enquanto que para as nanopartículas Khemia®, apenas as concentrações $1.17 \mu g/ml$ e $0.58 \mu g/ml$ apresentaram a mesma viabilidade.

Figura 3.15: Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro realizado para AgNPs Khemia®. *Figura do autor.*

Figura 3.16: Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro realizado para AgNPs Khemia®. *Figura do autor.*

Todos os ajustes realizados apresentaram um bom resultado, com coeficiente de correlação, $R^2 \geq 0.94$. Os ajustes realizados para as curvas obtidas para as AgNPs

Khemia[®] apresentaram Chi quadrado reduzido. Isto se deve, provavelmente, ao fato das nanopartículas, por serem mais reativas, se agregarem em meio a fluidos biológicos (Mukherjee et al., 2012), não apresentando uniformidade nos poços, fazendo com que, as células analisadas para um mesma concentração de nanopartículas apresentassem algumas variações nas densidades ópticas, o que contribui para o aumento do desvio padrão e isto, por sua vez, influencia na qualidade do ajuste dos dados. Todavia, o modelo escolhido se mostrou bastante adequado e conseguiu ajustar os dados, evidenciando o comportamento das concentrações de nanopartículas nas células.

Com relação à morte celular por apoptose, a principal hipótese é de que as nanopartículas de prata interfiram no potencial mitocondrial. Trabalhos de Hussain et al. (2005) indicaram as mitocôndrias como alvo principal das nanopartículas de prata. AshaRani et al. (2008) também relataram a diminuição da atividade metabólica associada a uma redução na produção de ATP em células expostas a AgNPs, sugerindo a ocorrência de disfunção mitocondrial. Orłowski et al. (2012) estudaram células do tecido epitelial e relataram que exposição às concentrações mais alta de AgNPs de $10 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ resultou em colapso do potencial de membrana mitocondrial. O potencial de membrana é fundamental para manter a função fisiológica da cadeia respiratória e gerar ATP. Aberturas de poros levam ao colapso do potencial e posterior libertação do citocromo c¹³ no citosol. Existem marcadores biológicos (corantes) fluorescentes, catiônicos (positivamente carregados) para detectar mudanças no potencial de membrana. Os marcadores se acumulam em proporção inversa ao potencial de membrana, ou seja, quanto mais positivo o potencial, menos corante se acumula, evidenciando o fato de que a célula está em fase apoptótica. A desvantagem é que alguns desses corantes podem ter um alto custo, o que acaba inviabilizando as intenções de algumas pesquisas.

Quanto à morte celular por necrose, mudanças no pH podem levar à liberação de íons de prata a partir de superfícies de nanopartículas, que podem perturbar a membrana celular e consequentemente causar necrose (Chen & Schluesener, 2008). Park et al. (2011a) mostraram toxicidade de AgNPs revestidas com PVP dependente do tamanho em macrófagos. Em seu trabalho, verificou-se que AgNPs de 4 nm causaram 36% de viabilidade celular para uma concentração de $3.12 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ de nanopartículas, enquanto que nanopartículas de 70 nm não apresentavam toxicidade até $50 \mu\text{g}/\text{m}\ell$, sendo a apoptose referida como um mecanismo de morte dessas células. Zanette et al. (2011)

¹³Citocromo c consiste em uma pequena proteína que exerce função fundamental na cadeia respiratória, transportando elétrons. Ele é um importante ativador da via pela qual ocorre a apoptose, que por sua vez, é um processo complexo que envolve muitos mediadores diferentes. Quando a célula sofre um estímulo que provoca a libertação do citocromo c no citosol, inicia-se a ativação das caspases, que desempenham um papel fundamental na resposta apoptótica. Estando no citosol, o citocromo c provoca a liberação de cálcio armazenado no retículo endoplasmático, tornando o citosol mais iônico. O cálcio contribui para estimular mais citocromo c para o citosol, que por sua vez, ativa mais caspases, que liberam substâncias que fazem com que a célula morra por apoptose.

relataram que as AgNP revestidas com PVP causaram redução da função mitocondrial, mas não provocaram necrose na linhagem celular de queratinócitos humanos HaCaT.

Para explorar a morte celular induzida pelos dois tipos de nanopartículas, algumas características morfológicas do núcleo celular foram consideradas. A Figura 3.17 apresenta o resultado da coloração com Hoechst 33342[®]. As células saudáveis exibiram núcleos fluorescentes azuis uniformes, com uma coloração azul mais apagada e uma morfologia uniforme nos controles, enquanto as células tratadas com AgNPs apresentaram núcleos fluorescentes de profundidade azul (células apoptóticas precoces com núcleos condensados). Esses núcleos azuis brilhantes são devido à condensação e fragmentação da cromatina, presente nos núcleos celulares (Rahman et al., 2013).

Figura 3.17: Microscopia de fluorescência. Os painéis apresentam alterações morfológicas em núcleos de células RASM na presença de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. (A–H) AgNPs IQ–USP. (I–P) nanopartículas de prata Khemia[®]. (A, I) 75.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (B, J) 37.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (C, K) 18.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (D, L) 9.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (E, M) 4.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (F, N) 2.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (G, O) 1.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (H, P) 0.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (Q–T) controles. Setas amarelas indicam células viáveis com núcleos normais, setas verdes indicam células vivas com núcleos apoptóticos e setas magentas indicam a destruição do núcleo celular, evidenciando necrose. *Figura do autor.*

A observação dos núcleos celulares das células RASM durante 24 horas de exposição às AgNPs apresentou alterações morfológicas significativas quando comparadas aos controles. Como pode ser observado Figura 3.17 (Q–T), as células de controle ou sem exposição à AgNPs se apresentaram intactas, ovaladas e com os núcleos corados com uma fluorescência azul menos brilhante. As células tratadas com AgNPs apresentaram características típicas da apoptose, como o encolhimento celular, a condensação da cromatina e a fragmentação em múltiplos corpos segregados, a formação de corpos apoptóticos e o decréscimo celular. Os núcleos picnóticos¹⁴ apoptóticos mostraram claramente cromatina altamente condensada ou fragmentada que aparecem uniformemente fluorescente (Figura 3.17 (D, E, F, G, H, L, M)).

As alterações morfológicas das células, aparentemente necróticas, como a perda de integridade do núcleo, podem ser vistas claramente em células tratadas com concentrações mais altas de AgNPs.

Com relação às AgNPs IQ–USP (Figura 3.17 (A–H)), concentrações mais altas provocaram cariorrexe, onde a fragmentação destrutiva do núcleo de células mortas podem ser vistas (Figura 3.17 (A, B, C)) e, aparentemente também cariólise, onde se verifica a completa dissolução da cromatina de uma célula moribunda devido à degradação enzimática produzida por endonucleases, que são enzimas produzidas durante a clivagem (corte) do DNA e destroem a molécula de DNA através do reconhecimento de sequências nucleotídicas específicas. Cariólise ocorre na necrose, enquanto que na apoptose, após a cariorrexe, o núcleo celular se dissolve e na célula se formam corpos apoptóticos (Kumar, 1998).

Nas concentrações intermediárias (Figura 3.17 (D, E, F)) células vivas com núcleos apoptóticos podem ser vistas em meio a células viáveis. Também a concentração celular desses poços são mais altas, quando comparadas aos poços com células em que foram testadas concentrações mais altas de AgNPs. Nas últimas concentrações, com menos nanopartículas, pode-se observar que a viabilidade celular aumenta, e as células são comparadas às células do grupo de controle, quanto às características morfológicas. Eventualmente podem surgir células com núcleos apoptóticos.

Com relação às AgNPs Khemia[®], pode-se inicialmente perceber a diferença da concentração celular em relação ao grupo controle. Embora todos os poços tenham sido preparados com a mesma quantidade de células, após o término dos procedimentos para execução da microscopia de fluorescência, somente poucas células tratadas com AgNPs Khemia[®] restaram nos poços. Isto pode ser explicado pelo caráter citotóxico maior dessas AgNPs. Ao interagirem mais diretamente com as células, as AgNPs provocam mudança na viscosidade e elasticidade das células, modificando a maneira como

¹⁴Núcleo picnótico em citologia é um núcleo celular cuja cromatina está extremamente condensada devido a um processo patológico. A picnose (condensação da cromatina nuclear) é um processo que indica a apoptose do tecido.

se dá a ancoragem entre célula-poço de cultivo, conforme discutiremos no próximo capítulo. Deste modo, as células facilmente se desprendem durante as lavagens, restando poucas células nos poços. Em concentrações mais altas, (Figura 3.17 (I, J, K)) os núcleos aparecem fragmentados, perdendo a característica ovalada e apresentando uma morfologia disforme. Nas concentrações 37.5 e 18.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3.17 (J, K)), quase não foi possível observar algum vestígio de núcleo celular nas células presentes nos poços.

Concentrações intermediárias, apesar das amostras conterem menos células, apresentaram características comparáveis às AgNPs IQ-USP, com células apoptóticas em meio à células viáveis. Nas concentrações mais baixas (Figura 3.17 (I, J, K)) apenas células viáveis foram observadas.

Referências

- Alencar, A. M. d. (2015). *Multiescala no sistema cardiorespiratório*. Tese de Livre Docência. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J., & Paknikar, K. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 236(3), 310–318. DOI: [10.1016/j.taap.2009.02.020](https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.02.020).
- Asharani, P., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, 10(1), 65. DOI: [10.1186/1471-2121-10-65](https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65).
- AshaRani, P., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*, 3(2), 279–290. DOI: [10.1021/nm800596w](https://doi.org/10.1021/nm800596w).
- Badawy, A. M. E., Luxton, T. P., Silva, R. G., Scheckel, K. G., Suidan, M. T., & Tolaymat, T. M. (2010). Impact of environmental conditions (ph, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental science & technology*, 44(4), 1260–1266. DOI: [10.1021/es902240k](https://doi.org/10.1021/es902240k).
- Bakke, A. M., Glover, C., Krogdahl, Å., et al. (2010). Feeding, digestion and absorption of nutrients. *Fish physiology*, 30, 57–110. DOI: [10.1016/S1546-5098\(10\)03002-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03002-5).
- Behra, R., Sigg, L., Clift, M. J., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2013). Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(87), 20130396.
- Bell, R. A. & Kramer, J. R. (1999). Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: Critical review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 9–22. DOI: [10.1002/etc.5620180103](https://doi.org/10.1002/etc.5620180103).
- Borenfreund, E. & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24(2-3), 119–124. DOI: [10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).

- Burchardt, A. D., Carvalho, R. N., Valente, A., Nativo, P., Gilliland, D., García, C. P., Passarella, R., Pedroni, V., Rossi, F., & Lettieri, T. (2012). Effects of silver nanoparticles in diatom *thalassiosira pseudonana* and cyanobacterium *synechococcus* sp. *Environmental science & technology*, 46(20), 11336–11344. DOI: [10.1021/es300989e](https://doi.org/10.1021/es300989e).
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*, 112(43), 13608–13619. DOI: [10.1021/jp712087m](https://doi.org/10.1021/jp712087m).
- Carvalho, H. F. & Recco-Pimentel, S. M. (2007). *A célula*. Manole.
- Chamley, J. H., Campbell, G. R., McConnell, J. D., & Gröschel-Stewart, U. (1977). Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture. *Cell and tissue research*, 177(4), 503–522. DOI: [10.1007/BF00220611](https://doi.org/10.1007/BF00220611).
- Chamley-Campbell, J. H. & Campbell, G. R. (1981). What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis*, 40(3-4), 347–357. DOI: [10.1016/0021-9150\(81\)90145-3](https://doi.org/10.1016/0021-9150(81)90145-3).
- Chen, M. & von Mikecz, A. (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to siro 2 nanoparticles. *Experimental cell research*, 305(1), 51–62. DOI: [10.1016/j.yexcr.2004.12.021](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.12.021).
- Chen, X. & Schluesener, H. (2008). Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicology letters*, 176(1), 1–12. DOI: [10.1016/j.toxlet.2007.10.004](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004).
- Chen, Z., Campbell, P. G., & Fortin, C. (2012). Silver binding by humic acid as determined by equilibrium ion-exchange and dialysis. *The Journal of Physical Chemistry A*, 116(25), 6532–6539. DOI: [10.1021/jp212403r](https://doi.org/10.1021/jp212403r).
- Chernousova, S. & Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), 1636–1653. DOI: [10.1002/anie.201205923](https://doi.org/10.1002/anie.201205923).
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D., & Green, D. R. (2005). Puma couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*, 309(5741), 1732–1735. DOI: [10.1126/science.1114297](https://doi.org/10.1126/science.1114297).
- Chithrani, B. D. & Chan, W. C. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano letters*, 7(6), 1542–1550. DOI: [10.1021/nl070363y](https://doi.org/10.1021/nl070363y).
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*, 6(4), 662–668. DOI: [10.1021/nl052396o](https://doi.org/10.1021/nl052396o).
- Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska, J., Lankoff, A., Oczkowski, M., Krawczyńska, A., Chwastowska, J., Sadowska-Bratek, M., Chajduk, E., Wojewódzka, M., Dušinská, M., et al. (2012). Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 32(11), 920–928. DOI: [10.1002/jat.2758](https://doi.org/10.1002/jat.2758).

- Eom, H.-J. & Choi, J. (2010). p38 mapk activation, dna damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in jurkat t cells. *Environmental science & technology*, 44(21), 8337–8342. DOI: [10.1021/es1020668](https://doi.org/10.1021/es1020668).
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J., & Autrup, H. (2009). Pvp-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in thp-1 monocytes. *Toxicology letters*, 190(2), 156–162. DOI: [10.1016/j.toxlet.2009.07.009](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009).
- Freshney, R. (1987). Animal cell culture: A manual of basic techniques. New York, Alan R Lis. DOI: [10.1021/es2037405](https://doi.org/10.1021/es2037405).
- Gadagkar, S. R. & Call, G. B. (2015). Computational tools for fitting the hill equation to dose–response curves. *Journal of Pharmacological and Toxicological methods*, 71, 68–76. DOI: [10.1016/j.vascn.2014.08.006](https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.08.006).
- Gondikas, A. P., Morris, A., Reinsch, B. C., Marinakos, S. M., Lowry, G. V., & Hsu-Kim, H. (2012). Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. *Environmental science & technology*, 46(13), 7037–7045. DOI: [10.1021/es3001757](https://doi.org/10.1021/es3001757).
- Gopinath, P., Gogoi, S. K., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A., & Ghosh, S. S. (2010). Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 240–245. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2010.01.033](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.033).
- Hajipour, M. J., Laurent, S., Aghaie, A., Rezaee, F., & Mahmoudi, M. (2014). Personalized protein coronas: a “key” factor at the nanobiointerface. *Biomaterials Science*, 2(9), 1210–1221. DOI: [10.1039/C4BM00131A](https://doi.org/10.1039/C4BM00131A).
- Hauck, T. S., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. (2008). Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small*, 4(1), 153–159. DOI: [10.1002/smll.200700217](https://doi.org/10.1002/smll.200700217).
- Herrin, R. T., Andren, A. W., Shafer, M. M., & Armstrong, D. E. (2001). Determination of silver speciation in natural waters. 2. binding strength of silver ligands in surface freshwaters. *Environmental science & technology*, 35(10), 1959–1966. DOI: [10.1021/es001510w](https://doi.org/10.1021/es001510w).
- Herzog, F., Clift, M. J., Piccapietra, F., Behra, R., Schmid, O., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2013). Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface. *Part Fibre Toxicol*, 10(11), b22. DOI: [10.1186/1743-8977-10-11](https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-11).
- Hsin, Y.-H., Chen, C.-F., Huang, S., Shih, T.-S., Lai, P.-S., & Chueh, P. J. (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ros-and jnk-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in nih3t3 cells. *Toxicology letters*, 179(3), 130–139. DOI: [10.1016/j.toxlet.2008.04.015](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.04.015).
- Huergo, M., Pasquale, M., González, P., Bolzán, A., & Arvia, A. (2011). Dynamics and morphology characteristics of cell colonies with radially spreading growth fronts. *Physical Review E*, 84(2), 021917. DOI: [10.1103/PhysRevE.84.021917](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.84.021917).

- Hussain, S., Hess, K., Gearhart, J., Geiss, K., & Schlager, J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in brl 3a rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19(7), 975–983. DOI: [10.1016/j.tiv.2005.06.034](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.034).
- Jiang, Q., Yu, Y., Ruan, H., Luo, Y., & Guo, X. (2014). Morphological and functional characteristics of human gingival junctional epithelium. *BMC oral health*, 14(1), 30. DOI: [10.1186/1472-6831-14-30](https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-30).
- Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M., & Siegrist, H. (2011). Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environmental science & technology*, 45(9), 3902–3908. DOI: [10.1021/es1041892](https://doi.org/10.1021/es1041892).
- Khan, J. A., Pillai, B., Das, T. K., Singh, Y., & Maiti, S. (2007). Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in hela cells. *Chembiochem*, 8(11), 1237–1240. DOI: [10.1002/cbic.200700165](https://doi.org/10.1002/cbic.200700165).
- Kim, Y. S., Song, M. Y., Park, J. D., Song, K. S., Ryu, H. R., Chung, Y. H., Chang, H. K., Lee, J. H., Oh, K. H., Kelman, B. J., et al. (2010). Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 20. DOI: [10.1186/1743-8977-7-20](https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-20).
- Kruszewski, M., Brzoska, K., Brunborg, G., Asare, N., Dobrzynska, M.-g., Dusinska, M., Fjellsbø, L., Georgantzopoulou, A., Gromadzka, J., Gutleb, A. C., et al. (2011). Toxicity of silver nanomaterials in higher eukaryotes. *Adv Mol Toxicol*, 5, 179–218. DOI: [10.1016/B978-0-444-53864-2.00005-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53864-2.00005-0).
- Kumar, C. (1998). Collins. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Lee, Y., Kim, P., Yoon, J., Lee, B., Choi, K., Kil, K.-H., & Park, K. (2012). Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology*, 7(6), 1120–1130. DOI: [10.3109/17435390.2012.710660](https://doi.org/10.3109/17435390.2012.710660).
- Liu, J. & Hurt, R. H. (2010). Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental science & technology*, 44(6), 2169–2175. DOI: [10.1021/es9035557](https://doi.org/10.1021/es9035557).
- Liu, J., Sonshine, D. A., Shervani, S., & Hurt, R. H. (2010). Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS nano*, 4(11), 6903–6913. DOI: [10.1021/nn102272n](https://doi.org/10.1021/nn102272n).
- Lowry, G. V., Gregory, K. B., Apte, S. C., & Lead, J. R. (2012). Transformations of nanomaterials in the environment. *Environmental science & technology*, 46(13), 6893–6899. DOI: [0.1021/es300839e](https://doi.org/10.1021/es300839e).
- Marques, M. R., Loebenberg, R., & Almukainzi, M. (2011). Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol*, 18(3), 15–28. DOI: [10.14227/DT180311P15](https://doi.org/10.14227/DT180311P15).
- Martinolich, A. J., Park, G., Nakamoto, M. Y., Gate, R. E., & Wheeler, K. E. (2012). Structural and functional effects of cu metalloprotein-driven silver nanoparticle dissolution. *Environmental science & technology*, 46(11), 6355–6362. DOI: [10.1021/es300901h](https://doi.org/10.1021/es300901h).

- Medina, C., Santos-Martinez, M., Radomski, A., Corrigan, O., & Radomski, M. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British journal of pharmacology*, 150(5), 552–558. DOI: [10.1038/sj.bjp.0707130](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707130).
- Molinaro, E. M., Caputo, L. F. G., Amendoeira, M. R. R., et al. (2012). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 5.
- Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology*, 7(12), 779–786. DOI: [10.1038/nnano.2012.207](https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207).
- Mukherjee, S. G., O’Claonadh, N., Casey, A., & Chambers, G. (2012). Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(2), 238–251. DOI: [10.1016/j.tiv.2011.12.004](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.004).
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., & Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959–8964. DOI: [10.1021/es801785m](https://doi.org/10.1021/es801785m).
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, 8(7), 543–557. DOI: [10.1038/nmat2442](https://doi.org/10.1038/nmat2442).
- Nishi, C., Nakajima, N., & Ikada, Y. (1995). In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 29(7), 829–834. DOI: [10.1002/jbm.820290707](https://doi.org/10.1002/jbm.820290707).
- Orłowski, P., Krzyżowska, M., Winnicka, A., Chwalibóg, A., & Sawosz, E. (2012). Toxicity of silver nanoparticles in monocytes and keratinocytes: potential to induce inflammatory reactions. *Centr Eur J Immunol*, 37, 123–130.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913–922. DOI: [10.1007/s10495-007-0756-2](https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2).
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., & Jahnke-Dechent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3(11), 1941–1949. DOI: [10.1002/smll.200700378](https://doi.org/10.1002/smll.200700378).
- Park, J., Lim, D.-H., Lim, H.-J., Kwon, T., Choi, J.-s., Jeong, S., Choi, I.-H., & Cheon, J. (2011a). Size dependent macrophage responses and toxicological effects of ag nanoparticles. *Chemical communications*, 47(15), 4382–4384. DOI: [10.1039/C1CC10357A](https://doi.org/10.1039/C1CC10357A).
- Park, K., Park, E.-J., Chun, I. K., Choi, K., Lee, S. H., Yoon, J., & Lee, B. C. (2011b). Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Archives of pharmacal research*, 34(1), 153–158. DOI: [10.1007/s12272-011-0118-z](https://doi.org/10.1007/s12272-011-0118-z).
- Park, S., Lee, Y. K., Jung, M., Kim, K. H., Chung, N., Ahn, E.-K., Lim, Y., & Lee, K.-H. (2007). Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhalation toxicology*, 19(sup1), 59–65. DOI: [10.1080/08958370701493282](https://doi.org/10.1080/08958370701493282).

- Rahman, S. A., Nur, S., Abdul Wahab, N., Malek, A., & Nurestri, S. (2013). In vitro morphological assessment of apoptosis induced by antiproliferative constituents from the rhizomes of curcuma zedoaria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. DOI: [10.1155/2013/257108](https://doi.org/10.1155/2013/257108).
- Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), 1125. DOI: [10.1038/nprot.2008.75](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75).
- Song, J. E., Phenrat, T., Marinakos, S., Xiao, Y., Liu, J., Wiesner, M. R., Tilton, R. D., & Lowry, G. V. (2011). Hydrophobic interactions increase attachment of gum arabic- and pvp-coated ag nanoparticles to hydrophobic surfaces. *Environmental science & technology*, 45(14), 5988–5995. DOI: [10.1021/es200547c](https://doi.org/10.1021/es200547c).
- Tejamaya, M., Roemer, I., Merrifield, R. C., & Lead, J. R. (2012). Stability of citrate, pvp, and peg coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental science & technology*, 46(13), 7011–7017. DOI: [10.1021/es2038596](https://doi.org/10.1021/es2038596).
- Tolaymat, T. M., El Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., & Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*, 408(5), 999–1006. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.003).
- Urban, D. A., Rodriguez-Lorenzo, L., Balog, S., Kinnear, C., Rothen-Rutishauser, B., & Petri-Fink, A. (2015). Plasmonic nanoparticles and their characterization in physiological fluids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2015.05.053](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.053).
- van der Zande, M., Vandebriel, R. J., Van Doren, E., Kramer, E., Herrera Rivera, Z., Serrano-Rojero, C. S., Gremmer, E. R., Mast, J., Peters, R. J., Hollman, P. C., et al. (2012). Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS nano*, 6(8), 7427–7442. DOI: [10.1021/nm302649p](https://doi.org/10.1021/nm302649p).
- Vuolo, J. (2000). Fundamentals of errors theory. *Edgard Blücher, São Paulo*.
- Wan, G., Ruan, L., Yin, Y., Yang, T., Ge, M., & Cheng, X. (2016). Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria acinetobacter baumannii. *International journal of nanomedicine*, 11, 3789. DOI: [10.2147/IJN.S104166](https://doi.org/10.2147/IJN.S104166).
- Wang, Q., Zheng, X., Yang, L., Shi, F., Gao, L., Zhong, Y., Sun, H., He, F., Lin, Y., & Wang, X. (2010). Reactive oxygen species-mediated apoptosis contributes to chemosensitization effect of saikosaponins on cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 29(1), 159–164. DOI: [10.1186/1756-9966-29-159](https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-159).
- Xiu, Z.-M., Ma, J., & Alvarez, P. J. (2011). Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environmental science & technology*, 45(20), 9003–9008. DOI: [10.1021/es201918f](https://doi.org/10.1021/es201918f).
- Yang, X., Gondikas, A. P., Marinakos, S. M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H., & Meyer, J. N. (2011). Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver

and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental science & technology*, 46(2), 1119–1127. DOI: [10.1021/es202417t](https://doi.org/10.1021/es202417t).

Yang, Z., Liu, Z., Allaker, R., Reip, P., Oxford, J., Ahmad, Z., & Ren, G. (2010). A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *Journal of the Royal Society Interface*, (pp. rsif20100158). DOI: [10.1098/rsif.2010.0158.focus](https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0158.focus).

Yau-Young, A. O., Shio, H., & Fowler, S. (1981). Growth, biochemistry, and morphology of isolated rabbit aortic smooth muscle cells maintained in the presence or absence of serum. *Journal of cellular physiology*, 108(3), 461–473. DOI: [10.1002/jcp.1041080321](https://doi.org/10.1002/jcp.1041080321).

Yen, H.-J., Hsu, S.-h., & Tsai, C.-L. (2009). Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*, 5(13), 1553–1561. DOI: [10.1002/smll.200900126](https://doi.org/10.1002/smll.200900126).

Yuan, Y., Liu, C., Qian, J., Wang, J., & Zhang, Y. (2010). Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma hepg2 cells. *Biomaterials*, 31(4), 730–740. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2009.09.088](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.088).

Zanette, C., Pelin, M., Crosera, M., Adami, G., Bovenzi, M., Larese, F. F., & Florio, C. (2011). Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte hacat cell line. *Toxicology in Vitro*, 25(5), 1053–1060. DOI: [10.1016/j.tiv.2011.04.005](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.005).

Capítulo 4

MECÂNICA CELULAR

A microrreologia consiste de uma série de abordagens que tentam superar limitações em reologia, permitindo trabalhar com volumes muito pequenos, como microlitros. Ao utilizar microrreologia em células vivas, podemos obter dados microrreológicos, como a viscosidade e elasticidade, que podem complementar a interpretação de estudos com nanopartículas. Neste capítulo, descreveremos o uso de uma técnica conhecida como Citometria Óptica de Torção Magnética, para obtenção da viscosidade e elasticidade de células na presença de nanopartículas de prata.

A BIOMECÂNICA MODERNA teve início na década de 1960, com contribuições da mecânica dos meios contínuos e, mais recentemente, tecnologia computacional (Fung, 1993). Denominamos *Reologia* um dos ramos da mecânica dos meios contínuos, o qual é um assunto interdisciplinar, distribuído entre as diferentes comunidades científicas, incluindo engenheiros químicos, físicos, cientistas de materiais e, mais recentemente, biólogos (Larson, 1999). É também notável como um assunto de extrema importância industrial; uma gama muito ampla de tecnologias, desde tintas para alimentos, de recuperação de petróleo para processamento de plásticos, todos dependem fortemente de compreender o comportamento de fluidos complexos (Larson, 1999). Diversas medições de reologia deram informações valiosas sobre os rearranjos estruturais e resposta mecânica de uma vasta gama de materiais. Elas são particularmente valiosas na caracterização de materiais macios ou fluidos complexos, tais como suspensões, soluções coloidais de polímeros e géis, emulsões, e misturas de agentes tensioativos (Ferry, 1980; Macosko & Larson, 1994; Larson, 1999).

Fluidos newtonianos simples são caracterizados por ter uma viscosidade e uma elasticidade desprezível. Sólidos hookeanos simples não fluem e são caracterizados por um módulo de elasticidade (Alencar, 2015). Estes dois comportamentos limitantes claramente não podem descrever um vasto número de materiais macios (*soft*), que são tanto viscosos quanto elásticos sobre a escala de tempo em que são detectados (Breuer, 2005). Estes materiais são descritos como *soft glassy materials* e compreendem diversos materiais como polímeros, coloides, surfactantes e células biológicas. Tradicionalmente, os materiais viscoelásticos têm sido estudados com reômetros mecânicos, em várias geometrias de deformação, dependendo da extensão de deformação e da magnitude dos módulos a serem medidos (Breuer, 2005).

No entanto, as técnicas mecânicas reológicas convencionais nem sempre são adequadas para descrever o comportamento de todos os sistemas. Tipicamente, são necessários volumes de amostras em mililitros, impedindo o estudo de materiais raros ou preciosos, incluindo muitas amostras biológicas, que são difíceis de obter em grandes quantidades (Breuer, 2005). Neste capítulo vamos descrever como a microrreologia se aplica ao estudo de células vivas, evidenciando como técnicas de microrreologia ativa são utilizadas para medir propriedades mecânicas celulares.

4.1 Microrreologia

Microrreologia é um termo que não descreve uma técnica em particular, mas sim uma série de abordagens que tentam superar algumas limitações graves de reologia em massa tradicional, tais como a faixa de frequência e módulos que podem ser sondados, o tamanho da amostra, heterogeneidade e custo (Cicuta & Donald, 2007). O termo *micro* refere-se ao tamanho da sonda de tensão/deformação, que é tipicamente uma partícula coloidal de tamanho de *mícron*, mas indica também que este tipo de reologia pode ser realizado em volumes muito pequenos, como microlitros. As vantagens oferecidas por abordagens microrreológicas, fizeram estas medidas muito populares na última década, e abriram-se novos campos de investigação. A geometria não convencional e as condições encontradas em experimentos microrreológicos também levantaram uma série de desafios teóricos que ainda não estão totalmente resolvidas (Cicuta & Donald, 2007).

Com relação ao uso de microrreologia em células vivas, dados microrreológicos celulares podem ser obtidos usando dois tipos de técnicas: ativas e passivas, ou técnicas de aplicação de força e sensíveis a forças (Rodriguez et al., 2013). Na microrreologia ativa, é aplicada uma distensão ou pressão externa em uma sonda e medida a pressão, ou distensão, resultante. Podem-se citar: pinças ópticas, pinças magnéticas e citometria óptica de torção magnética, *optical magnetic twisting cytometry* (OMTC). Existe uma particularidade em comum nas referidas técnicas: esferas de poucos micrômetros de diâmetro são utilizadas como sonda na superfície celular ou em seu interior. Então, uma carga mecânica é aplicada nas microesferas, usando pinças ou torções magnéticas (Lenormand et al., 2008; Fabry et al., 2001; Lenormand & Fredberg, 2005). Enquanto as microesferas se movem, elas deformam a célula à qual estão vinculada, e a célula resiste a esse movimento com uma pressão interna que depende de suas propriedades mecânicas. Podemos citar outras técnicas que utilizam aplicação de forças, como micropipeta de aspiração, estimulação acústica, aparatos de microfluídica, dentre outras (Alencar, 2015).

Na microrreologia passiva usa-se movimentos espontâneos termicamente dirigidos de uma sonda para inferir propriedades mecânicas do meio envolvente. Podemos citar: microrreologia de um ponto e dois pontos, e difusão anômala (Lenormand et al., 2008). Também pode-se citar outras técnicas sensíveis à forças, como a microscopia de força atômica (AFM), microscopia de força de tração (TFM), dentre outras (Rodriguez et al., 2013). Mais adiante, iremos tratar da técnica conhecida como Citometria Óptica de Torção Magnética, utilizada na determinação das propriedades mecânicas celulares, um dos objetivos de estudo desta tese.

4.2 Citoesqueleto

As proteínas mais abundantes nas células de todos os tecidos são aqueles que formam o citoesqueleto (CSK), tais como actina e miosina. O CSK é responsável por manter a estrutura celular e sua rigidez e é responsável por diversas funções na célula, como adesão e migração, dentre outras (Mofrad, 2009). O citoesqueleto das células nucleadas (eucariotos) consiste de três componentes distintos: a rede de actina-miosina, a rede de microtúbulos, e a rede de filamentos intermediários (Howard et al., 2001). A Figura 4.1 ilustra cada um desses componentes. A rede de actina-miosina está geralmente localizada no córtex e bordas exteriores, perto da membrana celular. Ela está ligada mecanicamente aos contatos adesivos que ancoram a célula para o substrato extracelular. Estes contatos contrabalançam as forças contráteis construídas pelos motores de miosina ativos na rede, levando a uma pré-tensão constante no citoesqueleto.

Em células altamente contráteis, os filamentos de actina e miosina podem alinhar e formar fibras de *stress* que se assemelham a fibras musculares. Estas fibras de *stress* não estão confinados no córtex, mas podem se estender por todo o corpo celular. Além da miosina, há um grande número de outros agentes de reticulação (*crosslinkers*), com propriedades amplamente variáveis. Tais agentes de ligação cruzada ligam a rede de actina-miosina em uma estrutura altamente versátil que pode satisfazer uma variedade de funções, tais como a formação de tipos diferentes de saliências.

Figura 4.1: *Constituintes principais do citoesqueleto: (A) estão representados os filamentos de actina, (B) filamentos intermediários, e (C) microtúbulos. Figura modificada de Mofrad (2009).*

Os microtúbulos são filamentos bastante rígidos que se estendem a partir de uma origem comum (centrossomo), localizado perto do núcleo da célula. Eles servem como vias para o transporte de carga intracelular e desempenham um papel importante na definição da polaridade celular e na orientação dos cromossomos durante a mitose. Na maioria das células aderentes, no entanto, eles desempenham apenas um papel menor na estabilização mecânica do citoesqueleto e equilibram as flutuações de tensão (Stamenović et al., 2002).

Filamentos intermediários consistem de um grupo grande de proteínas específicas de tecidos. Exemplos incluem queratina nas células epiteliais, vimentina em células mesenquimais, internexina em células neuronais e desmina em células musculares. Eles começam a contribuir significativamente para a resposta mecânica global da célula durante grandes deformações celulares, quando os filamentos intermediários tornam-se completamente estendidos e esticados (Janmey et al., 1991; Wang & Stamenović, 2000; Stamenović, 2008). Todos estes três componentes do citoesqueleto são altamente ligados uns aos outros, para o núcleo, e para a membrana celular (Eckes et al., 1998; Chancellor et al., 2010; Maniotis et al., 1997; Rodriguez et al., 2003). Sua contribuição individual para o comportamento mecânico celular não pode, portanto, ser facilmente separado. Isso precisa ser levado em conta quando se comparam estudos mecânicos celulares com experiências em redes de CSK reconstituídas.

4.3 Mecanismo de movimentação celular e Arquitetura da Actina

As células animais (ou seja, aquelas que não possuem parede celular) têm a capacidade de mudar a forma de se adaptar ao seu ambiente, se mover através de espaços estreitos, dividir, ou permitir exo e endocitose. A maquinaria destas alterações de forma baseia-se no conjunto de proteínas, em particular da actina, uma proteína globular que polimeriza em filamentos de diferentes tipos de redes: organização ramificados e reticulados, feixes paralelos, e as estruturas anti-paralelas contráteis (Figura 4.2).

Essas arquiteturas diferentes podem ser visualizadas como uma série de molas e amortecedores interligados ativos (símbolos verdes e vermelhos, respectivamente, na Figura 4.3) que atuam como elementos mecânicos para conduzir alterações de forma e motilidade celular (Blanchoin et al., 2014).

Na região frontal celular, ramificações e redes de ligações transversais em uma chapa quase bidimensional compõem o lamelipódio, e são o principal motor de movimentação das células, uma vez que eles empurram a membrana celular por polimerização de encontro dela (Figura 4.2 C). Feixes alinhados subjacentes, filopódios, que são as estruturas semelhantes a dedos na parte da frente da célula, são importantes para a resposta direcional da célula (Figura 4.2 D). Uma fina camada de actina, chamado o

córtex celular, reveste a membrana plasmática na parte traseira e dos lados da célula, e é importante para a manutenção de células e alterações de forma (Figura 4.2 A). O resto da célula contém uma rede tridimensional de filamentos reticulados intercalados com feixes contráteis, incluindo fibras de *stress* que ligam o citoesqueleto da célula com a matriz extracelular através dos locais de adesão focal (Figura 4.2 B).

A contração na célula é produzida pela proteína miosina, que funciona como um motor molecular. A miosina se acopla em mini-filamentos antissimétricos que, uma vez incorporada dentro de uma rede de actina, provocam, assim, deslizamento dos filamentos de actina, contração global no corpo celular e tensão em sítios de adesão focal (Blanchoin et al., 2014).

Figura 4.2: *Overlay da arquitetura da actina.* A representação esquemática da célula com as diferentes arquiteturas está indicada: (A) o córtex célula; (B) um exemplo de uma fibra contrátil, as fibras de stress; (C) o lamelipódio e (D) o filopódio. As regiões com zoom, em destaque, mostram especificidades arquitetônicas de diferentes regiões da célula. Figura adaptada de Blanchoin et al. (2014).

Para construir uma tal variedade de arquiteturas diferentes, as células utilizam uma bateria de proteínas acessórias que esculpem a rede de actina e controlam a resposta mecânica do CSK. Por sua vez, sinais mecânicos controlam a atividade bioquímica de filamentos de actina e proteínas que se ligam à actina. Enfim, a actina é importante e exerce papel fundamental no constante remodelamento do CSK, além de participar nos controles dos processos fisiológicos que ocorrem nas células.

Figura 4.3: Overlay do perfil mecânico da actina. Os retângulos vermelhos são os amortecedores que representam a rede de actina, enquanto os círculos verdes são molas ativas devido à atividade motora da miosina. Figura adaptada de [Blanchoin et al. \(2014\)](#).

4.4 Modelo de Maxwell para o estudo de propriedades mecânicas celulares

Quando são tensionados, os materiais perfeitamente elásticos podem sofrer deformações, mas retornam rapidamente ao seu estado original quando a tensão é removida, devolvendo ao sistema toda a energia momentaneamente armazenada. Para exemplificar, consideramos um sólido com áreas superior e inferior A e uma altura h , como mostrado no lado direito da Figura 4.4. Ao aplicar uma força de cisalhamento constante, f_x , às superfícies superior e inferior, a posição relativa das duas superfícies podem ser deslocadas por uma certa distância, s . A magnitude da deformação de cisalhamento é dada por $\lambda_s = s/h$ e a tensão de cisalhamento por $\sigma = f_x/A$ ([Alencar, 2015](#)). De acordo com a definição de um sólido de Hooke (hookeano), a tensão é linearmente proporcional à deformação e, dessa forma, pode-se escrever:

$$\sigma = G\lambda_s \quad (4.1)$$

com G representando o módulo elástico do sólido estudado e é uma constante de proporcionalidade.

Pode-se imaginar outra situação, em que um fluido viscoso está situado entre duas placas planas e paralelas com área A e separadas por uma distância h , e experimenta a movimentação com velocidade v_x constante de uma das placas, enquanto a outra

placa permanece em repouso (Figura 4.4). Para a manutenção de v_x é necessária uma força externa f_x , visto que o fluido oferece uma certa resistência à movimentação da placa. No fluido, essa força é de igual magnitude e sentido contrário, ou seja $-f_x$. Assim, a componente da tensão coplanar à placa, ou tensão de cisalhamento, é dada por $\sigma = -f_x / A$, e a taxa de variação temporal do cisalhamento, λ_v , é igual ao gradiente de velocidade. No caso da Figura 4.4, temos:

$$\frac{\partial \lambda_v}{\partial t} = \frac{v_x}{h} = \frac{\partial v_x}{\partial y} \quad (4.2)$$

Existe uma dependência da tensão de cisalhamento, σ , de um dado material com a taxa de variação temporal do cisalhamento. Essa dependência pode ser linear, não-linear, ou plástica. Quando um material apresenta uma resposta linear temos:

$$\sigma = \eta \frac{\partial \lambda_v}{\partial t} \quad (4.3)$$

e o mesmo é dito um material/fluido newtoniano. Líquidos de pequenas moléculas pertencem a esta categoria; nesse caso η é a constante de proporcionalidade denominada viscosidade e o sinal foi escolhido na Equação 4.3 de tal forma a representar a tensão do meio externo sobre o sistema. Se o material exibe uma resposta não-linear com a taxa de deformação, esse material é dito não-newtoniano (Alencar, 2015). Quando a tensão de cisalhamento é independente da taxa de deformação, o material exibe uma deformação plástica. Em todos os casos, o material oferece uma resistência que dissipa energia.

Figura 4.4: (Esquerda) Cisalhamento de um fluido simples contido entre duas placas paralelas, com uma distância h entre a placa superior e inferior. A placa superior se desloca a uma velocidade v_x em relação à placa inferior. (Direita) Cisalhamento de um bloco com altura h e um deslocamento s da superfície superior em relação ao inferior. Figura adaptada de Dorta (2014).

Um material viscoelástico apresenta simultaneamente propriedades mecânicas viscosas e elásticas quando submetido à deformação. Se essa deformação for pequena,

comparada com o tamanho do sistema, e lenta, comparada com as constantes de tempo do sistema, a relação linear entre a tensão e a deformação, Equações 4.1 e 4.3 são mantidas, e designamos como uma região linear. Nessa região linear, a descrição fenomenológica da viscoelasticidade é conhecida através das equações generalizadas de Maxwell, em referência a James Clerk Maxwell, que propôs esse modelo em 1867 (Maxwell, 1867). Mecanicamente, as equações generalizadas de Maxwell é uma das formas mais simples de representar um material viscoelástico. Neste modelo, o material é representado por um sistema composto por uma mola, tipo sólido de Hooke com comprimento de repouso, s_0 , conectado em série com um amortecedor newtoniano (Figura 4.5). Quando um sistema como esse é deformado, o amortecedor dissipa energia, enquanto a mola armazena energia (Alencar, 2015). Dividindo em dois o comprimento desse sistema no eixo x , s_1 para o comprimento da mola e s_2 para o comprimento do amortecedor, e aplicando esses valores na definição de um material elástico de Hooke, em analogia com a Equação 4.1, temos,

$$f_x = G(s_1 - s_0) \quad (4.4)$$

Da mesma forma, em analogia com a Equação 4.3, temos que a viscosidade de um amortecedor é $\eta = f_x / (\partial s_2 / \partial t)$, que pode ser reorganizada como:

$$f_x = \eta \frac{\partial s_2}{\partial t} \quad (4.5)$$

com f_x sendo a força de tensão externa aplicada para alongar ou contrair o comprimento total do sistema $s = s_1 + s_2$. Note que as Equações 4.4 e 4.5 são para um sistema unidimensional, enquanto as Equações 4.1 e 4.3 são para sistemas tridimensionais. Das Equações 4.4 e 4.5 temos,

$$\frac{\partial s}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t}(s_1 + s_2) = \left[\frac{1}{G} \frac{\partial f_x}{\partial t} + \frac{f_x}{\eta} \right] \quad (4.6)$$

que pode ser reescrita como:

$$f_x + \frac{\eta}{G} \frac{\partial f_x}{\partial t} = \eta \frac{\partial s}{\partial t} \quad (4.7)$$

Para descrever o comportamento viscoelástico de um material, substituímos f_x pela tensão, σ e $\partial s / \partial t$ pela taxa de deformação $\partial \lambda / \partial t$, onde $\lambda = \lambda_v + \lambda_s$, e a Equação 4.7 pode ser reescrita como:

$$\sigma + \tau \frac{\partial \sigma}{\partial t} = G \tau \frac{\partial \lambda}{\partial t} \quad (4.8)$$

com $\tau = \frac{\eta}{G}$.

Figura 4.5: Modelo de Maxwell representado por uma mola de Hooke conectada em série com um amortecedor newtoniano. Figura adaptada de Dorta (2014).

Assumimos que a constante G , conhecida como *módulo de Young*, seja positiva. Sendo a razão entre tensão (dimensão de pressão) e deformação (adimensional), possui unidade de pressão (No SI, Pa ou N/m^2). A constante positiva τ possui dimensão de tempo e é conhecida como a escala temporal de dissipação. A Equação 4.8 pode também ser obtida diretamente a partir das Equações 4.1 e 4.3, fazendo $\partial_t \lambda = \partial_t \lambda_v + \partial_t \lambda_s$. Note que, o fato da Equação 4.8 conter derivadas temporais não existe uma relação simples entre a tensão e deformação. Em outras palavras, o conceito de *módulo elástico*, razão entre a tensão e a deformação total, para um sistema como esse deve ser expandido para incorporar um comportamento mais complexo que o observado em um sólido de Hooke (Alencar, 2015).

Existe uma solução geral para a Equação 4.8 que veremos em seguida, mas antes pode-se discutir uma forma mais simples em que essa equação pode ser solucionada para a tensão $\sigma(t)$ se a deformação $\lambda(t)$ for dada, ou vice versa. Esse mecanismo é utilizado em testes dinâmicos que são fundamentais para encontrar a resposta polimérica de curta duração. Nesse caso uma deformação resultante de uma tensão senoidal é medida e analisada. Quando um material viscoelástico é submetido a uma tensão variando sinusoidalmente $\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \phi)$, o sistema eventualmente chega ao estado de equilíbrio em que a deformação resultante também é sinusoidal, possuindo a mesma frequência angular, mas retardado em fase por um ângulo ϕ , $\lambda(t) = \lambda_0 \sin(\omega t + \phi)$. Para os cálculos a seguir, é conveniente escrever a função de tensão e deformação como números complexos, cuja parte real da deformação está em fase com a tensão e a parte imaginária está defasada de 90° , $\lambda^*(t) = \lambda_0' \cos(\omega t) + i \lambda_0'' \sin(\omega t)$. Essa equação também pode ser escrita na notação de Euler, $\lambda^*(t) = \lambda_0 e^{i\phi} e^{i\omega t}$. Nesse caso, a fase foi acoplada em uma constante complexa $e^{i\phi}$. Assim, ambos tensão e deformação podem ser colocados na forma complexa, para esse caso particular, $\sigma^* = \sigma_0^*$ e $\lambda^* = \lambda_0 e^{i\phi}$ a dependência temporal na forma $e^{i\omega t}$, com todas as derivadas temporais na forma $i\omega e^{i\omega t}$,

ou seja,

$$\sigma^* = \sigma_0^* e^{i\omega t} \quad (4.9)$$

$$\lambda^* = \lambda_0^* e^{i\omega t} \quad (4.10)$$

Substituindo as equações acima na equação diferencial do modelo de Maxwell, Equação 4.8, obtemos:

$$\sigma_0^* e^{i\omega t} + i\omega\tau\sigma_0^* e^{i\omega t} = i\omega G\tau\lambda_0^* e^{i\omega t} \quad (4.11)$$

que pode ser simplificada, tal que obtemos o módulo complexo $G^* = \sigma_0^* / \lambda_0^*$, do modelo de Maxwell,

$$G^* = \frac{\sigma_0^*}{\lambda_0^*} = \frac{i\omega G\tau}{1 + i\omega\tau} \quad (4.12)$$

Essa expressão pode ser manipulada algebricamente, multiplicando e dividindo pelo complexo conjugado do denominador para obter uma expressão em que a parte real e a parte imaginária estejam explicitamente separadas,

$$G^* = \frac{G\omega^2\tau^2}{1 + \omega^2\tau^2} + i\frac{G\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (4.13)$$

em que,

$$G' = \frac{G\omega^2\tau^2}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (4.14)$$

e

$$G'' = \frac{G\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (4.15)$$

são respectivamente os módulos de armazenamento e de perda para o modelo de Maxwell.

De forma geral, para respostas não oscilatórias, a Equação 4.8 é uma equação diferencial linear não homogênea de primeira ordem de $\sigma(t)$, que possui solução genérica na forma:

$$\sigma(t) = e^{-t/\tau}\sigma(0) + e^{-t/\tau} \int_0^t e^{-t'/\tau} G \frac{\partial\lambda(t')}{\partial t'} dt'. \quad (4.16)$$

Assumindo que para $t = 0$ não existe tensão externa, $\sigma(0) = 0$ e a Equação 4.16 fica:

$$\sigma(t) = \int_0^t e^{-(t-t')/\tau} G \frac{\partial \lambda(t')}{\partial t'} dt' \quad (4.17)$$

No entanto, aqui iremos tratar apenas de casos em que temos estímulos e respostas oscilatórias.

Dados viscoelásticos confiáveis podem ser obtidos a partir da medição da resposta mecânica dinâmica de um fluido polimérico, ou um material viscoelástico, a uma taxa de deformação harmônica oscilatória. Da forma inversa, pode-se aplicar uma tensão harmônica oscilatória e medir a deformação. Essa última é utilizada na técnica de Citometria Óptica de Torção Magnética. Em ambos os casos, tensão e deformação podem ser escritas na forma das Equações 4.9 e 4.10. Para um material elástico ideal, a tensão e deformação estão em fase, $\phi = 0$. Para um material viscoso ideal, a deformação e a tensão estão defasados de 90° , ou seja, $\phi = 90$ (Alencar, 2015). Como mostrado antes, o comportamento viscoelástico, uma combinação de uma resposta elástica ideal e uma resposta viscosa ideal, é comum. Como já foi visto na Equação 4.12, o módulo complexo pode ser escrito $G^* = \sigma_0^* / \lambda_0^*$. Visto que, para uma tensão/deformação harmônica, a diferença de fase pode ser incorporada em uma constante complexa (ver Equações 4.9 e 4.10). De forma genérica, as Equações 4.9 e 4.10 assumem a forma funcional $F = A_0^* e^{i\omega' t}$, cuja transformada de Fourier é:

$$F^+(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} (A_0^* e^{i\omega' t}) e^{-i\omega t} dt = A_0^* \sqrt{2\pi} \delta(\omega' - \omega) \quad (4.18)$$

sendo $\delta(\omega' - \omega)$ a função delta de Dirac. Em um caso específico, em que um meio viscoelástico é submetido à uma deformação oscilatória com uma única frequência, existirá uma fase entre $\sigma^*(t)$ e $\lambda^*(t)$ que pode ser escrita como $e^{i\phi}$, tal que o módulo complexo pode ser escrito em termos da transformada de Fourier dos dados coletados para tensão e deformação,

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma^+(\omega)}{\lambda^+(\omega)} = \frac{\sigma_0}{\lambda_0} e^{i\phi} \quad (4.19)$$

Como $G^* = G' + iG''$, em que G' é o módulo armazenamento e G'' é o módulo de perda de cisalhamento, esses dois componentes de módulos podem ser escritos em termos de deslocamento de fase como:

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\lambda_0} \sin \phi \quad (4.20)$$

e

$$G' = \frac{\sigma_0}{\lambda_0} \cos \phi \quad (4.21)$$

Agora pode-se definir a tangente de perda como sendo,

$$\tan \phi = \frac{G''}{G'} \quad (4.22)$$

Vale aqui evidenciar, que os cálculos feitos para oscilações harmônicas com uma única frequência podem facilmente ser extrapolados para múltiplas frequências. Essa metodologia é a base teórica para o método experimental que iremos discutir nesse trabalho. Assim a medição dos valores de $G^*(\omega)$ em função da frequência ω pode ser entendido como o espectro viscoelástico, ou seja $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ o espectro do módulo de armazenamento e perda respectivamente.

4.5 Citometria Óptica de Torção Magnética

Esta técnica permite medir as propriedades reológicas celulares, por intermédio de utilização de microesferas ferrimagnéticas de $4.5 \mu m$ de diâmetro, recobertas com um peptídeo sintético, o qual contém uma sequência de aminoácidos *arginine-glycine-aspartic*, RGD, que se acoplam fortemente aos receptores de integrina presentes na célula (Fabry et al., 2001). As microesferas são, então magnetizadas horizontalmente por um sistema de magnetização controlado por computador, e então é aplicado verticalmente um campo magnético externo homogêneo, que varia senoidalmente no tempo, gerando um torque, que causa a rotação das microesferas, no sentido de se alinharem ao campo externo (Figura 4.6) (Lenormand et al., 2008; Fabry et al., 2001; Lenormand & Fredberg, 2005; Moriya et al., 2002).

O sistema consiste de um microscópio invertido (LEICA DMI 4000B) e um sistema de aquisição e processamento de imagens, totalmente desenvolvido no LabM², o qual é integrado ao microscópio (Figura 4.7). A transmissão das imagens para o *software* é realizado por intermédio de uma câmera CCD (Pike AVT), à qual está acoplada ao microscópio e que é controlada por computador. A câmera transmite as imagens ao computador através da placa de vídeo FireWire 800 (National Instruments PCIe-8255R) onde o sistema de aquisição de imagens, feito em C++ é capaz de analisá-las. Este *software* controla o magnetizador através da placa de conversão analógico digital (National Instruments PCI-6251), identifica as microesferas e a partir do cálculo do centro de massa, detecta as suas coordenadas. Esse procedimento é feito para cada imagem, onde obtém-se os deslocamentos por tempo (Alencar, 2015).

Figura 4.6: Microesferas e esquema da citometria óptica de torção magnética. (A): esfera ferrimagnética ligada ao citoesqueleto vista por microscopia eletrônica de varredura; (B): microscopia de fluorescência confocal da esfera na superfície da célula; (C): a aplicação de um campo magnético introduz um torque que leva a esfera a rodar e se deslocar. M denota a direção do momento magnético da esfera. Figura modificada de [Mofrad \(2009\)](#).

Figura 4.7: Esquema do aparato experimental utilizado na técnica de OMTc: (A) microscópio invertido com (B) câmera CCD acoplada e (C) ligados ao computador. O magnetizador (D) recebe um sinal senoidal do computador, amplifica e envia para as bobinas do microscópio. Por segurança, os sinais são interceptados em um osciloscópio (E). Figura adaptada de [Menegon \(2015\)](#).

O torque τ é o torque mecânico por volume de esfera e tem dimensão de pressão (Pa). A razão do torque complexo, $\tilde{\tau}$, com o deslocamento complexo, $\tilde{d}$, resultante define o módulo elástico complexo da célula,

$$\tilde{g} = \frac{\tilde{\tau}(\omega)}{\tilde{d}(\omega)} \quad (4.23)$$

e tem dimensão de Pa/nm. Para cada esfera, são computados o módulo elástico, g' (parte real de $\tilde{g}$), o módulo de perda, g'' (parte imaginária de $\tilde{g}$) e a tangente de perda, η , a razão g''/g' . Essas medições podem ser transformadas nos tradicionais módulos elástico e de perda por um fator geométrico dependente do formato e da espessura da célula e do grau de aderência (Fabry et al., 2001).

$$\tilde{G} = \alpha \tilde{g} = G' + iG'' = \alpha \frac{\tilde{\tau}(\omega)}{\tilde{d}(\omega)} \quad (4.24)$$

Figura 4.8: Comportamento do módulo $\tilde{G}$ para líquidos e sólidos. G' é o módulo de armazenamento, enquanto G'' o de perda. Para um fluido complexo ou matéria mole, o comportamento seria intermediário ficando entre os dois tipos apresentados. Figura modificada de Larson (1999).

O comportamento dos módulos de armazenamento, G' e perda, G'' , típico para materiais que se comportam como sólido ou líquido são mostrados na Fig. 4.8. Para um fluido se comportando como líquido, o módulo de armazenamento está muito abaixo do módulo de perda, e sua dependência com ω é $G' \propto \omega^2$ enquanto que $G'' \propto \omega$ (Larson, 1999). A região de baixa frequência, onde G' e G'' obedecem a essas leis de frequência, é chamada de região terminal. Para fluidos que se comportam como sólidos, $G' > G''$, e G' são quase independentes da frequência. Um fluido complexo apresenta um comportamento intermediário ao mostrado na Figura 4.8, ficando entre os dois tipos apresentados (Larson, 1999; Alencar, 2015).

Figura 4.9: *Aparato experimental para medidas de OMTC. Aqui o aparato real é mostrado. No insert é mostrado o sistema de magnetização com as bobinas e o poço com células ao centro desse sistema. Figura adaptada de Ferraz (2015).*

4.6 Materiais e Métodos

4.6.1 Citometria Óptica de Torção Magnética

Quatro ensaios com o OMTC foram realizados (2 para cada tipo de nanopartícula que estamos estudando, utilizando a célula RASM), uma vez que é necessário um grande número de dados para trabalhar com médias e elaborar os gráficos que poderão pautar as propriedades celulares. O seguinte protocolo foi seguido:

Em cada um dos ensaios, foram realizadas 48 medidas, sendo preparados 48 poços no primeiro dia de cada ensaio. De início foi feito um coating com colágeno, para melhor aderência celular, dispondo 100 μl de colágeno por poço. Após isso, estes permaneceram incubados por 1 hora. Em seguida, após retirar o colágeno, foram inoculadas 10.000 células/poço em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB. Os procedimentos a seguir foram comuns para todos os ensaios.

No segundo dia, após verificar confluência celular, foram preparadas as diluições de AgNPs IQ-USP e AgNPs Khemia® em meio sem soro e, então um volume de 100 μl das diluições foi acrescentado a cada poço, ficando estes, incubados por 24 horas para interação das nanopartículas com as células. As diluições efetuadas foram as mesmas utilizadas nos experimentos do Capítulo 3 e constam da Tabela 3.2.

No terceiro dia, após 2 lavagens com PBS, depois de adicionar 200 μl de meio/poço, foi adicionado a cada poço as microesferas ferrimagnéticas, com volume perfazendo 20 μl de beads envolvidos em RGD, ficando os poços incubados por 20 minutos. Após esse tempo, retirou-se o meio e acrescentou, novamente, 100 μl de meio sem soro por poço, e então, o experimento pôde ser iniciado, permanecendo os poços incubados e sendo retirados 1 poço por vez para a realização da medida.

Todas as medidas foram realizadas com uma frequência fixa, $f=0.75$ Hz.

4.7 Resultados e Discussões

Durante a execução dos experimentos, as três primeiras concentrações de ambos os tipos de AgNPs (Tabela 3.2) se mostraram inviáveis para realizar as medidas mecânicas. Como sabido, essas concentrações são altamente citotóxicas. Um efeito novo pôde ser observado. Para ilustrar este fato, a Figura 4.10 mostra uma captura dos poços de células, que foram tratados a diferentes concentrações de AgNPs. Em (A) é mostrada uma imagem para um poço contendo apenas células (poço de controle). Os pontos pretos são as esferas ferrimagnéticas que estão aderidas às células. Um disco vermelho mostra o centro do poço com células confluentes e com microesferas igualmente dispersas pela superfície das células. (B) É mostrado um poço com células que foram tratadas com AgNPs Khemia® na concentração de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ao efetuar a magnetização e iniciarmos as medidas, o movimento das microesferas (detalhe em verde) arrasta completamente as células fragilizadas (detalhe em vermelho) pelo tratamento com as NPs, desconstruindo-as. (C) É mostrado um poço com células que foram tratadas com AgNPs Khemia® na concentração de 9.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O poço está confluyente. Algumas irregularidades na superfície da célula faz com que algumas das microesferas se aglomerem (detalhes em vermelho). (D) É mostrado um poço com células que foram tratadas com AgNPs Khemia® na concentração de 0.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O poço está confluyente e com características semelhantes ao poço de controle.

Sendo assim, optou-se não considerar para análise as três primeiras concentrações de ambas as nanopartículas (Tabela 3.2) por dois motivos: o primeiro foi apresentado acima, e o segundo é que dos ensaios de Citotoxicidade e microscopia de fluorescência,

Figura 4.10: Diferenças nos poços com células tratadas com AgNPs Khemia® no experimento de OMTc. (A) células de controle, (B) células tratadas com 75 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs; (C) células tratadas com 9.37 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs; (D) células tratadas com 0.58 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs. *Figura do autor.*

sabe-se com certeza de que estas células estão mortas e só devemos medir propriedades mecânicas em células viáveis.

A Figura 4.11 apresenta os valores para as médias dos módulos de armazenamento, G' , e de perda, G'' , obtidos para diferentes concentrações de nanopartículas de prata IQ-USP. As concentrações referentes às diluições realizadas, como já mencionado, podem ser consultadas na Tabela 3.2.

As condições de validação deste experimento foram: as células deveriam ter formado uma monocamada confluyente em todos os poços. Os poços em que isto não pôde ser verificado, foram descartados e o número de *beads* (microesferas ferrimagnéticas) aceitos pelo *software* deveria ser superior a 150. Para o controle, foram preparados poços com células e meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

Pode-se perceber que a exposição das células às AgNPs alterou a rigidez celular. Isto é evidenciado quando comparamos o grupo controle com os demais grupos, com as diferentes concentrações. Células expostas à concentração de AgNPs em 9.37 mg/ml e 4.68 mg/ml tiveram os valores de G' significativamente aumentados. Isto, presumi-

velmente, pode estar associado ao fato da ação da toxicidade dessas AgNPs, conforme discutido na Seção 3.8. Todos os valores de G'' se mostraram aproximadamente constantes. Nota-se porém que, para as concentrações de AgNPs 9.37 mg/ml e 4.68 mg/ml o módulo elástico aumentou consideravelmente com relação ao controle. Em seguida, houve uma redução no valor de G' quando a concentração diminuiu pra 2.34 mg/ml. Em seguida, com nova diminuição na concentração, o valor de G' aumentou e na última concentração, este valor já estava próximo ao valor de G' do controle.

Figura 4.11: Valores das médias dos módulos de armazenamento e de perda para diferentes concentrações de AgNPs IQ-USP. *Figura do autor.*

Seriani et al. (2015) estudaram a instabilidade do citoesqueleto e citotoxicidade em células epiteliais brônquicas humanas, provocadas por partículas liberadas pela queima de diesel e concluíram que o aumento da viscoelasticidade sugere que a desorganização do citoesqueleto está associada à células rígidas ou rearranjos. Então, com base neste estudo, pode-se inferir que altas concentrações de nanopartículas de prata causam uma mudança no citoesqueleto, o que altera as propriedades mecânicas celulares.

Esta hipótese ganha mais força quando observa-se o comportamento da células na presença de AgNPs Khemia®, como mostra a Figura 4.12. Todas as concentrações, com exceção da última concentração estudada, 0.58 mg/ml apresentaram módulo

elástico acima do controle, portanto um aumento na rigidez. A última concentração, porém, apresentou uma pequena queda no valor de G' , fazendo com que este valor se aproximasse do valor observado no controle. Os valores da viscosidade tenderam a acompanhar os valores da elasticidade.

Figura 4.12: Valores das médias dos módulos de armazenamento e de perda para diferentes concentrações de AgNPs Khemia[®]. *Figura do autor.*

Observando de uma maneira um pouco mais criteriosa esses dois resultados para as nanopartículas estudadas, percebemos que o erro experimental dessas medidas não pode ser simplesmente ignorado. Quando se trabalha com uma estatística de dados relativamente grande, como é o caso, todas as medidas para minimizar o erro se fazem necessárias. Na prática, quando se trata de medidas biológicas, o erro experimental está mais associado ao preparo e manuseio das amostras, práticas de pipetagem, e à qualidade das células e dos materiais utilizados durante as pré-experimentações. Como existem desvios-padrão significativos, nossos experimentos apenas mostram uma tendência de alteração de comportamento das propriedades mecânicas. É necessário que, futuramente, seja estudado com um número muito maior de dados com OMTC, em diferentes concentrações de nanopartículas e realizadas melhorias ou mudanças no *setup* experimental, desenvolvimento e implementação de novos protocolos experimentais, a

fim de minimizar consideravelmente os desvios para evidenciar de forma mais precisa o comportamento das propriedades mecânicas.

Sabe-se que o mecanismo motor das células se dá com a ação da proteína miosina e que os sinais mecânicos controlam a atividade bioquímica e de filamentos de actina (Blanchoin et al., 2014). O cálcio é um elemento fundamental para processos intracelulares, mas o excesso dele pode prejudicar e até contribuir para a apoptose. Pode-se apresentar o seguinte raciocínio: quanto mais uma nanopartícula de prata tiver possibilidades de ser mais tóxica para as células, como no caso das AgNPs Khemia® que estamos trabalhando, maior a possibilidade também dela se ionizar na presença de fluídos biológicos. Uma vez se tornado iônica, a AgNP provoca um estímulo na célula, que modifica os potenciais, como o potencial de repouso da membrana plasmática, o que a tornará mais permeável. Dependendo do tamanho, as AgNPs podem chegar facilmente ao núcleo. Entretanto, ainda no citoplasma, podem interferir no potencial mitocondrial, fazendo com que a célula promova a libertação do citocromo c para o citosol, iniciando a ativação das caspases. No citosol, o citocromo c libera cálcio armazenado pelo retículo endoplasmático. Uma maior disponibilidade de cálcio faz com que este elemento acabe estimulando mais citocromo c para o citosol. Porém, uma maior disponibilidade de cálcio na célula, pode fazer com que a tropomiosina, uma das proteínas que participam do mecanismo de contração muscular, fique saturada pelo cálcio, ativando a actina, que por sua vez, se acopla na miosina, ativando enzimas que hidrolizam ATP, liberando energia e mudando a configuração das redes de ligações cruzadas, sobrepondo os filamentos de actina e miosina e fazendo com que a célula se contraia. Essa contração, como uma das respostas desencadeada pela interação das AgNPs, é detectada na medida de OMTC, acarretando na mudança da viscoelasticidade detectada.

Assim, pode-se inferir que para maiores concentrações de nanopartículas e, dependendo do tipo de nanopartícula, ocorrerá uma resposta mecânica da célula. A resposta mecânica pode ser menor, à medida em que as nanopartículas tiverem a superfície passivada com alguma substância, como foi o caso com as nossas nanopartículas IQ-USP.

Todavia, estudos mostraram que a exposição de nanopartículas de cobre e zinco modificam as propriedades mecânicas de células HASM, sem no entanto, diminuir a viabilidade (Berntsen et al., 2010). Também é sabido que, em células de músculo liso, as fibras de *stress* estão concentradas nas regiões dos cantos, onde a rigidez é mais elevada (Park et al., 2010), no entanto, uma grande quantidade de fibras é distribuída no centro da célula onde a rigidez é menor. O próprio núcleo celular é conhecido por ser muito duro e também está ligado com o citoesqueleto. Além disso, os filamentos de actina citosólicas podem existir no centro da célula que não são parte das estruturas adesivas,

mas servem para outras funções e, por conseguinte, não contribuem para a rigidez celular (Park et al., 2010).

Estudos têm mostrado uma recente descoberta nas mudanças na elasticidade celular como marcador de anormalidades celulares e uma correlação com várias doenças humanas. A elasticidade foi referenciada na patogênese de muitas doenças progressivas, incluindo doenças vasculares, doenças renais, câncer, malária, cataratas, Alzheimer, complicações diabéticas, cardiomiopatias, etc. Em alguns casos, acredita-se que a perda de elasticidade em tecidos decorre das mudanças na matriz extracelular, não nas células em si. No entanto, também foi demonstrado que as próprias células também podem alterar sua elasticidade consideravelmente devido ao câncer, malária, artrite e até envelhecimento. (Guz et al., 2014).

Nossos estudos reforçaram a ideia de mudanças na viscoelasticidade celular sob interações de nanopartículas de prata e procuraram dar uma contribuição física, de maneira didática, para um problema amplo e que, cada vez mais, requererá esforço na interpretação de modelos e resultados experimentais para elucidação dos inúmeros fenômenos que podem ocorrer através de interações NP–células.

Referências

- Alencar, A. M. (2015). *Multiescala no sistema cardiorrespiratório*. Tese de Livre Docência. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Berntsen, P., Park, C., Rothen-Rutishauser, B., Tsuda, A., Sager, T., Molina, R., Donaghey, T., Alencar, A. M., Kasahara, D., Ericsson, T., et al. (2010). Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells. *Journal of The Royal Society Interface*, (pp. rsif20100068). DOI: [10.1098/rsif.2010.0068.focus](https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0068.focus).
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews*, 94(1), 235–263. DOI: [10.1152/physrev.00018.2013](https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013).
- Breuer, K. S. (2005). *Microscale diagnostic techniques*. Springer.
- Chancellor, T., Lee, J., Thodeti, C. K., & Lele, T. (2010). Actomyosin tension exerted on the nucleus through nesprin-1 connections influences endothelial cell adhesion, migration, and cyclic strain-induced reorientation. *Biophysical journal*, 99(1), 115–123. DOI: [10.1016/j.bpj.2010.04.011](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.011).
- Cicuta, P. & Donald, A. M. (2007). Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter*, 3(12), 1449–1455. DOI: [10.1039/B706004C](https://doi.org/10.1039/B706004C).
- Dorta, M. P. (2014). *Propriedades físicas que desencadeiam alterações mecânicas em células vivas*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. São Paulo.

- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delouvée, A., et al. (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *Journal of cell science*, 111(13), 1897–1907.
- Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D., & Fredberg, J. J. (2001). Scaling the microrheology of living cells. *Physical review letters*, 87(14), 148102. DOI: [10.1103/PhysRevLett.87.148102](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.148102).
- Ferraz, M. S. A. (2015). *Difusão anômala de microesferas em estruturas complexas*. Tese de Doutorado. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*. John Wiley & Sons.
- Fung, Y. (1993). *Biomechanics: material properties of living tissues*. Springer, New York.
- Guz, N., Dokukin, M., Kalaparthi, V., & Sokolov, I. (2014). If cell mechanics can be described by elastic modulus: study of different models and probes used in indentation experiments. *Biophysical journal*, 107(3), 564–575. DOI: [10.1016/j.bpj.2014.06.033](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.033).
- Howard, J. et al. (2001). Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton.
- Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P., & Schliwa, M. (1991). Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *The Journal of cell biology*, 113(1), 155–160.
- Larson, R. G. (1999). *The structure and rheology of complex fluids*, volume 33. Oxford university press New York.
- Lenormand, G., Alencar, A. M., Trepatt, X., Zhou, E.-h., Fabry, B., Butler, J. P., & Fredberg, J. J. (2008). The cytoskeleton of the living cell as an out-of-equilibrium system. In *Phase Transitions in Cell Biology* (pp. 111–141). Springer. DOI: [10.1007/978-1-4020-8651-9_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8651-9_8).
- Lenormand, G. & Fredberg, J. J. (2005). Deformability, dynamics, and remodeling of cytoskeleton of the adherent living cell. *Biorheology*, 43(1), 1–30.
- Macosko, C. W. & Larson, R. G. (1994). Rheology: principles, measurements, and applications.
- Maniotis, A. J., Chen, C. S., & Ingber, D. E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 849–854.
- Maxwell, J. C. (1867). On the dynamical theory of gases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (pp. 49–88).
- Menegon, M. O. (2015). *Rheological characterization of actin polymeric networks: measurement and numerical modeling*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. São Paulo.

- Mofrad, M. R. (2009). Rheology of the cytoskeleton. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 41, 433–453. DOI: [10.1146/annurev.fluid.010908.165236](https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.010908.165236).
- Moriya, H., Colen, D., Maksym, G., & Alencar, A. (2002). Citometria óptico-magnética de rotação: exemplo de um método para medir as propriedades reológicas da célula. *Proceedings of the second joint EMBS/BMES*, 1464, 1465.
- Park, C. Y., Tambe, D., Alencar, A. M., Trepatt, X., Zhou, E. H., Millet, E., Butler, J. P., & Fredberg, J. J. (2010). Mapping the cytoskeletal prestress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 298(5), C1245–C1252. DOI: [10.1152/ajpcell.00417.2009](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00417.2009).
- Rodriguez, M. L., McGarry, P. J., & Sniadecki, N. J. (2013). Review on cell mechanics: experimental and modeling approaches. *Applied Mechanics Reviews*, 65(6), 060801. DOI: [10.1115/1.4025355](https://doi.org/10.1115/1.4025355).
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M., & Waterman-Storer, C. M. (2003). Conserved microtubule–actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature cell biology*, 5(7), 599–609. DOI: [10.1038/ncb0703-599](https://doi.org/10.1038/ncb0703-599).
- Seriani, R., Junqueira, M. S., Carvalho-Sousa, C. E., Arruda, A. C., Martinez, D., Alencar, A. M., Garippo, A. L., Brito, J. M., Martins, M. A., Saldiva, P. H., et al. (2015). Enriched inorganic compounds in diesel exhaust particles induce mitogen-activated protein kinase activation, cytoskeleton instability, and cytotoxicity in human bronchial epithelial cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(4), 323–329. DOI: [10.1016/j.etp.2015.02.004](https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.02.004).
- Stamenović, D. (2008). Rheological behavior of mammalian cells. *Cellular and molecular life sciences*, 65(22), 3592–3605. DOI: [10.1007/s00018-008-8292-y](https://doi.org/10.1007/s00018-008-8292-y).
- Stamenović, D., Mijailovich, S. M., Tolić-Nørrelykke, I. M., Chen, J., & Wang, N. (2002). Cell prestress. ii. contribution of microtubules. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(3), C617–C624. DOI: [10.1152/ajpcell.00271.2001](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00271.2001).
- Wang, N. & Stamenović, D. (2000). Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(1), C188–C194. DOI: [10.1152/ajpcell.2000.279.1.C188](https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.1.C188).

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apresentamos um panorama geral desta tese, destacando os principais resultados obtidos e oferecendo novas ideias e perspectivas para trabalhos e colaborações futuras.

ESTE ESTUDO FOI DESENVOLVIDO na intenção, mesmo que muitas vezes de forma qualitativa, descrever o comportamento de AgNPs em células biológicas. Esta tentativa de descrição deste comportamento foi realizada após um extenso trabalho de caracterização, com base no qual foi realizada uma investigação científica procurando discutir efeitos de toxicidade dessas AgNPs em células de músculo liso. Por último, apresentamos uma técnica e alguns resultados sobre viscoelasticidade celular que complementam os estudos realizados, assim como abre diversos pontos para aprofundamento deste trabalho.

Foram apresentados os diversos mecanismos de síntese e produção de nanopartículas, e as diferentes técnicas possíveis de serem utilizadas para caracterizá-las. Discorre-se sobre o uso de cada uma das técnicas de caracterização, enfocando as que são mais utilizadas e ressaltando os problemas que podem vir a ocorrer ao tentar obter informações de tamanho de partículas, principalmente pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e dispersão dinâmica da luz. Os métodos de síntese foram discutidos, as reações foram apresentadas, com ênfase nos métodos de síntese *bottom-up* que utilizam sais de prata como precursores. Procurou-se evidenciar que o controle da produção de nanopartículas com formas controladas pode ser difícil e que estas possuem propriedades específicas, que podem ser utilizadas para diferentes aplicações, sendo muito demandadas atualmente na biomedicina. Também foram apresentadas as propriedades ópticas e eletrônicas dessa classe de materiais e como estas conferem propriedades únicas, como uma excepcional coloração a verdadeiros coloides de prata, além da banda RPSL que também é comumente estudada em conjunto com modelos teóricos para tentar entender os fenômenos que levam à agregação e coalescência de nanopartículas.

Experimentos de caracterização de nanopartículas foram realizados com dois tipos de nanopartículas, uma comercial e uma produzida pelo Instituto de Química da USP. Medidas de absorção óptica mostraram que as nanopartículas exibem bandas suaves em torno de 400 nm, região do azul do espectro eletromagnético, devido à ressonância dos plasmons de superfície. As bandas de absorção evidenciaram que as nanopartículas tendem a se agregar com o tempo de armazenamento, o que ocasiona o deslocamento das bandas para regiões do infravermelho. Foram feitas conjecturas sobre o que possibilita a agregação das nanopartículas, concluindo-se que a falta de uma camada passivadora é o principal fator responsável pela agregação e falta de estabilidade de coloides de prata.

Microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para obter as imagens das nanopartículas em micrografias. Com essas imagens, foi possível a construção de histogramas

para determinar o tamanho das NPs e o índice de polidispersividade, com base em médias dos diâmetros obtidos por contagem das NPs nas micrografias. Os dados foram ajustados com funções gaussianas, que permitiram determinar um diâmetro médio de ~ 31 nm para AgNPs IQ-USP e ~ 15 nm para AgNPs Khemia[®]. Índices de polidispersividade também foram calculados teoricamente, com valores aceitáveis para nanopartículas de tamanho controlado. Teceu-se uma breve discussão a respeito do preparo das amostras de nanopartículas de prata, enfatizando a interação destas com elementos presentes no ar, ionização, mudança na forma e no tamanho das NPs, que comprometem a qualidade dos dados.

Espectros EDS mostraram elementos como enxofre, silício, nitrogênio e oxigênio, em menores quantidades, relacionados às amostras de AgNPs. Foi oferecida a hipótese de contaminação durante o processo de secagem das telas suporte para preparo das imagens TEM ou durante a lavagem das vidrarias de laboratório com água contaminada. Não se pode deixar de mencionar o fato que os lotes de nanopartículas que trabalhamos foram produzidos em 2014 e essas medidas de TEM e EDS foram realizadas no ano de 2015, biênio em que a cidade de São Paulo foi atingida por uma grave crise hídrica, fazendo com que o maior sistema de abastecimento da cidade operasse com níveis contingenciados de água, próximos a 1% e que, neste nível tão baixo, é sabido que a água é contaminada devido aos inúmeros detritos e elementos químicos que se depositam no fundo das represas. Este pode ter sido o motivo da contaminação, porém, devido à reatividade da prata, não se pode descartar a hipótese da interação deste elemento até mesmo com o ar, formando óxidos. A obtenção de colóides de prata 100% puros, contudo, é extremamente difícil.

Difratogramas de raios X foram obtidos para as AgNPs. Os picos de difração foram indexados e revelaram uma única fase cristalina da prata, com estrutura cúbica e estado de oxidação, Ag⁰. Com o auxílio desses difratogramas, foram calculados o parâmetro de rede e a distância interplanar dos planos de difração. Utilizando a equação de Scherrer e um ajuste gaussiano dos picos de Ag mostrados nos difratogramas, foi possível obter o tamanho do cristalito para nanopartículas IQ-USP, mostrando que o cristal não é esférico, e com tamanho menor do que o tamanho das nanopartículas obtidas por TEM, contribuindo para termos uma dimensão qualitativa do tamanho das nanopartículas.

Valores de potencial Zeta estimados na faixa entre -16.5 a -19.8 mV e -30 a -57.1 mV para nanopartículas Khemia[®] e IQ-USP, respectivamente, evidenciaram a presença de carga de superfície e mostram a tendência das AgNPs Khemia[®] à agregação, enquanto a estabilidade coloidal foi verificada para AgNPs IQ-USP. Análises com outras técnicas, no entanto, evidenciaram a agregação de AgNPs IQ-USP lavadas e armazenadas por algum período de tempo.

Experimentos de DLS mostraram distribuição de número monomodal para AgNPs Khemia[®] e, para AgNPs IQ-USP, distribuição bimodal, estimando-se a distribuição de número e tamanho. Os resultados mostraram que a distribuição dominante é sempre para raios menores, sugerindo partículas menores que se agregam com o tempo e formam maiores dimensões em AgNPs IQ-USP lavadas, devido à eventual remoção da camada de PVP. As amostras Khemia[®] formam agregados de grandes dimensões. Ficou evidenciado que o tempo de armazenamento e o processo de sonicação interferem na forma e estabilidade das AgNPs, e a desagregação não ocorre de maneira homogênea ou uniforme, levando ao surgimento de partículas de diferentes tamanhos. Também foram abordados os diferentes problemas que a técnica de DLS pode apresentar quando se estuda nanopartículas de prata, sobretudo na determinação do diâmetro hidrodinâmico das AgNPs, que é consideravelmente aumentado devido à interação iônica com as NPs.

Resultados de SAXS mostraram que as amostras fornecem boa intensidade de espalhamento. Utilizando modelos teóricos foram calculados o raio médio da distribuição, polidispersividade e raio de giro. Os dados revelaram que as nanopartículas IQ-USP possuem um raio maior que as AgNPs Khemia[®] e não apresentaram agregação. Em contrapartida, AgNPs Khemia[®] apresentaram maior agregação, com grande polidispersividade relativa de 72%. Para AgNPs IQ-USP, análises de SAXS forneceram tamanho de partícula comparável a TEM e bastante diferentes de DLS. As medidas de SAXS para AgNPs Khemia[®] mostram diferenças com as medidas de TEM e DLS. Ficou evidente o efeito da agregação, que tem influências desde o preparo das amostras até o tempo de realização das medidas. Estes dados completaram vários aspectos relacionados a fenômenos de agregação que as nanopartículas de prata exibem.

Foi descrito também todos os possíveis mecanismos de interação célula-nanopartícula, evidenciando como elas interagem com diferentes linhagens celulares e como podem interferir em processos redox, e se difundir por várias organelas celulares, provocando danos em órgãos, tecidos e células, a exemplo de danos no cérebro, sistema cardiovascular e danos irreversíveis como aberrações cromossômicas, danos no DNA, interrupção do ciclo celular e apoptose. Discorremos sobre os danos da absorção de AgNPs em mamíferos e acerca dos problemas com as nanopartículas de prata que são encontradas em rios e águas residuais, a interação com fluidos e meios biológicos e a sua decomposição em íons potencialmente citotóxicos.

Enfatizou-se o uso das nanopartículas de prata na indústria e como antimicrobiano, bem como os efeitos tóxicos que surgem pelo fato das nanopartículas se agregarem e aumentarem a sua área de superfície. Os métodos de cultivo de célula *in vitro*, com desenvolvimento e melhorias em protocolos atuais foram descritos, assim como um estudo acerca do crescimento e viabilidade celular foi realizado, utilizando um modelo cinético de primeira ordem, evidenciando os parâmetros mais importantes na análise do

bom desenvolvimento das culturas mantidas em laboratório.

Comparando-se duas linhagens celulares diferente, NCTC–L929 e RASM, ensaios cinéticos com essas células cultivadas em meio DMEM, suplementado com 5 e 10% de SFB, mostraram que células RASM cultivadas com 5% de SFB crescem mais lentamente. Ajustes lineares em gráficos monologarítmicos do $\ln$ da concentração de células pelo tempo de incubação forneceram a velocidade e o tempo de duplicação celular, evidenciando que as células cultivadas com 5% de SFB leva o dobro de tempo para se duplicar no frasco de cultivo. Com base nesses dados, resolveu-se optar por cultivar as células em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e, uma vez formada a monocamada celular, no momento de inserir as nanopartículas, estas seriam colocadas em meio sem SFB e incubadas por 24 horas para evitar ao mínimo a formação de proteínas coronas sobre a superfície das AgNPs e aumentar a toxicidade das NPs em interação com as proteínas presentes no SFB.

Testes de citotoxicidade e estudos de análise morfológica por microscopia de fluorescência evidenciaram as características citotóxicas de cada nanopartícula. Os resultados apresentados pela análise morfológica concordam com os testes de citotoxicidade. AgNPs IQ–USP mostraram alta toxicidade até a concentração $9.37 \mu\text{g}/\text{mL}$, onde as células são apresentadas com fragmentação nuclear. Concentrações intermediárias dessas AgNPs provocaram apoptose em algumas células presente entre células viáveis. Em concentrações mais baixas, as AgNPs IQ–USP exibiram características morfológicas comparáveis ao grupo controle.

A densidade celular maior observada para as nanopartículas IQ–USP e morfologias mais próximas dos grupos controle em concentrações mais baixas de AgNPs as tornam mais segura para experimentos em baixas concentrações, menores que IC_{50} , que ficou na faixa de 7.4 a $14.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ do que as AgNPs Khemia[®], que embora apresentem células viáveis em concentrações mais baixas, exibiram baixa concentração celular nos poços, pois as células se desprenderam devido às sucessivas lavagens exigidas pelo protocolo para remoção de nanopartículas, meios e corante. Por sua vez, AgNPs Khemia[®] mostram alta toxicidade até a concentração $1.37 \mu\text{g}/\text{mL}$, com índice IC_{50} variando na faixa de 1.3 a $6.7 \mu\text{g}/\text{mL}$. Foi possível observar que concentrações mais altas induzem à fragmentação nuclear, desencadeando processo de apoptose.

Células estudadas com ambas nanopartículas, na concentração de $0.58 \mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram comportamento morfológico semelhante às células observadas nos grupos controles. Os testes de citotoxicidade, para ambas as AgNPs mostram que células nestas concentrações exibem viabilidade celular acima de 90%.

Dessa forma, pode-se inferir que quando as lesões causadas ao DNA é maior que a capacidade da célula de reverter-las, o organismo ativa o programa de morte celular, já que a multiplicação de células mutantes pode dar origem a neoplasias.

Experimentos utilizando a técnica de OMTC demonstraram que as diferentes concentrações de nanopartículas de prata podem modificar a rigidez celular e os resultados concordam com os experimentos de citotoxicidade e microscopia de fluorescência. Isto é evidenciado quando comparamos o grupo controle com os demais grupos, com as diferentes concentrações. Para concentrações mais altas de nanopartículas, verificou-se um aumento da viscoelasticidade. Os dois tipos de nanopartículas estudadas apresentaram mudanças nas propriedades mecânicas, mas as AgNPs Khemia® apresentou um maior aumento na viscoelasticidade nas diferentes concentrações em que as células foram expostas. Essa mudança na viscoelasticidade foi explicada como sendo devido à maior disponibilidade do cálcio, liberado por células apoptóticas, o qual é utilizado no complexo miosina-actina para gerar contração muscular.

Assim, apesar da prata ser um metal estudado há milênios, as nanopartículas de prata conferem inúmeros benefícios, fazendo com que o interesse em estudar esses materiais aumente cada vez mais. A literatura apresenta uma vasta quantidade de estudos recentes, envolvendo síntese, caracterização e, mais recentemente, aplicações na área medicinal. No entanto, ainda não há uma interdisciplinaridade entre os diversos campos do conhecimento, que permitam um melhor entendimento sobre a maneira como essas nanopartículas agem sobre as células. Nesse sentido, a física tenta, por intermédio da caracterização de NPs por diferentes métodos e do estudo das propriedades reológicas do citoesqueleto celular, trazer a sua contribuição para melhorar a percepção desses fenômenos de interação de materiais nanométricos nos organismos vivos.

Nossa contribuição para a área, apresentando estudos, métodos e modelos consistentes, informações a respeito de técnicas relativamente novas para complementar estudos biológicos, bem como a tentativa de se realizar um estudo interdisciplinar abre inúmeras possibilidades futuras na mesma linha de pesquisa. Algumas delas podem ser elencadas: (1) – estudar a interação das nanopartículas a nível mitocondrial, utilizando marcadores biométricos, por microscopia confocal, realizando um estudo quantitativo para tentar descrever de forma mais detalhada como se dá o processo de apoptose influenciado pelas AgNPs; (2) – estudar fenômenos de agregação em AgNPs em função do meio, utilizando a Teoria de Mie; (3) – estudar via espectroscopia Raman como se dá a metabolização do meio de cultivo em células expostas à AgNPs para verificar se a interação das NPs com o meio de cultivo estão produzindo espécies que aumentam a citotoxicidade e (4) – funcionalizar a superfície de nanopartículas e estudá-las em contato com células de músculo liso via microscopia confocal para tentar investigar a ação das AgNPs nas fibras de actina. Todas essas possibilidades abrem um leque grande de colaborações que podem ser realizadas entre a física, química e biologia no intuito de cada vez mais tentar descrever melhor os fenômenos que ocorrem a nível celular pela presença de nanopartículas altamente citotóxicas, como as AgNPs.

APÊNDICES

Apêndice A

Procedimento básico para subcultivo celular

PROCEDIMENTO BÁSICO PARA SUBCULTIVO CELULAR

A. Limpeza do Fluxo Laminar

1. Limpar o fluxo laminar com álcool etílico a 70% v/v.
2. Ligar o motor do fluxo e a lâmpada ultravioleta (~ 15–20 minutos).
3. Desligar a lâmpada U.V. e ligar a lâmpada normal.

B. Separação de Materiais de Trabalho

Separar os materiais de trabalho, desinfetá-los com álcool etílico a 70% v/v e dispô-los dentro do fluxo laminar, de forma a facilitar o trabalho. Preparar:

1. Pipetas descartáveis (graduações de 1, 5 e 10 mL).
2. Frasco esterilizado para descarte do meio, caso o fluxo não possua aspirador.
3. Pipetador automático.
4. Eppendorff – 2 unidades.
5. PBS, tripsina e DMEM (10% FBS – meio com soro).
6. Frasco de cultivo T-25 com células + 1 ou 2 novos frascos para subcultivo.
7. Acrescentar PBS para lavar o frasco de cultivo (5 mL).
8. Descartar o PBS no frasco de descartes.
9. Tripsinizar com 1 mL, levando na estufa (espalhar no frasco, dar leves batidas com as mãos até que as células estejam soltas).
10. Observar ao microscópio se as células soltaram do frasco de cultivo.
11. Acrescentar 4 mL de DMEM 10% FBS.
12. Homogeneizar lentamente e recolher 1 mL (eppendorff).
13. Observar as proporções de diluição. Normalmente usam-se as diluições: 100 mL de corante azul de Tripán para 400 μ L de cultura, fator de diluição (f. dil) 1.25 ou 100 μ L de corante azul de Tripán para 100 μ L de cultura, fator de diluição 2.
14. Inserir o meio de cultura diluído na câmara de Neubauer e proceder à contagem de células nos 8 quadrantes, obedecendo à equação:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células (8 quadrantes)} \times \text{f. dil.} \times 10^4}{8} = \text{n}^{\circ} \text{ de células/mL}$$

Essa primeira contagem fornece o número de células obtidas no subcultivo, x_{final} .

10. Preparar o novo frasco de cultivo que dará início ao próximo subcultivo, observando à equação:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

C_1 é a concentração celular (x_{final}) obtida na primeira contagem.

V_1 é o volume de cultura do frasco (para

C. Protocolo Para Contagem de Células

1. Retirar o meio de cultura (5 mL) e descartá-lo no frasco de descartes.

frascos T-25, o volume de cultivo é 5 ml).

C_2 é o número de células que são inoculadas no frasco T-25. Ex.: (1×10^5 cel/ml).

V_2 é o volume de cultura que temos. Ex.: (2 ml de cultura antiga + 4 ml de meio com soro para o novo subcultivo + 1 ml para contagem = 7 ml).

11. Proceder novamente à contagem de células a partir do item 8 deste protocolo e obter o x_{incial} ou x_0 celular.

12. Rotular os frascos de cultivo com: nome da célula / data / número do subcultivo / nome do responsável.

13. Levar os frascos de cultivo à estufa (37°C , 5% CO_2) com as tampas semi-rosqueadas (1/4 de rosca ou 3 meias voltas) caso os frascos não possuam filtro.

14. Fechar os materiais de cultura, lacrar com *parafilm* e papel alumínio e levá-los à geladeira.

15. Descartar os materiais utilizados e inservíveis nas lixeiras. Luvas, gases, pipetas devem ser dispostas em sacos plásticos autoclaváveis antes do descarte final.

16. Descartar o material do frasco de descarte em recipiente apropriado para esta finalidade e preenchê-lo com solução à base de cloro.

17. Lavar e secar a câmara de Neubauer e a lamínula.

18. Descartar os eppendorffs fechados em recipiente com cloro.

19. Desligar e cobrir o microscópio óptico.

20. Proceder novamente à limpeza do fluxo laminar, deixando a lâmpada U.V. e ventilação ligados por ~ 15 minutos.

21. Realizar o cálculo da viabilidade celular, obedecendo à equação:

$$\frac{\text{número de células vivas (contadas)}}{\text{número total de células (contadas)}} = \\ = \% \text{ de células viáveis}$$

22. Preencher uma planilha para controle dos experimentos.

D. Boas Práticas Experimentais e Recomendações Gerais de Biossegurança

1. Vestir avental.
2. Lavar as mãos com água e sabão neutro antes de iniciar o trabalho.
3. Calçar luvas descartáveis.
4. Esterilizar os equipamentos com álcool a 70% v/v antes de iniciar os trabalhos e após finalizá-los.
5. As tampas dos frascos e meios de cultura devem ser mantidas viradas para cima dentro do fluxo laminar para evitar contaminação cruzada.
6. Manipular tudo dentro do fluxo laminar.
7. Evitar colocar as mãos sobre os meios e frascos de cultivo.
8. Evitar que a ponta da pipeta toque luvas e frascos.
9. Evitar que os meios de cultura toquem as tampas dos frascos de cultivo.
10. Inserir a pipeta no pipetador automático de forma que a calibração fique visível ao usuário.
11. Não manipular frascos diferentes com a mesma pipeta para evitar contaminar os meios de cultura.
12. Não manter a estufa aberta por período prolongado para evitar que as culturas em crescimento sejam contaminadas.
13. Não fazer movimentos bruscos quando estiver manipulando frascos de cultivo.
14. Sempre homogeneizar suavemente a cultura antes da contagem.
15. Não esquecer de esterilizar o fluxo laminar antes de sair do laboratório, com a lâmpada ultravioleta.

Apêndice B

Equipamentos e meios de cultivos utilizados em subcultivos celulares

frasco T-25 para cultivo celular

pipetas sorológicas descartáveis

frascos T-25 com células em meio DMEM na incubadora

Estante para tubos

câmara de Neubauer

pipetador automático

micropipetas

microplaca de 96 poços

MEIOS DE CULTIVO

SFB

azul de Trypan

tripsina

PBS

DMEM

Apêndice C

Equipamentos presentes na Sala de Cultura do LabM²

incubadora de células

microscópio óptico

banho seco

centrífuga
citológica

tanque de nitrogênio líquido utilizado
para armazenar as células congeladas

fluxos laminares utilizados para a manipulação das culturas celulares

ÍNDICE

A

absorção óptica 52–54, 63, 64, 161
actina 137–139, 154, 165
AgNPs 21–26, 35–38, 40, 50–52, 62,
64, 66, 67, 71–73, 75, 93–99, 101,
108–110, 113, 116, 117, 119, 121,
123–125, 150–152, 154, 164, 165
agregação 42, 47, 62–67, 72, 75,
76, 79, 80, 93, 94, 96, 98, 100, 102,
120, 123, 161, 163
amortecedor 138, 142
antimicrobiano 21, 35
apoptose 24, 100, 101, 154, 165
armazenamento
 módulo de ... 144–146, 148, 151, 152
ATP 117, 123, 154
azul de Tripán 107

B

bimodal 75, 163
biodisponibilidade 93, 97, 98
biomecânica 135
borohidreto de sódio 39, 40
bottom-up 38

C

célula 21, 24, 27,
36, 43, 52, 56, 60, 64, 96–110, 112,
114, 116, 117, 119, 120, 123, 125,
153–155, 163–165
carga 37, 44, 47, 49, 67, 69, 72, 117
caspase 123, 154
cinética 103, 105, 111, 113, 114, 163
cisalhamento 140, 141, 145
citocromo c 101, 123, 154

citoesqueleto 137–139, 154, 165
Citometria Óptica de Torção Magnética
 25, 136, 145
citoplasma 100, 101, 117, 154
citossol 123, 154
citotoxicidade .. 25, 93, 98, 107, 109, 113,
116, 117, 119, 121, 123
citrato de sódio 39, 43
coloide 39, 43, 45, 50, 59, 68, 135, 161, 162
contração 139, 154, 165
controle .. 39, 42, 108, 110, 116, 117, 120,
125, 139, 150, 153, 154, 161, 162,
164
controle negativo 108, 116
cultivo celular ... 102, 106–108, 111, 116
cultura celular ... 93, 95, 96, 98, 102, 104,
106, 107, 111, 114

D

deformação . 135, 136, 138, 140, 142, 143,
145
diâmetro hidrodinâmico 58, 76
dispersão 39
DLS 57, 59, 60, 73–77, 79, 80, 163
DMEM 102, 106–108, 113, 116, 164
DNA 35, 100, 101, 104, 110, 119, 125
dose-resposta 118
DRX 70, 72

E

EDS 54, 55, 67, 68, 162
elasticidade 135, 152–155
endocitose 100, 101, 138
esfera de solvatação 58
espalhamento 45, 49, 52, 55, 57, 59, 61, 62,
64, 73, 76–78

espectro 45, 47, 52, 54, 56, 63, 64, 161
 espectrofotômetro 52, 108, 116
 estabilidade . 38, 42, 50, 58, 68, 72, 94, 96,
 161–163
 exposição 35, 97, 98, 108

F

fase de declínio ou morte celular . . . 104
 fase estacionária 104
 fase lag 104
 fase log 104
 fibroblasto 93, 101, 106, 116
 filopódio 138
 fluido newtoniano 141
 fluidos 93, 95–97, 113, 135, 148
 fluidos complexos 135
 fluorescência
 microscopia de . . . 110, 116, 124, 125

G

gaussiana 65, 66, 71, 162
 genotóxico 101

H

HeLa 93
 Hill
 função de 118
 histograma 57, 66, 161
 Hooke
 sólido de 140, 142, 143

I

IC₅₀ 119–121, 164
 in vitro 93, 98, 102
 ions . . 39, 40, 42, 50, 54, 58, 69, 76, 95–98,
 100, 123

IQ-USP 25, 50, 51, 63, 65–67, 71, 73,
 75, 79, 80, 110, 116, 117, 119, 120,
 125, 126, 150–152, 154, 162–164
 irradiação 46, 47

K

Khemia® 25, 26, 50, 67, 71–73,
 75, 79, 80, 110, 116, 117, 121, 122,
 150, 162–165

L

lamelipódio 138

M

mamíferos 98
 Maxwell
 modelo de 140, 143, 144
 mecânica dos meios contínuos 135
 microrreologia 135, 136
 microtúbulos 137, 138
 miosina 137, 165
 mola 138, 140, 142, 143
 monocamada celular . 102, 108, 114, 117,
 151
 monodisperso 39, 59, 73
 monomodal 73, 163
 movimento browniano 57, 58

N

núcleo 100, 107, 110, 124–126, 154
 nanomateriais 35
 nanopartículas biogênicas 42
 nanopartículas de prata . . 23, 26, 35, 37,
 39, 42, 45, 50, 66, 67, 69, 75, 76, 79,
 80, 93, 95, 101, 109, 117, 123, 124,
 151, 152, 155, 162, 163, 165
 NCTC-L929 111, 112, 115, 164

O

OMTC 149, 151, 153, 154, 165
 oxidação
 estados de 36, 37, 69, 162

P

perda
 módulo de 144–146, 148, 152
 pH 38, 39, 94, 95, 97, 106, 117, 123
 polímeros 43, 94
 polidisperso 39, 60–62, 66, 73, 78, 79, 163
 poliol 40, 41, 50
 potencial Zeta 58, 59, 162
 propriedades mecânicas ... 25, 135, 136,
 151–154, 165
 proteína 35, 94, 95, 97, 101, 103, 137–139,
 154
 proteína coroa 96
 PVP 22, 40, 50, 63, 75, 79, 94, 123, 124, 163

Q

química verde 40, 41

R

radiação 43, 55, 56, 63
 raio de giro 62, 78, 80, 163
 raios X 54, 56, 58, 61, 62, 69, 70, 162
 RASM ... 25, 106, 108, 110, 111, 113, 115,
 116, 125, 149, 164
 redshift 44, 45, 64
 reológica 135, 146
 resposta mecânica 135, 154
 rigidez 137, 154
 RNA 119
 RPSL 43–45, 64, 67, 161

S

síntese 38–40, 43, 58
 SAXS 61, 62, 78–80, 163
 SDS 119, 120
 SERS 45, 46
 SFB 97, 108, 110, 112–116, 149, 151
 soluções aquosas 38, 50, 93, 97
 Stern
 camada de 58
 Stokes–Einstein
 equação de 58, 59
 stress
 fibras de 137, 139, 154
 suspensão . 38, 47, 57, 59, 60, 98, 99, 108,
 110, 135

T

TEM 41, 67, 69, 72, 75, 76, 79, 80, 98, 162,
 163
 tempo de duplicação . 103, 105, 111, 114,
 116
 tensão 136, 140–143, 145
 tiol 95, 96
 Tollens
 método de 40, 41
 top–down 38
 toxicidade .. 23, 24, 37, 93, 95, 97, 99–101

V

velocidade específica de crescimento 103,
 105
 vermelho neutro . 107, 108, 117, 120, 121
 viabilidade celular 99, 104, 107, 116, 118,
 120, 121, 125, 154, 163, 164
 viscoelasticidade 142, 161, 165
 viscosidade 135, 141, 142, 153