UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RODRIGO BERTÉ

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
CONJUGADAS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

São Carlos

2013

RODRIGO BERTÉ

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
CONJUGADAS COM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Berté, Rodrigo

Síntese e caracterização de nanopartículas de prata conjugadas com peptídeos antimicrobianos / Rodrigo Berté; orientador Rodrigo Berté - versão corrigida -- São Carlos, 2013.

102 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Nanopartículas de prata. 2. Peptídeos antimicrobianos. 3. Dermaseptina 01. I. Berté, Rodrigo, orient. II. Título.

Ofereço este trabalho em memória de meus avós,
em especial à de Seu Nestor,
para quem "a maior alegria é ver os neto tudo formado".

Agradecimentos

Agradeço a meus pais, Beatriz e Vilmar, por todo o apoio, tempo e dedicação em mim depositados. Não sei estimar o quanto devo a ambos.

Às minhas irmãs, Bárbara e Vitória, e ao meu irmão Guilherme, cujas diferenças a mim só acrescentam.

À Livia pelo carinho, companheirismo e por tolerar meu mau-humor crônico. A sua família pela hospitalidade e atenção.

Ao Arnaldo e Jaqueline Cherulli e à Nathy pela gentileza e hospitalidade.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela paciência, amizade e oportunidade.

Ao Prof. Dr. José Roberto S. A. Leite pelas discussões e pela Dermaseptina liofilizada, a qual, um dia, pretendo devolver.

À Andressa e à Bel por todo o auxílio prestado.

Ao Elias A. Berni, pelas primeiras nanopartículas.

À Dra. Juliana Cancino e à Dra. Iêda Paino pelos experimentos com células e operação do Citômetro de Fluxo.

Ao Dr. Edson Crusca e ao Dr. Murilo Cabral, pelas discussões.

À Valéria Marangoni, pelo auxílio com os equipamentos, em especial, pela realização das medidas de ITC.

Pelas conversas, conselhos, devaneios e insatisfações compartilhadas, aos bons e velhos: Atílio, Kx, Ivan, João, Jú Arcanjo, Luciano, Pedrão, Ramon, Thuminhas, Vinícius e Xará.

Aos amigos do agora GNano.

À Cristina, pela prontidão e revisão deste trabalho. Ao Ricardo e ao Silvio pela atenção e disposição em resolver minha incompetência burocrática.

À Capes, pelo financiamento parcial.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"A vida transmitia-se assim no absurdo e na desordem daquela viagem. (...) Por que terrível molde terão passado, por que estranha máquina de entortar homens? (...)

E eu pensei: o problema não reside nessa miséria, nem nessa sujeira, nem nessa fealdade. (...) O que me atormenta não é essa miséria na qual, afinal de contas, a gente se acomoda, como no ócio.

O que me atormenta, as sopas populares não remediavam. O que me atormenta não são essas faces escavadas nem essas feiuras.

É Mozart assassinado, um pouco, em cada um desses homens."

(Terra dos Homens - A. de Saint-Exupéry)

Resumo

BERTÉ, R. **Síntese e caracterização de nanopartículas de Prata conjugadas com peptídeos antimicrobianos**. 2013. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Realizou-se a síntese de nanopartículas de Prata (AgNps) estabilizadas com Citrato de Sódio através de redução química utilizando Borohidreto de Sódio, com posterior avaliação da interação destas com o peptídeo antimicrobiano Dermaseptina 01. Para a caracterização da conjugação dos constituintes, foram empregadas técnicas dentre as quais espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), espalhamento dinâmico de luz (DLS), medidas de potencial Zeta (ζ), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIRS), espectroscopia de dicroísmo circular (CD), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e espectroscopia de fluorescência. Alterações em intensidade e posição das bandas no espectro de extinção, aumento dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas e transição do sinal do potencial Zeta apresentado sugerem uma interação dependente da razão das concentrações das espécies empregadas. Medidas de FTIRS sugerem alterações em bandas relacionadas ao grupo tiol presente no resíduo de Cisteína do C-terminal da DS 01, sugerindo uma interação covalente desta com as nanopartículas. Observou-se por ITC, qualitativamente, uma interação exotérmica de ambas as espécies, enquanto medidas de CD demonstraram alterações características de estrutura secundária da DS 01 quando em contato com superfícies hidrofóbicas. A espectroscopia de fluorescência, empregadas aqui em Nps menores, sugere supressão da fluorescência do Triptofano da DS 01 por formação de complexo, em detrimento de processo colisional. Ensaio antimicrobianos contra cepas de *E. coli* DH5- α realizados em diluição seriada do complexo sugerem ser este menos efetivo do que as AgNps livres, supomos em virtude da menor quantidade de íons Ag^+ liberados. Ensaio de citotoxicidade com fibroblastos de fígado saudável (FCH3) demonstraram indução de apoptose e estado de necrose para o complexo e seus constituintes.

Palavras chave: Nanopartículas de Prata. Peptídeos antimicrobianos. Dermaseptina 01.

Abstract

BERTÉ, R. **Synthesis and characterization of silver nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides**. 2013. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The chemical synthesis of Citrate stabilized Silver nanoparticles (AgNps) using Sodium Borohydride as a reducing agent was performed, with further evaluation of its interaction with the antimicrobial peptide Dermaseptin 01. For such, techniques as UV-Vis spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential measurements (ζ), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIRS), Circular Dichroism spectroscopy (CD), Isothermal titration calorimetry (ITC) and Fluorescence Spectroscopy were employed. Changes in intensity and position of the plasmon band, increase in hydrodynamic diameter and Zeta potential signal transitions were observed in a concentration ratio-dependent fashion. FTIRS measurements showed displacement in bands related to the thiol group of the C-terminal Cysteine residue of the peptide, which suggests a covalent interaction between the DS 01 and the AgNps. Exothermic interactions and secondary structure changes commonly observed for the DS 01 in contact with hydrophobic surfaces resulted from ITC and CD analysis, respectively. Quenching of the peptide's Tryptophan residue fluorescence, performed with AgNps of smaller size, indicates the formation of a static complex rather than a collision-driven process. AgNps showed to be more effective against *E. coli* (DH5- α strain) than the complex AgNp-DS 01, probably due to the slower Ag^+ release provided by the stabilizing effect of covalent attachment of the peptide. Increase in apoptosis and necrosis were observed as an outcome of exposing healthy liver fibroblast (FCH3) to the complex and, separately, to its constituents.

Keywords: Silver nanoparticles. Antimicrobial peptides. Dermaseptin 01.

Abreviaturas

Ag^0	Prata metálica
Ag^+	Íon prata
AgNO_3	Nitrato de Prata
AgNps	Nanopartículas de Prata
CD	<i>Circular Dichroism</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DS 01	Dermaseptina 01
FITC	<i>Fluoresceine isothiocyanate</i>
FTIRS	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
K^+	Íon de Potássio
LB	Luria-Bertani
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
mm	Milímetro
NaBH_4	Borohidreto de Sódio
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Sumário

1. Introdução	21
2. Revisão bibliográfica	25
2.1. Nanomedicina e nanotoxicologia.....	25
2.2. Prata e suas nanopartículas.....	30
2.2.1. Mecanismos de ação.....	30
2.2.2. Resistência à Prata.....	36
2.2.3. Toxicidade da Prata.....	37
2.3. Peptídeos Antimicrobianos.....	38
2.3.1. Dermaseptina 01.....	40
3. Materiais e Métodos.....	43
3.1. Materiais.....	43
3.2. Métodos.....	43
3.2.1. Síntese de nanopartículas de Prata e sua funcionalização com a DS 01.....	43
3.2.2. Espectroscopia Ultravioleta-Visível.....	45
3.2.3. Espalhamento dinâmico de luz.....	48
3.2.4. Potencial Zeta (ζ).....	50
3.2.5. Estimativa da concentração de nanopartículas em solução.....	51
3.2.6. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	52
3.2.7. Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	53
3.2.8. Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	54
3.2.9. Ensaio Antimicrobianos.....	54
3.2.10. Ensaio de Citotoxicidade - Citometria de Fluxo.....	55
3.2.11. Espectroscopia de Fluorescência.....	56
4. Resultados e discussão.....	59
4.1. Síntese de AgNps.....	59
4.2. Funcionalização das AgNps com a DS 01.....	61
4.2.1. Curvas de calibração para AgNPs e soluções estoque da DS 01.....	61

4.2.2. Funcionalização - Espectroscopia UV-Vis.....	64
4.2.3. Funcionalização - DLS e Potencial Zeta.....	68
4.2.4. Funcionalização - Dicroísmo Circular (CD).....	71
4.2.5. Funcionalização - FTIRS.....	72
4.2.6. Funcionalização - Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	76
4.3. Ensaio Antimicrobianos.....	78
4.4. Ensaio de Citotoxicidade - Citometria de Fluxo.....	83
4.5. Espectroscopia de Fluorescência.....	86
5. Considerações finais e perspectivas.....	91
Referências.....	93

1 Introdução

1.1 Introdução

Quando Richard Feynman em sua palestra sobre nanociência e nanotecnologia, *"There's plenty of room at the bottom!"*¹, tentou cativar a comunidade científica sobre as possibilidades existentes nesta mudança de escala, seu gênio criativo provavelmente pouco podia vislumbrar todos os fenômenos e aplicações que surgiriam nesta área. Seu argumento era o de que sempre há fenômenos novos e interessantes a serem explorados ao adentrar em escalas diferentes das que estamos habituados, sejam de baixas temperaturas, altas pressões ou altas energias. De maneira semelhante, P.W. Anderson, em artigo publicado em 1972², nos diz que "novos fenômenos surgem em sistemas complexos, e apesar dos mesmos serem um agregado de partículas sujeitas às mesmas leis fundamentais", tais fenômenos "não podem ser entendidos como uma simples extrapolação das propriedades dessas partículas". Anderson denota assim, um pouco, a limitação de nossa capacidade de modelar afirmando que "em cada nova escala há de se desenvolver modelos tão fundamentais quanto as leis que regem seus constituintes".

O interessante, porém, é o fato de que as fronteiras entre as escalas não são exatamente bem definidas, sendo por vezes os sistemas classificados de maneira subjetiva. Como exemplo, denomina-se nanociência o estudo de materiais com ao menos uma dimensão aproximada entre 1 e 100 nanômetros, mas esse intervalo não necessariamente define comportamentos distintos para o sistema.³ Em termos experimentais, as condições para essas fronteiras também ainda estão a ser delimitadas, sendo observados padrões de difração de moléculas cada vez maiores⁴ e o acoplamento da sobreposição de estados quânticos em microrressonadores, objetos visíveis a olho nu.⁵⁻⁶ Em contrapartida, a manipulação da matéria em escala atômica, em especial com a utilização da ponta de prova de um Microscópio de Tunelamento, demonstrou a permanência do modelo clássico da lei de Ohm em um fio com 4 átomos de largura e apenas um átomo de altura.⁷

Além da importância em ciência pura, como na verificação da separação do elétron em três novas quase partículas em sistemas *quasi* unidimensionais⁸⁻⁹, a nanociência tem ganhado destaque em áreas aplicadas, prometendo revolucionar desde a área cosmética¹⁰, até a captação mais eficiente de energia solar¹¹, passando pela eletrônica¹² e o diagnóstico e tratamento mais eficiente de doenças relevantes.¹³ Ao pesquisar a palavra-chave "nano" na base de dados Web of Science, separando os resultados pelo ano de publicação, pode-se ter uma ideia do quanto essa área tem despertado interesse (Fig. 1), para a qual estima-se um mercado superior a US\$ 2 trilhões em 2014.¹⁴

Figura 1 - Evolução temporal para resultados do tópico "nano" na base de dados Web of Science.

As propriedades exploradas em escala nanométrica neste trabalho não são novas, mas há tempos conhecidas pela humanidade, no caso, a capacidade da prata em evitar infecções e sua toxicidade em relação a diversos micro-organismos.¹⁵ A vantagem de se trabalhar em menores escalas de tamanho é o aumento considerável da razão superfície-volume de qualquer material, incrementando quaisquer efeitos de superfície desejados, como a liberação de íons de prata para o meio, aparentemente os responsáveis pela toxicidade do material contra micro-organismos.¹⁶ Com a emergência de organismos resistentes a diversos antibióticos¹⁷, a busca de alternativas de tratamento para as infecções se mostra de grande interesse, e os compostos de prata até então tem se mostrado de

enorme valia nesta tarefa, sendo inclusive incorporados em uma enorme gama de produtos comerciais.¹⁸

Em face ao surgimento de organismos resistentes, diversas soluções têm aparecido como eventuais alternativas aos antibióticos canônicos, sejam compostos poliméricos com lise seletiva de membranas de fungos e bactérias¹⁹, terapia fotodinâmica²⁰, ou novas classes de antibióticos, dentre as quais encontram-se os peptídeos antimicrobianos. Estes são pequenas proteínas, primeiramente isoladas de alguns vertebrados, com amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos e protozoários, possuindo, além disso, baixa toxicidade para células de mamíferos.²¹ Isso torna esse grupo de moléculas excelentes candidatos futuros a tratamentos de infecções. Neste trabalho buscamos estudar a interação de nanopartículas de prata com o peptídeo antimicrobiano Dermaseptina (DS01), extraído pela primeira vez da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*, na tentativa de produzir um composto estável e eficiente como possível alternativa contra agentes patológicos.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Nanomedicina e Nanotoxicologia

Tal qual a definição de nanociência -por conseguinte nanotecnologia-, o termo "nanomedicina" mostra-se difícil de ser definido, havendo divergência entre autores tanto em seu sentido amplo²² -atendo-se mais fortemente ou não à própria definição de nanotecnologia- quanto nos limites de escala em que o mesmo se encontra.²² Esse termo é relativamente recente, aparecendo na literatura pela primeira vez por volta do ano 2000, já despertando, porém, grande preocupação em definir políticas adequadas de regulação e investimento a longo prazo para o setor, a fim de explorar de maneira plena sua potencialidade.²³ É possível ter noção do crescente interesse na área ao procurar pelo tópico "nanomedicine", separando os resultados pelo ano de publicação, na base de dados Web of Science:

Figura 2 - Evolução de publicações com o tópico "nanomedicine".

Ao levar-se em consideração que os fenômenos biológicos ocorrem todos em escala nanométrica, tanto no armazenamento ou na expressão da informação quanto no

metabolismo, a distinção entre a medicina tradicional e a nanomedicina se torna mais tênue. O próprio Feynman deixou claro que o problema de se reduzir a quantidade de matéria necessária para se armazenar um bit de informação já havia sido resolvido pela natureza há muito tempo. Ao usar da ordem de 10^2 átomos para cada bit, ele estimou o volume de um grão de areia como suficiente para armazenar toda a produção bibliográfica da humanidade até então¹, enquanto as células usam cerca de 50 átomos para cada bit, levando em conta o par de nucleotídeos na dupla-fita de DNA. Por enquanto, como recentemente publicado, a utilização de DNA depositado em substrato sólido atingiu a maior densidade de bits por mm^3 já obtida pelo ser humano.²⁴

A definição então de nanomedicina é dada como a exploração de materiais produzidos e que exibem propriedades diferenciadas na escala nanométrica para o diagnóstico, tratamento, avaliação e controle de processos biológicos na saúde humana.²⁵ Para alguns autores o tamanho dos dispositivos usados estende-se além do intervalo de 1 a 100 nm presente na definição de nanociências, atingindo cerca de 500 nm^{26} , ou mesmo 1.000 nm^{22} , evocando os efeitos diferenciados acima citados para justificar o intervalo adotado. Para os objetivos gerais da definição de nanomedicina, diversos materiais nanoestruturados têm se mostrado promissores.

A aplicação de nanopartículas superparamagnéticas de Óxido de Ferro como agente de contraste na produção de imagens por ressonância magnética permitiu a detecção mais sensível e eficiente de metástases linfáticas de câncer de próstata, algumas delas antes invisíveis a qualquer outra técnica por imagem não invasiva.²⁷ Isso permite um tratamento mais adequado e um prognóstico mais confiável ao paciente, não sendo necessária nenhuma adaptação dos equipamentos convencionais de ressonância magnética para a aplicação do método. O encapsulamento de moléculas de interesse para o aumento de biodisponibilidade e redução de efeitos colaterais têm também demonstrado resultados notórios.

Para uma forma de melanoma com presença de metástases, a terapia com proteínas estimulantes do sistema imunológico torna-se a única opção viável, dada a ineficácia de procedimentos cirúrgicos, radioterapia e quimioterapia convencionais. Essa opção, no entanto, causa remissão durável da doença em pouco mais de 5% dos casos. Em estudo

recente¹³, a aplicação de nanoestruturas como carreadoras de tais proteínas estimulantes e de moléculas inibidoras de imunossupressores liberados pelo tumor, aumentou de maneira dramática a sobrevivência de animais submetidos ao tratamento. Além do combate ao câncer, o encapsulamento em vesículas que liberam seu conteúdo sob cisalhamento demonstra grande potencial para liberação local de drogas ao passar por vasos sanguíneos comprimidos pela arteriosclerose²⁸, uma inflamação da parede do vaso causada pela deposição de gordura.

Outras estruturas que estão chamando atenção nesse cenário são pequenos cristais de materiais semicondutores, como ZnSe ou CdS, e cuja resposta a aplicação de um campo eletromagnético é fortemente dependente do tamanho. Isso se dá pela evolução da densidade de estados à medida que mais pares de átomos são adicionados ao cristal, e a diferença de energia entre as bandas de valência e condução, que se desenvolvem a partir dos estados ligante e antiligante, é assim alterada.²⁹ Esses nanocristais, chamados pontos quânticos (*quantum-dots*), em geral inferiores a 10 nm, possuem um amplo espectro de excitação e um espectro estreito de emissão dependente do tamanho, o que os torna excelentes como múltiplos biomarcadores para investigação da dinâmica de processos celulares e diagnóstico *in vivo*³⁰, dada também sua elevada estabilidade quando sujeitos à radiação eletromagnética.

Nanopartículas metálicas têm também encontrado uma miríade de aplicações que, assim como os exemplos previamente citados, advém de efeitos interessantes que surgem em escala nanométrica. Dentre eles, os que certamente se destacam para esse conjunto de nanoestruturas são os efeitos do aumento da superfície disponível para uma mesma massa do material quando comparada ao mesmo em forma de corpo extenso (*bulk*) e suas diferenciadas propriedades ópticas. No primeiro caso cita-se a catálise de reações químicas com o emprego de nanoestruturas de Platina e Paládio³¹, novamente pelo aumento da razão superfície-volume, e no segundo a capacidade do emprego de nanopartículas de Ouro como agentes teranósticos (terapia e diagnóstico conjuntos).³² O emprego das propriedades ópticas diferenciadas das nanopartículas demonstraram, além disso, a capacidade de detecção em tempo real da ligação de uma única molécula (*real-time single-molecule event*) da proteína streptavidina a nanobastões de ouro funcionalizados com biotina³³, através de

alterações locais do índice de refração, o que reflete em alterações no espectro de absorção do nanobastão.

Sistemas tão sensíveis quanto este último podem ser empregados no futuro para diagnóstico precoce de doenças, em que pequenas concentrações de proteínas ou outras moléculas de interesse em um fluido corporal podem ser medidas, antes mesmo que qualquer outro sintoma se manifeste. Sensibilidade semelhante foi demonstrada recentemente³⁴, porém com o uso de um ressonador nanoeletromecânico, em que um único evento de adsorção na superfície do sistema era medido por alterações na frequência de dois modos de vibração do dispositivo. Fora da área médica, as propriedades ópticas das nanopartículas metálicas estão sendo usadas, por exemplo, para aumentar a eficiência de conversão de energia solar em filmes finos¹¹, ou como guias de onda operando abaixo do limite de difração, através do acoplamento de excitações coletivas de elétrons na superfície de nanopartículas adjacentes.³⁵

Apesar das promessas oferecidas pelos novos materiais em nanoescala, há uma grande preocupação com relação aos possíveis efeitos ambientais e na saúde decorrentes da exposição aguda ou crônica a essas estruturas, principalmente quando aplicados em produtos comerciais e produzidos em larga escala. Dessa situação nasceu o campo de pesquisa denominado Nanotoxicologia³⁶, no qual culturas de células (estudos *in vitro*) e animais modelo (*in vivo*) são submetidos a diversos materiais nanoestruturados a fim de avaliar sua toxicidade.

Descrever de maneira sistemática os efeitos dos nanomateriais nos organismos vivos requer, no entanto, uma caracterização completa de todos os parâmetros relativos ao material. Podemos citar: o tamanho e a distribuição de tamanhos do nanomaterial, seus constituintes, sua forma, os ligantes de sua superfície, sua área em contato com o meio, seu comportamento em solução do meio de interesse, dentre outros. Em estudos *in vivo* é necessário também explicitar a rota de exposição do organismo, seja pela pele, intravenosa, por ingestão ou inalação. Uma classificação incompleta, em que o sistema não seja descrito de maneira unívoca, pode tornar os resultados duvidosos e de pouca utilidade.³⁷

Ainda assim, não é possível dizer, *a priori*, os eventuais efeitos em um sistema biológico dada uma configuração de um sistema nanoestruturado.³⁸ Isso decorre do fato de

que cada um dos parâmetros acima citados influencia a resposta do organismo quando exposto ao material. Alguns autores afirmam, portanto, que a toxicidade dos nanomateriais deve ser avaliada caso a caso.³⁹ Além disso, não é possível prever, por exemplo, a biodistribuição em um organismo de um nanomaterial apenas pelo seu efeito observado em testes usando culturas de células, logo, extrapolar os resultados observados em estudos *in vitro* para organismos vivos não necessariamente é verdadeiro.³⁸ Desse último caso podemos citar a toxicidade de pontos quânticos semicondutores observada *in vitro*⁴⁰, porém em publicação recente, a injeção em macacos resos de nanopartículas de núcleo de CdSe e casca CdS-ZnS funcionalizadas com fosfolipídios, não demonstrou nenhum efeito colateral observável em 90 dias.⁴¹ Apesar de 90% do cádmio injetado ainda estar acumulado em órgãos como rins e fígado após esse período, exames histológicos não demonstraram sinal de morte celular ou resposta inflamatória.⁴¹

Da dificuldade em estabelecer modelos preditivos de toxicidade e das conclusões aparentemente paradoxais obtidas em alguns casos, não estão disponíveis até hoje políticas de regulação adequada para os nanomateriais por parte dos órgãos responsáveis, embora alguns autores justifiquem essa demora na baixa qualidade dos dados produzidos⁴², ou em uma procrastinação em favor de partes interessadas.⁴³ Todos concordam, no entanto, da urgência necessária em regular o uso dos nanomateriais.

Para este trabalho, as propriedades que mais interessam são efeitos de superfície em nanopartículas de Prata, sua elevada área de contato com o meio externo e capacidade de funcionalização com moléculas orgânicas. As propriedades ópticas dessas nanopartículas serão também empregadas na caracterização do sistema, e descritas nas seções apropriadas.

2.2 Prata e suas Nanopartículas

2.2.1 Mecanismos de ação

Compostos de Prata, em especial o Nitrato de Prata (AgNO_3), há séculos são empregados no tratamento e prevenção de infecções, muito embora o uso desses compostos tenha diminuído de maneira significativa a partir da década de 1940 com o advento de outros antibióticos, como a penicilina.¹⁵ A emergência de bactérias resistentes a diversos antibióticos fez retomar o interesse pela Prata, que, dentre os metais estudados, apresenta a maior atividade contra diversos micro-organismos.¹⁵ Quando comparadas a desinfetantes comuns como Hipoclorito de Sódio e Fenol, nanopartículas de Prata exibiram concentração mínima bactericida inferior e atividade antimicrobiana mais duradoura do que os demais desinfetantes.⁴⁴

Os mecanismos de ação, tanto dos sais de Prata, quanto de sua forma metálica nanoestruturada foram apenas parcialmente elucidados, e aparentam ser múltiplos. Apesar disso, alguns efeitos observados foram os mesmos para a prata iônica Ag^+ dos sais e a reduzida Ag^0 das nanopartículas, sendo diferentes apenas nas concentrações mínimas de inibição, no caso, da ordem de micromolar para o AgNO_3 e nanomolar para nanopartículas de cerca de 10 nm de diâmetro em estudos realizados com *E. coli*⁴⁵, não sendo fornecida razão satisfatória pelos autores para tal diferença. Se utilizada a concentração em massa, o valor para o AgNO_3 mostra-se, em geral, inferior ao de AgNps.⁴⁶⁻⁴⁸ Foi observada uma redução significativa das concentrações de K^+ e ATP intracelular em poucos minutos após o tratamento para ambas as espécies de Prata.⁴⁵ Houve também, nesta mesma escala de tempo, dissipação da chamada força motriz de prótons^{49;45}, a diferença de potencial químico e elétrico existente entre a parte interna e externa da membrana celular gerada pelo transporte ativo de H^+ , necessária para a síntese de ATP.

Com efeito, Schreurs e Rosenberg⁵⁰ reportaram que dois sistemas - denominados Pit e Pst - responsáveis pelo acúmulo de Fosfato inorgânico (PO_4^{4-}) e dependentes da força motriz de prótons e de ATP, respectivamente, cessaram de funcionar ao expor diferentes

cepas de *E.coli*, cada uma provida apenas com um dos sistemas⁵¹, à prata iônica em concentrações de micromolar.⁵⁰ Nesse caso, o sistema Pst - cuja velocidade máxima de transporte de fosfato é semelhante à do sistema Pit, porém com uma afinidade pelo substrato duas ordens de grandeza maior⁵²- mostrou-se consideravelmente mais resistente à ação da prata. Não somente a absorção de fosfato foi comprometida, mas observou-se também a perda de fosfato acumulado - além de outros compostos como manitol, succinato, prolina e glutamina -, não sendo esse um processo espontâneo em função da inibição seletiva da entrada desse composto, uma vez que tal efeito não foi obtido ao diluir em um meio livre de fosfato inorgânico células que acumularam previamente tal substrato.⁵⁰

Porém, ao considerar que o fosfato absorvido pelas células é rapidamente esterificado, caso a exposição à prata resultasse em um dano direto à membrana celular durante os poucos minutos de contato com as células, essa forma de fosfato seria liberada no meio, e uma vez que a imensa maioria do fosfato liberado consistia em sua forma inorgânica, os autores sugerem a presença de um carreador específico para a saída do mesmo.⁵⁰ Conheciam-se até então alguns efeitos dos íons de prata, dentre os quais a capacidade em inibir enzimas da cadeia respiratória⁵³ (abolição do consumo de oxigênio na presença de diferentes fontes de carbono, e ausência da forma reduzida de enzimas tais quais o citocromo a_2), a ação como desacopladores da fosforilação oxidativa⁵⁴ (realizar o transporte de prótons através da membrana sem a concomitante síntese de ATP, efeito em geral obtido com ácidos fracos apolares⁵⁵) e elevada reatividade com grupos tiol. Outras moléculas de semelhante modo de ação foram então testadas, incluindo o cianeto, como inibidor da cadeia respiratória, o 2,4-dinitrofenol como desacopladora da fosforilação oxidativa e a N-etilmaleimida como reagente de grupos sulfidril. Porém em nenhum caso observou-se a perda considerável de fosfato acumulado, levando à conclusão de que a prata não pode agir de maneira única por cada modo acima enunciado.⁵⁰

Considera-se um efeito característico de um desacoplador da fosforilação oxidativa a estimulação da respiração, observado pelo aumento no consumo de oxigênio⁵⁵⁻⁵⁶, processo naturalmente regulado pela presença de ADP.⁵⁷ No caso da Prata, os efeitos acima mencionados parecem se contradizer - a estimulação da respiração em função do desacoplamento da fosforilação oxidativa e a inibição de enzimas da cadeia respiratória -. De fato, o estímulo à respiração é fortemente dependente da concentração de Ag^+ , ocorrendo

por um breve período para concentrações de até 5 μM na presença de 5×10^9 UFC/ml de *E. coli*⁵⁶, sendo que para concentrações maiores de prata há inibição direta do processo. Como dito, compostos hidrofóbicos fracamente ácidos são representativos dos desacopladores através de seu efeito protonofórico, o transporte de H^+ através da membrana impermeável ao mesmo, desfazendo a força motriz de prótons sem afetar, em sua maioria, enzimas da cadeia respiratória ou a responsável pela síntese de ATP.⁵⁵ Presume-se que os íons de Prata, por sua vez, obtenham tal efeito ao interagir com proteínas responsáveis pelo bombeamento de íons H^+ para o exterior, ao invés de com a bicamada lipídica em si.⁵⁶

Nanopartículas de Prata e íons de Prata causaram também, assim como observado por Lok e colaboradores através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, um acúmulo de precursores de proteínas expressas em condições de stress, cujo processamento à forma madura é dependente da força motriz de prótons e de ATP.⁴⁵ Sondi e Salopek-Sondi⁵⁸ observaram por Microscopia Eletrônica de Transmissão o acúmulo de nanopartículas de Prata de cerca de 12 nm após 1 hora de exposição na região da membrana plasmática de *E. coli*. Escavações eram presentes nessa estrutura após 4 horas de exposição às nanopartículas, escavações as quais, segundo os autores, tornam as células inviáveis.⁵⁸

O tratamento com AgNO_3 causou a separação entre a membrana e a parede celular para espécies Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*S. aureus*), e o rompimento dessas estruturas no caso da espécie Gram-negativa, após no mínimo 4 horas de exposição⁵⁹. Haviam também estruturas granulares compostas de Prata e Enxofre -demonstrado através de emissão de Raios-X induzida por elétrons (EDX) - presentes no citoplasma e em maior quantidade ao redor das células, apresentando um menor tamanho para a espécie Gram-positiva.⁵⁹ Segundo os autores, esses fatos sugerem um papel importante da parede celular mais espessa da espécie Gram-positiva como proteção contra a penetração de Ag^+ no citoplasma, muito embora não tenha sido demonstrada em tal estudo a necessidade de uma concentração mínima inibitória maior para a *S. aureus* (ambas as espécies tratadas com $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AgNO_3 , correspondente a $93 \mu\text{M}$ de íons Ag^+).⁵⁹ Em ambos os casos, o material genético das células encontrava-se condensado na região central e livre de estruturas granulares - formadas pela interação da Prata com grupos tiol de proteínas -, sugerindo um mecanismo de proteção ao DNA pela expressão induzida de proteínas nessa condição de

stress⁵⁹, o que está de acordo com o observado por Lok e colaboradores.⁴⁵ Supõe-se que nesse estado o DNA perca sua capacidade de replicação.⁵⁹

Em contrapartida, tal região de DNA condensado e de baixa densidade de elétrons não foi observada ao submeter por 30 minutos células de *E. coli* a nanopartículas de Prata de tamanho em torno de 20 nm de diâmetro.⁶⁰ Os autores reportaram, no entanto, uma distribuição isotrópica das nanoestruturas nas células observadas - tanto na superfície quanto no citoplasma - e que somente nanopartículas inferiores a 10 nm presentes na distribuição interagem com as bactérias, justificando esse fato pela maior porcentagem de área da superfície da nanopartícula a interagir com as bactérias, quanto menor seu tamanho.⁶⁰ Mais recentemente, observou-se o estado condensado do DNA ao tratar células de *S. aureus* com nanopartículas de Prata por 6 horas, e a lise completa da membrana após 12 horas de exposição às nanopartículas⁶¹, o que sugere que os efeitos observados dependem fortemente do tempo de contato.

Morones e colaboradores demonstram⁶⁰, no entanto, que ao diluir nanopartículas de Prata em meio Luria-Bertani, há pronta liberação de íons Ag^+ em concentrações próximas a $1 \mu\text{M}$ - valor considerado suficiente por outros autores^{49;56} para causar a morte das bactérias -, reconhecendo que os íons liberados contribuem para a atividade bactericida do composto.⁶⁰ Ademais, os autores assumem a elevada atividade das nanopartículas de Prata em função da interação entre a membrana negativa das bactérias e da carga positiva adquirida pelas nanopartículas através do atrito com a matriz de carbono na qual as mesmas se encontravam, fato rebatido por outros autores^{45;62} ao reportar atividade em concentrações de prata de mesma ordem de grandeza (dezenas de $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ou dezenas de nM de Nps) usando nanopartículas estabilizadas com Citrato de Sódio, cujo íon Citrato é negativo em condições fisiológicas.⁶³

A exposição a íons de Prata leva à geração de espécies reativas de oxigênio, como reportado por Park e colaboradores ao analisar cepas de *E. coli* dotadas de sistemas proteicos de sinalização sensíveis a diferentes espécies reativas, havendo em especial a produção do íon superóxido (O_2^-) em detrimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).⁶⁴ Presume-se a inativação da enzima Superóxido Dismutase - responsável por transformar O_2^- em H_2O_2 e O_2 - por íons de Prata.⁶⁴ Interessante notar, porém, que a produção de espécies

reativas de oxigênio é dependente da concentração de Ag^+ empregada, sendo maior para valores próximos a $0.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($2.8 \mu\text{M}$), caindo de maneira considerável para concentrações superiores a $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($4.6 \mu\text{M}$), valores estes que estão de acordo com os limites observados para a estimulação da respiração celular por Holt e Bard.⁵⁶

A semelhança dos valores para os diferentes efeitos reforça a hipótese de que a produção de espécies reativas de oxigênio decorre da ação dos íons de Prata em certas enzimas da cadeia respiratória^{56;64}, especialmente nos complexos proteicos da cadeia transportadora de elétrons^{53;56}, responsáveis, inclusive, pelo transporte de H^+ através da membrana.⁵⁷ Em condições anaeróbias, a considerável redução da mortalidade das bactérias revela a importância das espécies reativas de oxigênio na atividade bactericida dos íons de Prata, em especial para menores concentrações destes.⁶⁴ Houve significativa contribuição das espécies reativas para a atividade bactericida ao usar uma concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($9.2 \mu\text{M}$)⁶⁴ de Ag^+ , muito embora tenha se observado inibição direta da respiração para concentrações de Ag^+ ligeiramente maiores ($10 \mu\text{M}$).⁵⁶

Nanopartículas de Prata de aproximadamente 15 nm de diâmetro em contato com bactérias nitrificantes também levaram à produção de espécies reativas de oxigênio⁶⁵, como observado através do emprego de um marcador fluorescente (2',7'-diclorofluorescina) de maior sensibilidade, dentre as espécies reativas, ao Peróxido de Hidrogênio.⁶⁶ A quantidade de espécies reativas produzidas, função da intensidade de fluorescência observada, foi maior para as nanopartículas em comparação aos íons de Prata, quando adicionados em mesma concentração em massa.⁶⁵ Considerou-se a hipótese de que as nanopartículas podem gerar espécies reativas de oxigênio por si mesmas, sem estar em contato com as células, e a medição dessa produção foi realizada usando um outro marcador mais sensível, por sua vez, a radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$).⁶⁵ Tal produção se deu apenas com a exposição à luz ambiente, sem especificação do comprimento de onda que mais a favorece, não havendo, além disso, relação clara entre essa forma de produção de espécies reativas em função da concentração de prata e a inibição observada para as bactérias.⁶⁵

Dos efeitos esperados para as espécies reativas de oxigênio produzidas e seus derivados - tal como o radical hidroperoxil ($\text{HOO}\cdot$) a partir da protonação do íon superóxido - destacam-se a peroxidação de lipídeos, com posterior degradação de ácidos graxos, e danos

ao DNA.⁶⁷ Tais efeitos resultam, por exemplo, no comprometimento da integridade da membrana celular e na capacidade de replicação e transcrição do material genético.⁶⁷ Não é possível afirmar, no entanto, que os danos observados até então na membrana celular e no DNA ao tratar diferentes espécies de bactérias com íons e/ou nanopartículas de Prata, podem ser exclusivamente atribuídos às espécies reativas geradas. Um forte argumento, porém, em favor da toxicidade dos íons de Prata e em detrimento da Prata reduzida (Ag^0) - cuja oxidação à Ag^+ é dependente de oxigênio e de H^+ , sendo, portanto, favorecida em meio ácido⁶⁸ -, decorre da ausência de atividade antimicrobiana de nanopartículas quando sintetizadas e incubadas com bactérias em condições estritamente anaeróbias.^{62;69} Os níveis de ATP intracelular observados mantiveram-se também inalterados em bactérias tratadas com nanopartículas nessas condições.⁶²

Sendo assim, Xiu e colaboradores inferem que as diferentes propriedades das nanopartículas de Prata como tamanho, forma, recobrimento, dentre outras, definem sua atividade antimicrobiana apenas por influenciarem a taxa de liberação de íons Ag^+ .⁶⁹ Observa-se, por exemplo, maior toxicidade para nanopartículas de menor tamanho^{47;65;70;69} em função de sua maior área de contato com o meio quando em mesma concentração em massa que nanopartículas maiores e, portanto, maior liberação de Ag^+ . Por isso, é necessário prezar pela estabilidade da dispersão a fim de manter elevada a área de contato das nanopartículas com o meio, e assim, seu efeito antimicrobiano^{58;48}, muito embora tenha-se observado que a eficiência de liberação de Ag^+ manteve-se em ca. 40% de seu valor inicial quando em alta concentração de sais (0.7 M), na qual o tamanho médio das AgNps estabilizadas com Citrato de Sódio passou de 2 a 220 nm em 24h, evidenciando um estado agregado.⁶⁸

2.2.2 Resistência à Prata

Micro-organismos resistentes à Prata são conhecidos há décadas e isolados de diversos ambientes, de alas para tratamento de queimados em hospitais a solos poluídos próximos à minas.⁷¹ Os mecanismos moleculares envolvem, além de um sistema de sinalização e resposta (SilRS) à presença de Prata iônica, proteínas ligantes desta espécie (SilE e SilF), e o transporte ativo de íons Ag^+ através da membrana celular (SilP e SilCBA), dependente de ATP e transporte conjunto de H^+ .⁷¹⁻⁷² Os genes para tais proteínas são carregados em um plasmídio, mas são descritas cepas de *Salmonella* e *E. coli* igualmente resistentes nas quais o DNA cromossômico carrega genes análogos aos das proteínas SilRS e do complexo SilCBA.⁷²

Em consonância com a hipótese da toxicidade exclusiva da Prata iônica, outro mecanismo de resistência envolve o acúmulo de Prata metálica e na forma de Ag_2S na região periplasmática, espaço entre as membranas interna e externa em bactérias gram-negativas, em cepas de *Pseudomonas stutzeri*.⁷³ As bactérias foram incubadas em uma concentração de 50 mM de AgNO_3 , valor 4 ordens de grandeza superior ao observado como tóxico para outras espécies⁴⁵, produzindo em seu interior nanopartículas de até 200 nm de diâmetro após 48h de incubação.⁷³ Os mecanismos que permitem a sobrevivência dos organismos nessas condições e a forma como são produzidas as nanopartículas são ainda desconhecidos.^{73;71}

Dado o crescente número de produtos contendo Prata (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2013)¹⁸, como ataduras e cateteres, a preocupação com a seleção de organismos resistentes à mesma é válida. Muito embora o número de casos reportados de resistência clínica à Prata seja relativamente baixo, é sugerido que a liberação de Ag^+ dos produtos que os contenham seja elevada e rápida a fim de evitar a seleção de cepas resistentes.⁷⁴ É necessário, porém, definir valores a partir dos quais uma espécie é considerada resistente à Prata, e ao considerar a enorme variedade de concentrações mínimas de inibição para uma mesma espécie reportados e a diversidade dos materiais nanoestruturados presentes nos produtos, a tarefa torna-se menos trivial.⁷⁴

2.2.3 Toxicidade da Prata

Embora comumente afirmado que nanopartículas de Prata possuem baixa toxicidade à células de humanos^{15;61}, diversos efeitos deletérios foram observados *in vitro* e *in vivo* ao submeter tecidos e organismos às nanopartículas. Alterações morfológicas, redução da síntese de ATP, produção de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA estão entre os efeitos descritos ao expor células saudáveis (fibroblastos de pulmão) e tumorais (glioblastoma) à dezenas de $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AgNps recobertas com amido.⁷⁵ Nanopartículas mostraram-se presentes no núcleo, mitocôndria e em endossomos próximos à membrana celular.⁷⁵ Considerou-se no entanto baixa a porcentagem de células (ca. 10% superior ao controle) em processo de apoptose/necrose, sendo as células induzidas a uma fase do ciclo celular (G_2) relacionada com um estado de reparo do DNA, cujos danos, presume-se, foram causados por stress oxidativo.⁷⁵ O fato da toxicidade ser maior para nanopartículas de menor tamanho⁷⁶ faz supor que os responsáveis por tal fato sejam íons Ag^+ .

A inalação de AgNps de aproximadamente 20 nm de diâmetro em ratos Sprague-Dawley por um período de 90 dias revelou que a exposição crônica à AgNps resulta em deposição de Prata no trato respiratório, resposta inflamatória nos pulmões e redução da capacidade pulmonar proporcional à concentração de exposição.⁷⁷ Após 28 dias de exposição, em concentrações iguais ou inferiores ao estudo previamente mencionado, nenhum efeito danoso foi observado.⁷⁸ Nesse caso, nanopartículas inaladas foram observadas também no fígado, bulbo olfatório e cérebro, porém em baixa concentração no sangue.⁷⁸ A administração oral de AgNps em ratos da mesma espécie levou a alterações na atividade da enzima fosfatase alcalina, nos níveis de colesterol e à presença de danos hepáticos leves, a depender da dose administrada.⁷⁹

Em humanos, o efeito mais conhecido à exposição crônica a diferentes formas de Prata é uma coloração azulada-acinzentada da pele denominada Argiria, de consequências principalmente estéticas. Essa condição está relacionada com depósitos de Prata e Enxofre/Selênio em regiões expostas à luz solar (subcutâneas).⁸⁰ Diferentes formas de Prata metálica (Ag^0) quando ingeridas dissolvem-se a Ag^+ preferencialmente em meio ácido presente no estômago⁶⁸, sendo levados à corrente sanguínea e combinados a compostos

orgânicos, em especial grupos tiol de proteínas.⁸⁰ Estes íons são reduzidos novamente quando expostos à radiação ultravioleta próximos à pele, podendo reagir por fim com Selênio, de baixa biodisponibilidade, porém maior afinidade pela Prata do que o Enxofre, gerando as partículas características de Prata, Enxofre e/ou Selênio.⁸⁰

Os autores extrapolam o mecanismo acima descrito para diferentes formas de Prata - iônica, em nanopartículas ou materiais que a contenham - e diferentes formas de exposição - ingestão, inalação ou através de feridas direto à corrente sanguínea -.⁸⁰ Dada a ínfima solubilidade dos compostos Ag_2S e Ag_2Se , considera-se a formação dessas espécies como formas de desintoxicação do organismo ao reduzir a disponibilidade de Prata iônica.⁸⁰ Estima-se que 25% da produção de Prata, em torno de 15 milhões de kilogramas anuais, tenham como destino ecossistemas terrestres e aquáticos, dos quais alguns organismos pertencentes são sensíveis a concentrações inferiores a $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Ag^+ (cerca de 50 nM).⁸¹ Com a demanda crescente por Prata em função do número cada vez maior de produtos contendo-a na sua forma nanoestruturada (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2013)¹⁸, é evidente a preocupação com o destino dessas espécies no meio ambiente. Sua elevada razão superfície-volume e variedade de forma e recobrimento desses materiais os tornam extremamente dinâmicos na natureza, dificultando prever como se comportam, quando indevidamente descartados, e criar normas regulatórias para seu uso.⁸²

2.3 Peptídeos Antimicrobianos

Mais de 2200 peptídeos antimicrobianos foram descritos até o momento, considerando sequências com menos de 100 aminoácidos (The Antimicrobial Peptide Database, 2013).⁸³ São produzidos tanto por bactérias⁸⁴ - chamados bacteriocinas - quanto por organismos multicelulares, como plantas e animais⁸⁵, nos quais, considera-se, desempenharam um papel fundamental para a evolução e permanência dessas formas de vida, dada a ubiquidade na produção dessas moléculas.⁸⁵ A atividade dos peptídeos é fortemente dependente da sequência de aminoácidos e a diversidade apresentada reflete adaptação ao ambiente microbiano local, diversidade de tamanho que dificulta sua

classificação, sendo em geral separados pelas características de sua estrutura secundária⁸⁵ em 4 classes.⁸⁶ Apresentam, em sua maioria, regiões hidrofóbicas e catiônicas hidrofílicas em certas porções da molécula quando em determinada conformação, denominados então anfipáticos, havendo porém, peptídeos antimicrobianos aniônicos em condições fisiológicas⁸⁷, e neutros (The Antimicrobial Peptide Database.2013)^{87;83}, descritos.

Os mecanismos de ação observados variam de acordo com o peptídeo utilizado, e envolvem principalmente interações com a membrana celular e efeitos no metabolismo, como inibição da respiração, da síntese de DNA e de proteínas.⁸⁷ Em sua interação com a membrana celular, formam-se inicialmente poros, levando à perda da força motriz de prótons e quaisquer outros gradientes eletroquímicos porventura existentes.⁸⁷ A perda da viabilidade de células foi observada anteriormente à presença de danos extensos à membrana celular, considerada última etapa da interação dos peptídeos, quando em elevada concentração, com esta estrutura.⁸⁷ Ao levar em conta a presença mais extensa de fosfolipídios ácidos carregados negativamente na membrana celular de bactérias em relação à de organismos multicelulares, e a de ácidos teicóicos igualmente negativos na parede celular de bactérias Gram-positivas, explica-se a interação preferencial de peptídeos catiônicos com organismos unicelulares em relação aos multicelulares, logo, sua maior toxicidade para com aqueles.^{85;87}

Esse argumento não se aplica, naturalmente, a peptídeos neutros e carregados negativamente, embora afirme-se sobre a interação eletrostática entre os últimos e estruturas carregadas positivamente na superfície das bactérias.⁸⁷ De fato, um dos mecanismos de resistência a peptídeos antimicrobianos envolve a redução de cargas negativas na superfície bacteriana, por exemplo, pela incorporação de grupos amina básicos na parede celular⁸⁷ ou pela redução na proporção de fosfolipídios ácidos na membrana, observado em algumas espécies.⁸⁵ Outras formas de resistência estão relacionadas ao enrijecimento da membrana celular externa, proteínas de transporte de peptídeos antimicrobianos⁸⁷ e secreção de proteases para sua degradação.^{85;87} Mecanismos de resistência envolvendo alterações químicas na membrana celular e expressão de proteases específicas para cada peptídeo são, porém, muito custosas⁸⁵, o que reflete o baixo sucesso histórico da emergência de organismos resistentes à esses peptídeos⁸⁵ e torna a seleção de cepas resistentes pouco provável, embora alguns argumentem ser isto inevitável.⁸⁶

Utilizar de peptídeos antimicrobianos no tratamento de infecções não é, porém, simples. Embora promissores em estudos *in vitro*, com concentrações mínimas de inibição da ordem de micromolar⁸⁵, sua atividade apreciável *in vivo* em animais se dá em doses elevadas, próximo ao seu limite de toxicidade.⁸⁵ Apesar do indiscriminado uso tópico, considerada uma exposição de menor risco, de alguns peptídeos⁸⁶, apenas um dentre diversos peptídeos catiônicos submetidos a testes clínicos foi eficaz até suas últimas etapas.⁸⁶ Peptídeos antimicrobianos foram administrados juntamente a antibióticos⁸⁵, e com nanopartículas de Prata⁴⁶, e em ambos estudos os autores concluíram efeito sinérgico, limitado a dois dos seis peptídeos empregados no segundo estudo, sem justificativa clara do porquê.⁴⁶

2.3.1 Dermaseptina 01

Dermaseptinas são uma família de peptídeos oriundos de secreções do epitélio de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*²¹, havendo atualmente 55 moléculas diferentes descritas (The Antimicrobial Peptide Database, 2013).⁸³ Dentre os 4 grandes grupos estruturais, são classificadas como peptídeos lineares em alfa-hélice⁸⁷ - sendo os demais: folhas Beta estabilizados por duas a quatro pontes dissulfeto, estruturas estendidas e peptídeos em volta com uma ponte dissulfeto-⁸⁶ Peptídeos dessa família contém em média 29 resíduos, e carga +3 em condições fisiológicas, pela presença de número variado de aminoácidos lisina em sua estrutura, a depender da molécula em questão (The Antimicrobial Peptide Database, 2013).^{88;83} Em virtude de variações em sua sequência e da composição de fosfolipídios da membrana celular de seus alvos, cada membro da família das Dermaseptinas exerce diferentes atividades contra um amplo espectro de micro-organismos, sejam vírus, fungos, leveduras, protozoários e bactérias Gram-positivas e negativas^{88-89;21}, tendo em geral concentrações mínimas de inibição de unidades a dezenas de micromolar.^{89;88;21} O argumento anterior, da diversidade de estruturas apresentadas, estende-se para sua toxicidade em relação à células de mamíferos.⁸⁸⁻⁸⁹

Para este trabalho será utilizado desta família o peptídeo antimicrobiano Dermaseptina 01 (DS 01) em estudos de interação com nanopartículas de Prata. Dotada de 29 resíduos (GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH₂) e carga +4 em condições fisiológicas pela presença de 4 aminoácidos Lisina(K), a DS 01 possui atividade demonstrada contra o enorme espectro microbiano descrito acima^{90;21}, e é considerada de baixa atividade hemolítica^{88;21}, não sendo notado efeitos deletérios em células e tecidos de ratos *Mus musculus* quando administrada de forma intravenosa em concentrações de 2.5-5 mg/kg de peso corporal dos animais.²¹ A DS 01 tem a característica de adotar uma estrutura em hélice na presença de membranas anfipáticas, tanto na superfície quanto no interior das mesmas,⁸⁸ e uma representação de sua estrutura pode ser vista na figura 3:

Figura 3: Distribuição de potenciais eletrostáticos na superfície da DS 01, vista por dois ângulos. A coloração azul representa potenciais positivos enquanto a vermelha potenciais negativos. Fonte: CASTIGLIONE-MORELLI *et al*⁸⁸

Seu mecanismo de ação, assim como de outros membros da família das Dermaseptinas, é o chamado "carpete", no qual há orientação prévia paralela à membrana com posterior agregação dos peptídeos a partir de uma concentração característica⁸⁸, exercendo uma ação semelhante a um detergente na mesma.⁸⁷ Observou-se, no entanto, a inibição da síntese de nucleotídeos e proteínas com perda da viabilidade de células de *E. coli* para concentrações mínimas de inibição de alguns membros da família das Dermaseptinas, sem qualquer dano observável à membrana plasmática.⁸⁷

Estudar a interação de nanopartículas de Prata com peptídeos antimicrobianos se mostra interessante sob diversos aspectos. Observado ao menos o efeito antimicrobiano aditivo para todos os peptídeos testados com nanopartículas de Prata⁴⁶, a funcionalização pode contornar problemas da estabilidade da solução nanopartículas⁹¹, retendo por mais tempo sua elevada área de contato com o meio, ao mesmo tempo em que pode proteger o peptídeo da ação de proteases, aumentando seu tempo de vida em circulação, logo sua biodisponibilidade.⁸⁶ Para tal sistema, é necessário avaliar extensivamente sua atividade e toxicidade dada a enorme gama de combinações possíveis para esses nanocompósitos.⁴⁶

Para facilitar a funcionalização, utilizaremos uma versão modificada da DS 01, contendo um resíduo de Cisteína em seu C-terminal (C-GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH₂), tal que o grupo tiol (-SH) deste aminoácido possibilite uma ligação covalente entre os átomos de Enxofre e Prata.⁹¹

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Para a síntese de nanopartículas de Prata foram utilizados os seguintes materiais: Nitrato de Prata (AgNO_3 - Sigma-Aldrich®), Citrato de Sódio dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Merck®) como estabilizante, e Borohidreto de Sódio (NaBH_4 - Sigma-Aldrich®) como agente redutor, e eventualmente estabilizante. Foi utilizada água MilliQ como solvente nas reações, de resistividade igual a 18.2 M Ω .cm.

Uma amostra de 20 mg do peptídeo DS 01 de sequência de aminoácidos CGLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH₂ foi enviada para nós pelo colaborador Dr. José R. S. A. Leite, sendo sintetizada em Sintetizador Automático de Peptídeos Pioneer (Applied Biosystems®), purificada por cromatografia líquida de fase reversa em coluna C₁₈ (HPLC system Class LC-10VP - Shimadzu®) e por fim liofilizada (Centrivap Concentrador - Labconco®).

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese de Nanopartículas de Prata e Funcionalização com a DS 01

A síntese de nanopartículas de Prata foi realizada com um procedimento modificado do utilizado por Jana *et al.*⁹² Duas soluções equimolares de 45 mL, uma de AgNO_3 (0.67 mM) e outra de Citrato de Sódio (0.67 mM) foram preparadas e misturadas por 1 hora em banho de gelo (ca. 4°C), sendo então adicionados 10 mL de uma solução de NaBH_4 (27 mM) recém preparada e resfriada por 30 minutos no mesmo banho. As concentrações finais dos reagentes tornaram-se então 0.3 mM, 0.3 mM e 2.7 mM, respectivamente. Observou-se

mudança imediata da coloração da solução de transparente para um amarelo claro após a adição de NaBH_4 , característico da presença de nanopartículas de Prata.⁹³ A reação prosseguiu em agitação magnética por mais 2 horas em banho de gelo, tempo no qual a cor amarelada se tornou mais intensa. A solução resultante foi armazenada à temperatura ambiente em frasco âmbar recoberto com papel alumínio. Considera-se a seguinte estequiometria para a reação (adaptada)⁹⁴:

A escolha do Borohidreto de Sódio, considerado forte agente redutor⁹⁵, e a baixa temperatura da reação tiveram como finalidade a obtenção de nanopartículas de tamanho reduzido, através da geração de muitos centros de nucleação e redução da aglomeração dos mesmos.⁹⁶ O Citrato de Sódio é uma opção interessante para a estabilização das nanopartículas, dado sua biocompatibilidade e a possibilidade de ser substituído por outro surfactante capaz, ao contrário do íon Citrato, de se ligar covalentemente à superfície metálica⁶³, em nosso caso, o peptídeo DS 01.

A fim de remover o excesso de sais e íons resultantes da síntese, as nanopartículas foram lavadas através de centrifugação (Microcentrifuga 5415R - Eppendorf®), sendo disposta a solução em vários *eppendorfs* de 1.5 mL, submetidos à 18.000g a 25° C por 2 horas. Descartados os sobrenadantes, todos os *pellets* resultantes, ainda contendo pouco da solução inicial, foram diluídos em 1 mL de solução de Citrato de Sódio 0.3 mM, pois sua dissolução em água deionizada levava, em poucos minutos, a uma visível agregação das nanopartículas. O fato de vários *pellets* serem diluídos em um pequeno volume de solução de Citrato de Sódio, tornava a concentração de nanopartículas de Prata nesta solução superior à concentração obtida na solução resultante da síntese, visível por sua coloração mais intensa em relação à última. Desta nova suspensão, as nanopartículas eram então diluídas em água deionizada à concentração desejada para os diferentes experimentos.

Soluções do peptídeo DS 01 foram preparadas em água deionizada a partir do estoque liofilizado, sendo misturadas às AgNps em *eppendorfs* à temperatura ambiente usando concentrações e tempos dependentes do experimento de interesse, dentre espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de fluorescência, Dicroísmo circular (CD) e Espalhamento dinâmico de luz (DLS). O emprego de uma solução salina como tampão é

necessário para evitar mudanças no pH e oferece condições próximas às fisiológicas para proteínas cuja atividade é fortemente dependente desses parâmetros na manutenção de sua estrutura terciária/quaternária.⁹⁷ A utilização de um peptídeo cuja estrutura secundária em solução não é, a princípio, relevante, exceto quando em contato com uma membrana anfipática, nos faz supor que sua atividade não é afetada caso diluído em água deionizada. Ademais, o excesso de sais influencia de maneira prejudicial a estabilidade das nanopartículas⁹¹. Sínteses diferenciadas em estabilizante para a FTIRS e em resultado para a espectroscopia de fluorescência após troca do sistema de purificação de água serão descritas nas seções adequadas.

3.2.2 Espectroscopia Ultravioleta-Visível

As medidas do espectro de absorção/espalhamento das amostras foram realizadas em um espectrofotômetro U-2900 (Hitachi®) de duplo feixe. As amostras eram dispostas em uma cubeta de quartzo de 1 centímetro de caminho óptico, e de cada intervalo de 1 nm de comprimento de onda de seus espectros, obtidos de 190-800 nm, eram subtraídos valores de absorbância da cubeta contendo água deionizada, como linha de base. Para valores de absorbância medidos, na região de interesse do espectro, fora do intervalo de confiança do equipamento ($Abs. > 2$), as amostras eram diluídas por um fator conhecido. A região do espectro eletromagnético que mais nos interessa está próxima à transição da visível para a ultravioleta, de comprimento de onda de aproximadamente 400 nm. Nessa região, a interação de nanopartículas de prata esféricas de poucos nanômetros de diâmetro com a radiação eletromagnética é bastante intensa e pode fornecer informações relevantes sobre a condição da dispersão coloidal.⁹⁸⁻⁹⁹

As primeiras soluções apresentadas para a interação da radiação eletromagnética (onda plana) com uma esfera condutora em um meio homogêneo foram apresentadas por Gustav Mie (1908) e posteriormente por Peter Debye (1909), usando eletromagnetismo clássico.¹⁰⁰ A interpretação da interação induzindo oscilações coletivas de elétrons, excitações denominadas *plasmons*¹⁰¹, veio a ser dada apenas 60 anos após a publicação

desses trabalhos.¹⁰² A solução proposta por Mie, embora para uma única partícula, pode ser estendida para um conjunto das mesmas tanto melhor quanto maior for a separação entre elas (soluções diluídas) em relação ao comprimento de onda da radiação incidente.¹⁰⁰ Nessa situação, a radiação absorvida/espalhada pelo conjunto pode ser tomada como a obtida por uma única partícula vezes o número de partículas no meio.^{100;103} Isso nos permite, por exemplo, obter uma relação unívoca entre a absorbância (ou extinção) medida para determinado comprimento de onda e a concentração de nanopartículas na amostra. Supondo o decaimento da intensidade da radiação em função da posição como proporcional à própria intensidade:

$$\frac{dI(l)}{dl} = -\alpha \cdot I(l) \quad (2)$$

da qual a partir de sua solução se define¹⁰³

$$Absorbância(\lambda) := \log_{10} (I/I_0) = \log_{10}(e^{-\alpha(\lambda) \cdot l}) \quad (3)$$

podemos supor, para partículas não interagentes (soluções suficientemente diluídas)

$$\alpha(\lambda) = \sigma_{extinção}(\lambda) \cdot \# \quad (4)$$

ou seja

$$Absorbância(\lambda) = \sigma'_{extinção}(\lambda) \cdot \# \cdot l \quad (5)$$

em que

$$\sigma'_{extinção} = \sigma_{extinção} / \ln 10 \quad (6)$$

nas quais I e I_0 representam a intensidade de radiação de comprimento de onda λ após percorrer o caminho óptico l pela amostra, α uma constante de proporcionalidade de decaimento (de dimensão $[\alpha] = 1/m$), $\sigma_{extinção}$ ($\sigma_{extinção} = \sigma_{espalhamento} + \sigma_{absorção}$) a seção de choque de extinção de uma única partícula (de dimensão $[\sigma_{extinção}] = m^2$), e $\#$ o número de nanopartículas por unidade de volume (sendo $[\#] = 1/m^3$). Nesse regime há então uma relação linear entre a absorbância medida e o número de nanopartículas por unidade de volume (logo a concentração) na amostra, relação que utilizaremos para estimar a concentração de nanopartículas em solução a partir de uma curva de calibração

previamente construída. Das soluções obtidas por Mie para os campos elétrico e magnético espalhados pela esfera condutora, deduziu-se a seção de choque de extinção da mesma como função de uma série dos coeficientes (B_l) da parte radial das soluções de tais campos, em que cada coeficiente é proporcional a determinada potência da razão entre o diâmetro da esfera e o comprimento de onda da radiação incidente.^{100;103} Obtém-se¹⁰⁰:

$$\sigma_{extinção}(\lambda, q) = \frac{\lambda^2}{2\pi} \text{Re} \sum_{l=1}^{\infty} (-i)^{l+1} \cdot l(l+1) \cdot [B_l^e(q) + B_l^m(q)] \quad (7)$$

no qual se define^{100;102}

$$q = 2\pi r / \lambda \quad (8)$$

sendo os índices e e m relativos a uma sobreposição de soluções para os campos elétrico e magnético, e r o raio da partícula. Para partículas de diâmetro muito inferior ao comprimento de onda incidente, situação denominada limite quase-estático ($q \ll 1$, módulo dos campos elétrico e magnético constantes ao longo da partícula), a contribuição de termos de ordem superior da razão r/λ para a seção de choque de extinção pode ser desconsiderada, e da somatória obtida para essa propriedade considera-se apenas parte dos primeiros termos $B_1^{e,m}$ (proporcionais a q^3), resultando em^{102;104}:

$$\sigma_{extinção}(\lambda) = \frac{18\pi \cdot \varepsilon_{meio}^{3/2} \cdot V}{\lambda} \cdot \frac{\varepsilon_2(\lambda)}{[\varepsilon_1(\lambda) + 2\varepsilon_{meio}]^2 + \varepsilon_2^2(\lambda)} \quad (9)$$

na qual V representa o volume da nanopartícula, ε_{meio} a função dielétrica do meio e ε_1 e ε_2 as partes real e imaginária da função dielétrica do material que compõe a esfera. Sendo a seção de choque de espalhamento proporcional ao quadrado dos coeficientes B_l , neste regime tal pode ser ignorada e a interação da radiação com a esfera ocorre praticamente por absorção ($\sigma_{extinção} \approx \sigma_{absorção}$).¹⁰² Igualmente despreza-se termos de ordem superior ($l=2,3,\dots$) para os campos elétricos e magnéticos, denominados quadrupolo, octopolo, etc, e a radiação espalhada pela esfera mostra-se idêntica a de um dipolo elétrico oscilante.^{100;102} Da relação obtida em (5), espera-se que a absorbância medida seja moldada pela seção de choque mostrada acima, dependendo, principalmente, da forma das partes real e imaginária da função dielétrica do material da nanopartícula. Considera-se haver ressonância para o valor máximo de $\sigma_{extinção}$ quando o denominador atinge o valor mínimo, no caso, para todo

$\varepsilon_1(\lambda) = -2\varepsilon_{meio}$, com ε_1 de variação considerável e ε_2 de baixo valor e relativamente constante na região.¹⁰² Do modelo de Drude-Sommerfeld para a resposta óptica em metais de elétrons livres é possível extrair aproximações para as partes real e imaginária da função dielétrica (respeitando o limite $\omega \gg \Gamma$):

$$\varepsilon_1 \approx 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad ; \quad \varepsilon_2 \approx 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^3} \Gamma \quad (10)$$

sendo ω_p a frequência de plasma de Drude do material e Γ a constante de amortecimento fenomenológica do material.¹⁰² A seção de choque de extinção assume assim a seguinte forma no entorno do máximo:

$$\sigma_{extinção}(\omega) \propto \frac{1}{\left[\omega - \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + 2\varepsilon_{meio}}} \right]^2 + \left(\frac{\Gamma}{2} \right)^2} \quad (11)$$

assumindo então, por (5), a absorbância a forma de uma Lorentziana nessa região quando a amostra propicia o limite quase-estático.¹⁰² Nessa aproximação mantém-se a condição de máximo $\varepsilon_1(\lambda) = -2\varepsilon_{meio}$.

3.2.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*)

Medidas de espalhamento dinâmico de luz foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern®) operando com um laser em 632.8 nm, a 25°C, escolhido o detector posicionado a 90° em relação ao feixe incidente e duração de aquisição da intensidade de luz espalhada em automático (ca. 10 segundos). Para cada amostra as medidas foram realizadas em triplicata, e a distribuição de tamanho final considerada a média das distribuições obtidas em cada uma das três medidas. Os parâmetros requisitados pelo programa para conversão de uma distribuição em porcentagem da intensidade de luz espalhada em função do diâmetro para porcentagem em número em função do diâmetro, o índice de refração do material e absorbância da amostra em ca. 632 nm foram fornecidos. O primeiro, tabelado, para a Prata ($n = 0.134$ - inferior a 1 por estar relacionado à velocidade

de fase¹⁰⁵) e o segundo medido para cada amostra em espectrofotômetro U-2900 (Hitachi®) como descrito na seção anterior.

A partir do aparente ruidoso sinal de intensidade de luz espalhada pela amostra em função do tempo, medido pela fotomultiplicadora como número de fótons incidentes na mesma por unidade de tempo, calcula-se a autocorrelação do sinal, comumente definida por¹⁰⁶⁻¹⁰⁷:

$$g^{(2)}(\tau) := \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\frac{1}{T} \int_0^T I(t) \cdot I(t+\tau) dt}{\left\{ \frac{1}{T} \int_0^T I(t) dt \right\}^2} \quad (12)$$

na qual $I(t)$ representa a intensidade medida em um tempo t e τ um intervalo de tempo arbitrário. A relação da autocorrelação da intensidade com a do campo elétrico incidente no detector $g^{(1)}(\tau)$ é dada por¹⁰⁷:

$$g^{(2)}(\tau) - 1 = \beta \left(g^{(1)}(\tau) \right)^2 \quad (13)$$

em que β é um fator a depender da geometria do experimento.¹⁰⁷ Espera-se que a autocorrelação (ou similaridade temporal, no caso) do sinal seja menor quanto maiores os valores de τ considerados, em que para $g^{(2)}(\tau)$ de um valor inicial $\langle I(t)^2 \rangle / \langle I(t) \rangle^2$ tenda a 1 no limite $\tau \rightarrow \infty$,¹⁰⁶ e que caia de maneira mais abrupta para partículas que se movam mais rapidamente em solução, no caso, partículas de menor diâmetro. Justifica-se essa última de um dos resultados da teoria do movimento browniano, a chamada equação de Stokes-Einstein, na qual o coeficiente de difusão de uma esfera em suspensão, proporcional ao seu deslocamento quadrático médio em função do tempo, é inversamente proporcional ao seu raio¹⁰⁶:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (14)$$

sendo k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura, η a viscosidade do meio e r o raio da partícula. Se o movimento das partículas dita o comportamento da função autocorrelação, espera-se ser possível extrair informações acerca da distribuição de tamanho das partículas na amostra a partir da análise da intensidade de luz espalhada pela mesma. De fato, é possível modelar a autocorrelação do campo elétrico $g^{(1)}(\tau)$ como uma soma de

exponenciais em função dos coeficientes de difusão (considerando uma amostra polidispersa)¹⁰⁶, ou de forma contínua¹⁰⁷:

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \cdot e^{-\Gamma \cdot \tau} d\Gamma \quad (15)$$

sendo $\Gamma = K^2 D$ e K o módulo do vetor de onda de espalhamento $\vec{K} := \vec{K}_i - \vec{K}_f$ (definido como a diferença entre os vetores de onda incidente e espalhado), cujo valor para um espalhamento quase elástico é $K \approx 4\pi n \cdot \sin(\theta/2)/\lambda_0$ (em que n o índice de refração do meio, θ o ângulo de espalhamento e λ_0 o comprimento de onda da radiação no vácuo)¹⁰⁶ tal que $G(\Gamma)$ é normalizada¹⁰⁷:

$$\int_0^{\infty} G(\Gamma) d\Gamma = 1 \quad (16)$$

Koppel¹⁰⁸ demonstrou ser possível estimar propriedades da distribuição $G(\Gamma)$ ao expandir $\ln g^{(1)}(\tau)$ em uma série de potências de τ , da qual os coeficientes (correspondentes aos cumulantes geradores da distribuição) fornecem informações que permitem construir uma distribuição em porcentagem da intensidade de luz espalhada em função dos coeficientes de difusão, logo, dos diâmetros das partículas que constituem a amostra¹⁰⁶:

$$\ln g^{(1)}(\tau) = 1 - K_1 \tau + \frac{K_2 \tau^2}{2!} + \frac{K_3 \tau^3}{3!} + (\dots) \quad (17)$$

da qual obtém-se a média da distribuição K_1 , sua variância K_2 e assimetria K_3 (simétrica para K_3 nulo, caracterizando uma Gaussiana) :

$$K_1 = \langle \Gamma \rangle; \quad K_2 = \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2 \rangle; \quad K_3 = \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^3 \rangle \quad (18)$$

3.2.4 Potencial Zeta (ζ)

Medidas de potencial Zeta foram igualmente realizadas em equipamento Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern®), dispondo 750 μL de cada amostra em célula descartável de

polycarbonato dotada de contatos metálicos banhados a ouro, específica para tal análise. Os parâmetros necessários para cada amostra, o índice de refração e absorbância, foram tomados como os da Prata descritos na seção anterior. A aplicação de um campo elétrico, ou equivalentemente de uma diferença de potencial, resulta em um movimento induzido das partículas dotadas de carga em uma solução. Dada a força de atrito dependente da viscosidade do meio, as partículas irão adquirir uma velocidade constante a partir do repouso a depender do valor do campo elétrico presente. Da razão da distribuição destas velocidades finais pelo campo elétrico aplicado, denominada mobilidade eletroforética ($\vec{u} := \vec{v}/\vec{E}$), obtém-se a distribuição do potencial Zeta da amostra, pela relação:

$$\zeta = \frac{3\eta|\vec{u}|}{2\varepsilon_r\varepsilon_0} \quad (19)$$

na qual η é a viscosidade do meio, ε_r a permissividade relativa do meio e ε_0 a permissividade do vácuo.¹⁰⁹ O potencial Zeta é uma medida indireta da carga da superfície de uma partícula, sendo proporcional a esta, e portanto, quanto maior o valor do potencial Zeta em módulo, maior a repulsão entre partículas equivalentes, e mais estável a dispersão coloidal.¹⁰⁹

3.2.5 Estimativa da concentração de nanopartículas em solução

Uma estimativa necessária, apesar de obtida de maneira bastante simplista, é a da concentração de nanopartículas presentes em uma solução. Usaremos desta estimativa na construção das curvas de calibração entre a absorbância medida para uma amostra e a concentração de coloides na mesma. Para tanto, supomos uma distribuição monodispersa e que todos os íons de Prata foram reduzidos à Prata metálica - aspecto favorecido pelo excesso de agente redutor adicionado -. De maneira sucinta, dividimos o número total de átomos adicionados pelo de átomos por nanopartículas, o que nos dá o número total de nanopartículas em solução, bastando dividir pelo volume da solução para obter sua concentração.¹¹⁰ Para calcular, aproximadamente, o número de átomos por nanopartículas consideramos a Prata em seu arranjo mais comum para corpo extenso, em uma estrutura cúbica de face centrada (FCC)¹¹¹, em que cada célula unitária, de parâmetro de rede

$a = 4.09\text{\AA}$, contém 4 átomos de Prata. Considerando uma nanopartícula de raio r ; o número de átomos de Prata por nanopartícula ($\#Ag_{np}$) será então:

$$\#Ag_{np} = 4 \cdot \frac{\text{Volume da nanopartícula}}{\text{Volume célula unitária}} = 4 \cdot \frac{4\pi r^3/3}{(a)^3} \quad (20)$$

e o número total de nanopartículas (N):

$$N = \frac{\text{Total de átomos de Ag}}{\#Ag_{np}} \quad (21)$$

É possível estimar o número de átomos de Prata por nanopartícula ao usar a densidade da Prata¹¹² $\rho_{Ag} = 10,5 \text{ g/cm}^3$, o que pode ser demonstrado equivalente à abordagem acima, pois, para o parâmetro de rede adotado obtemos a densidade:

$$\rho_{FCC} = \frac{4}{(a)^3} \cdot \text{Massa molar Ag} = \frac{4}{(a)^3} \cdot \left(\frac{107,9 \text{ gramas}}{6,02 \cdot 10^{23} \text{ átomos}} \right) \cong 10,48 \text{ gramas/cm}^3 \quad (22)$$

3.2.6 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIRS - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

As medidas de absorção em parte do espectro infravermelho, na faixa de 400 - 4.000 cm^{-1} (correspondente aos comprimentos de onda de 25 - 2,5 μm), foram realizadas em equipamento iS50 (Nicolet®) pertencente ao Grupo de Biotecnologia Molecular - IFSC/USP. Como requerido pelo modelo do equipamento, Nitrogênio líquido, obtido junto à seção de Criogenia do Instituto de Física de São Carlos, foi utilizado para resfriamento do detector, sendo despejado 30 minutos antes das medições, tempo necessário para atingir equilíbrio térmico. A resolução entre os pontos do espectro foi escolhida em 4 cm^{-1} , e para cada amostra foram realizadas 100 medidas a fim de minimizar o ruído no espectro resultante. As amostras foram preparadas em pastilhas de Silício ou em bloco de Brometo de Potássio (KBr), substratos comuns para a análise¹¹³, cujos respectivos espectros de absorção foram tomados como brancos. A preparação de amostras em Silício foi realizada ao gotejar repetidamente volumes de ca. 2 μL de soluções de interesse concentradas - em geral *pellets* resultantes de centrifugação - em determinada pastilha, secando-as após cada gotejamento

por aproximadamente 5 minutos em um dessecador contendo Sílica acoplado a uma bomba de vácuo. A utilização de pequenos volumes tinha como finalidade concentrar a amostra em uma pequena área da pastilha, garantindo que tal fosse inferior à área do buraco do suporte disponível para as pastilhas pela qual a radiação infravermelha era transmitida. A análise em bloco de KBr foi realizada apenas para a amostra pura da Dermaseptina DS 01, em que ca. 1 mg da proteína liofilizada foi misturada ao pó de cristais de Brometo de Potássio (Merck®) recém moídos manualmente, e prensada em prensa hidráulica em molde cilíndrico para formar um bloco único, disposto então em suporte para a análise semelhante ao usado nas pastilhas de Silício.

A espectroscopia no infravermelho permite obter informações sobre a presença de grupos químicos e determinadas ligações presentes na amostra, cujas transições de estados de vibração e rotação ocorrem nesta faixa do espectro. Cada grupo, forma de rotação/vibração possui transições características, o que permite sua identificação no espectro. O equipamento é dotado de um espelho móvel que permite selecionar os comprimentos de onda que irão incidir na amostra, através de interferência destrutiva, a depender de sua posição. Gera-se assim um conjunto de pontos relacionando a intensidade da radiação no detector em função da posição do espelho, denominado interferograma, do qual, a transformada de Fourier permite extrair o quanto a amostra absorve/transmite em função do comprimento de onda da radiação.

3.2.7 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD - *Circular Dichroism*)

Medidas de Dicroísmo Circular foram realizadas em espectropolarímetro J-720 (Jasco®) em cubetas de Quartzo (Hellma®) de 400 µL e 1 mm de caminho óptico, equipamentos pertencentes ao Grupo de Biofísica Molecular - IFSC/USP. A absorção de radiação circularmente polarizada à direita e à esquerda no intervalo de 250 nm - 185 nm foi obtida, com resolução de 0,2 nm, sendo o processo repetido por 32 vezes para cada amostra no intuito de reduzir o ruído associado. Água deionizada foi utilizada como branco em todas as medições. Estruturas secundárias de proteínas exibem elevada absorção preferencial

nesta faixa do espectro, a depender de qual polarização circular incide sobre a amostra. É possível a partir do espectro obtido para a amostra, estimar a contribuição, em porcentagem, correspondente aos espectros padrão para estruturas secundárias características - α -hélice, folha- β , estruturas desordenadas e estruturas em volta - que apresentam atividade óptica nessa região¹¹⁴. Utilizamos o programa CDPro para obter essas estimativas, as quais podem nos fornecer alterações nas contribuições da estrutura secundária da Dermaseptina 01, utilizadas em concentração de 10 μ M, na presença de ca. 3 nM de AgNPs.

3.2.8 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC - *Isothermal Titration Calorimetry*)

Medidas do calor de interação da Dermaseptina 01 com AgNps foram realizadas em equipamento VP-ITC (Microcal®) pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular - IFSC/USP. Volumes de 5 μ L de uma solução da DS 01 (20 μ M) foram injetados em 1,47 mL uma solução de nanopartículas de Prata - de concentração estimada em 3 nM por espectroscopia no UV-Vis - em agitação, até observar-se a estabilização do calor medido durante cada titulação. Para a medida do calor de diluição, o correspondente ao branco desta técnica, a mesma solução do peptídeo foi diluída em água deionizada. Do resultado desta técnica é possível descrever, ao menos qualitativamente, se a interação dos elementos acima é endotérmica ou exotérmica ($\Delta H < 0$), e neste último caso, favorável do ponto de vista de redução da energia interna (potencial) do sistema. Na condição de concordância do calor medido na interação dos componentes quando estabilizada (sítios de ligação às nanopartículas saturados) com o calor de diluição do peptídeo titulado na ausência das nanopartículas, é possível obter parâmetros tais como a estequiometria da reação, variação da entropia do sistema, variação da energia livre de Gibbs, dentre outros.

3.2.9 Ensaios Antimicrobianos

Ensaios Antimicrobianos foram realizados em placas de 96 poços de 200 µL, previamente esterilizadas em radiação UV, e o crescimento dos micro-organismos observado após 24h através da leitura da absorbância em 625 nm em equipamento Spectramax M3 (Molecular Devices®). Aproximadamente 5×10^5 unidades formadoras de colônia de *E. coli* (cepa DH5-α), fornecidas pelo Grupo de Biofísica Molecular - IFSC/USP, foram inoculadas em meio Luria-Bertani L3022 (Sigma-Aldrich®) nos poços contendo diluições seriadas, a partir de uma concentração conhecida, de compostos cuja atividade antimicrobiana estava a ser avaliada. Alíquotas de 20 µL dos agentes antimicrobianos foram misturados a 180 µL do meio na primeira linha de poços da placa, soluções das quais retirou-se 95 µL, sendo estes misturados a 95 µL de meio LB contidos na linha seguinte. Após homogeneização desta nova mistura, 95 µL foram retirados da mesma e adicionados a idêntico volume de meio presente na linha subsequente. O processo foi repetido até a última linha da placa, gerando a diluição seriada dos compostos de interesse. 5 µL de uma solução contendo 1×10^7 UFC/mL de *E. coli* foram então adicionadas ao controle positivo e aos poços contendo os agentes antimicrobianos a partir da segunda linha.

Dentre os compostos a serem avaliados constavam a Dermaseptina 01, AgNps (segundo *pellet* - para reduzir a influência de sais oriundos da reação), amostras duplamente centrifugadas e suspensas em água deionizada de AgNps + DS 01 (segundo *pellet* - a fim de reduzir a influência do peptídeo livre), e os antibióticos Ampicilina e Cloramfenicol. Controles negativos (meio na ausência de micro-organismos) e positivos (ausência de compostos antimicrobianos) foram realizados. Para cada composto a análise foi realizada em duplicata. Após a inoculação, a placa foi deixada em repouso em estufa a 37°C para crescimento das bactérias. Dado o pequeno volume das culturas, considerou-se suficiente a oxigenação do meio durante o período de crescimento sem a necessidade de agitação. Considerou-se¹¹⁵ a concentração mínima de inibição (MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*) da amostra aquela na qual não foi observado aumento significativo da média das absorbâncias após 24h de inoculação em relação ao respectivo negativo, ou seja, em relação à mistura da amostra com o meio de cultura após o mesmo período.

3.2.10 Ensaios de Citotoxicidade - Citometria de Fluxo

Para avaliar de forma preliminar a toxicidade das AgNps, da DS 01 e do *pellet* da mistura 3 nM AgNps + 10 μ M DS 01, tais amostras foram diluídas 50 vezes - a fim de minimizar as alterações do meio de cultura - em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) a concentrações finais 1 nM, 5 μ M e 1 nM + 0,2 μ M, respectivamente, e incubadas por 24 horas (em estufa a 37°C e atmosfera 5% de CO₂) com células do tipo fibroblasto saudável de fígado - FCH3 - em placa de 24 poços. A manipulação do material e das células foi realizada em capela de fluxo laminar. Células não aderentes foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante aspirado e o *pellet* formado suspenso em meio de cultura fresco, sendo este usado posteriormente para análise de morte celular programada (apoptose) e necrose através de Citometria de fluxo.

As células foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e cada *pellet* suspenso em tampão ligação (10 mM de HEPES pH 7,4; 150 mM de Cloreto de Sódio; 5 mM de Cloreto de Potássio, 1 mM de Cloreto de Magnésio e 1,8 mM de Cloreto de Cálcio), processo este realizado duas vezes. Da solução resultante, 100 μ L foram misturados a 5 μ L do corante Anexina V-FITC (marcador de apoptose), deixado em repouso por 20 minutos ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, sendo após adicionados 400 μ L de tampão ligação e 5 μ L do corante Iodeto de Propídio (PI - marcador de necrose). Medidas de Citometria de Fluxo foram realizadas em equipamento FACSCalibur (BD®), em que para cada amostra recolheu-se 10.000 eventos.

3.2.11 Espectroscopia de Fluorescência

Medidas do espectro de fluorescência das amostras foram realizadas a temperatura ambiente (ca. 25°C) em um leitor de placa Spectramax M3 (Molecular Devices®), dispondo 500 μ L de cada amostra em cubeta de Quartzo de 4 lados polidos (Hellma®, pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular - IFSC/USP) de forma que a medição da radiação emitida ocorresse perpendicularmente à luz incidente. Ao concentrar as AgNps em *pellets*,

procedeu-se a diluição de todos (cerca de 8) em 900 μL de solução Citrato de Sódio 0,3 mM, a fim de obter elevada concentração dos coloides. Realizou-se então diferentes diluições da mesma, em volumes finais de 250 μL , sendo a cada uma delas adicionados outros 250 μL de uma solução 1 μM de DS 01. Duas horas após a mistura, cada amostra foi excitada em comprimento de onda de 280 nm e sua emissão medida em 350 nm, retirando-se dos valores medidos o correspondente obtido com uma solução de igual concentração de AgNps na ausência da DS 01. Os comprimentos de onda foram assim escolhidos por corresponderem, aproximadamente, aos máximos de excitação e emissão do Triptofano¹¹⁶, único aminoácido fluorescente nesta região do espectro presente na Dermaseptina 01. Ao variar a concentração de AgNps para uma dada concentração do peptídeo (em concentração final igual a 0.5 μM), podemos estudar se aquelas agem como supressores da fluorescência do Triptofano presentes em tais peptídeos. Pode-se adequar os resultados de emissão a modelos de supressão, como exemplo, o modelo de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K \cdot [\text{AgNps}] \quad (23)$$

sendo F_0 a fluorescência da espécie na ausência do supressor, F a fluorescência em dada concentração do supressor, K a constante de Stern-Volmer e $[\text{AgNps}]$ a concentração de nanopartículas de Prata. O modelo contempla, a depender do valor obtido para K_{SV} e do tempo de vida médio do fluoróforo no estado excitado, supressões dinâmicas - colisões aleatórias em solução - e estáticas, esta na qual há ligação entre o fluoróforo e o supressor, e que pode-se usar como indicativo da ligação da Dermaseptina 01 à nanopartículas de Prata.

4 Resultados e discussão

4.1 Síntese de AgNps

O espectro de extinção obtido da solução resultante logo após a síntese de nanopartículas de Prata pode ser observado na Figura 4(a) - a notação absorbância, definição do que se mede, equivale ao processo de extinção (absorção + espalhamento) -. Devido à elevada seção de choque de extinção de cada nanopartícula de Prata - estrutura considerada a mais eficiente conhecida para a interação da radiação com a matéria, cuja seção de choque de interação com a luz pode ser 10 vezes superior à seção de choque geométrica¹¹⁷ - e concentração de nanopartículas produzidas, a medição do espectro diretamente com a solução resultante em cubeta de 1 cm de caminho óptico resultava em valores de absorbância superiores a 2 em região de interesse, na qual se encontra a banda plasmônica das nanopartículas. Isso corresponde, dada a escala logarítmica utilizada, a uma transmitância de menos de 1% da radiação incidente na amostra ($Transmitância := I/I_0 = 10^{-Absorbância}$), insuficiente para o detector e para qual o fabricante não fornece erro associado confiável para a medida. Para obter o espectro diluímos a amostra em 10 vezes.

Figura 4 - (a) Espectro da solução resultante da síntese de AgNPs, diluída 10 vezes. (b) Ajuste Lorentziano a um intervalo de ± 80 nm a partir do máximo (ca. 393 nm)

O espectro apresenta uma ressonância bastante distinta próxima ao comprimento de onda de 400 nm, e um ombro para comprimentos de onda inferior a 320 nm (3.9 eV),

correspondente à transição de elétrons entre as bandas de valência ($4d$) e condução da Prata($5sp$).¹⁰² Para o limite quase estático, em que o diâmetro da partícula é inferior a 2% do comprimento de onda da radiação incidente¹⁰² - cerca de 8 nm para essa ressonância, embora alguns autores o estendam até 20 nm⁹⁹ -, e dada as aproximações para as partes real e imaginária da função dielétrica para metais de elétrons livres, a ressonância assume a forma de uma Lorentziana, como por (11). O ajuste de um intervalo de ± 80 nm considerados a partir do máximo de extinção (ca. 393 nm) resulta em um coeficiente de determinação (R^2) de 0,998, para um máximo possível de 1, o que reflete uma excelente adequação do conjunto de pontos obtidos à curva proposta, e sugere que as nanopartículas sintetizadas encontram-se na faixa de tamanho cuja resposta óptica é descrita pelo limite quase estático.

A distribuição de tamanhos obtida por DLS para a síntese é mostrada na Figura 5, a qual é melhor descrita por um ajuste do tipo Log-Normal ($R^2 = 0,98$) em relação a um ajuste Gaussiano ($R^2 = 0,93$), resultado de um 3º cumulante (K_3) não nulo.¹⁰⁶

Figura 5 - Ajustes Log-Normal (a) e Gaussiano (b) para a distribuição de tamanho em número de partículas obtida por DLS.

Uma distribuição Log-Normal (a qual é uma distribuição Gaussiana do logaritmo da variável) caracteriza-se por uma assimetria em relação ao seu máximo, ao contrário de uma distribuição normal, ou Gaussiana. Observa-se, nesse caso, uma preferência das nanopartículas em assumir tamanhos maiores em relação ao valor médio. Há descrições na literatura do viés existente para distribuições da forma Log-Normal, em especial para nanopartículas de diâmetro inferior a 20 nm.¹¹⁸

4.2 Funcionalização das AgNps com a DS 01

Como descrito na introdução deste trabalho, considerando o fato das atividades mínimas de inibição das nanopartículas de Prata e da Dermaseptina 01 para uma ampla gama de micro-organismos estarem na faixa de unidades de nanomolar e micromolar, respectivamente, buscamos caracterizar a interação de ambas os compostos em mesma ordem de grandeza destas concentrações. Escolhida uma concentração de 3 nM para as AgNps, variamos a concentração da DS 01 nos seguintes valores: 1, 2, 5, 10 e 20 μM , observando como se alteravam aspectos tais quais a banda plasmônica e a distribuição de tamanho dos coloides em função do tempo. Os valores acima enunciados referem-se ao valores finais das misturas, de volume total igual a 1.5 mL, nas quais misturamos 1 mL de AgNps (4.5 nM) e 500 μL de uma solução aquosa da DS 01 (3, 6, 15, 30 e 60 μM , respectivamente). A seguir descrevemos como obtivemos as concentrações de ambos os compostos a partir da síntese realizada e do estoque liofilizado.

4.2.1 Curvas de calibração para AgNPs e soluções estoque da DS 01

Ao realizar a síntese utilizando uma concentração de 0.3 mM de íons de Prata (0.3 mM de AgNO_3), o número total de átomos de Prata, para um volume de 100 mL será:

$$\#Ag_{Total} = 0,3 \frac{mmol}{L} \cdot 0,1L \cdot 6,02 \cdot 10^{23} \frac{\text{átomos}}{mol} = 1,806 \cdot 10^{19} \text{ átomos} \quad (24)$$

Para obter o número de átomos de Prata por nanopartícula utilizando a equação (20), foi necessário atribuir um valor para o raio das mesmas. Em nossa aproximação simplista utilizamos o valor de 5 nanômetros, próximo ao máximo obtido na distribuição de tamanhos obtida com a técnica de DLS (média da distribuição igual a 10,1 nm). É necessário frisar que a técnica é dependente do movimento das partículas no meio, logo, de seu raio hidrodinâmico, daquilo que se movimenta como um único ente (nanopartícula metálica +

recobrimento íons Citrato + contra-íons adsorvidos), refletindo em um menor diâmetro real somente para o núcleo metálico, diferença desprezada por nós nessa aproximação.

Sendo assim:

$$\#Ag_{np} = 4 \cdot \frac{4\pi \cdot (5 \text{ nm})^3/3}{(0.409 \text{ nm})^3} \cong 30.612 \frac{\text{átomos}}{\text{nanopartícula}} \quad (25)$$

resultando em uma concentração final de AgNps, considerando a redução de todos os íons de Prata presentes na solução, por (21):

$$\begin{aligned} [AgNPs] &= \frac{N}{0,1L} = \frac{1,806 \cdot 10^{19}/30.612}{0,1L} \cong 5,9 \cdot 10^{15} \frac{\text{nanopartículas}}{L} \\ &= \frac{5,9 \cdot 10^{15} \text{nanopartículas}/L}{6,02 \cdot 10^{23} \text{nanopartículas}/\text{mol}} \cong 9.8 \frac{\text{nmol}}{L} \end{aligned} \quad (26)$$

De posse da estimativa da concentração de nanopartículas na solução resultante da síntese, realizamos diluições conhecidas da mesma, medindo então sua absorbância. Espera-se, segundo a argumentação oferecida na seção 3.2.2, que a absorbância seja linearmente proporcional à concentração de nanopartículas no meio, para soluções suficientemente diluídas, como obtido em (5). Os espectros da série de diluições, e o ajuste linear dos máximos de extinção de cada curva, são mostrados na figura 6.

Figura 6 - Espectros das diluições (a) e ajuste linear dos máximos de cada curva (b) em função da concentração para a síntese de AgNps de 10 nm de diâmetro.

Obtivemos a seguinte relação linear entre a absorbância e a concentração da amostra (em nanomolar):

$$\text{Absorbância } (c) = 0,362 \left(\frac{\text{nmol}}{\text{L}} \right)^{-1} \cdot c ; R^2 = 0,999 \quad (27)$$

notando que

$$c = \frac{\#}{N_A} \cdot 10^{-3} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) ; N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{mol}^{-1} \quad (28)$$

A relação (27) foi utilizada para estimar a concentração de AgNps a partir da absorbância medida em quaisquer outras soluções preparadas com essas nanopartículas. A exemplo, citamos a solução obtida com a centrifugação e suspensão dos *pellets* resultantes da síntese em uma solução de Citrato de Sódio 0.3 mM. Dada a elevada concentração de nanopartículas em virtude da suspensão de vários *pellets* (cerca de 8, cada um contendo ainda ca. 20 µL da solução prévia) em 900 µL da solução de Citrato, mediu-se a absorbância da diluição desta solução por um fator de dez vezes, de modo que o valor medido para o máximo de extinção em 394 nm se encontrasse dentro dos limites da relação linear acima obtida (inferior a 1, no caso). Por fim, conhecida a concentração da suspensão dos *pellets*, realizou-se a posterior diluição em água deionizada para a concentração de interesse, no caso da conjugação, para a concentração de 4.5 nM.

Para a Dermaseptina 01, duas soluções estoque foram preparadas, de concentrações 0.1 mg.mL⁻¹ (34.5 µM) e 1 mg.mL⁻¹ (345 µM), em que 1 mg (± 0,1 mg) do peptídeo liofilizado foi pesado e diluído em água deionizada, utilizando um balão volumétrico de 10 mL para o primeiro caso, ou em *ependorf*, com o auxílio de micropipeta, no segundo. As soluções foram estocadas em *ependorfs* em freezer convencional, sendo retiradas somente quando utilizadas. A fim de melhor estimar a concentração, mediu-se o espectro de alíquotas das soluções (diluída para a solução mais concentrada), e sua absorbância em 280 nm, devido, nesse caso, ao resíduo Triptofano, pode ser relacionada à concentração do peptídeo por uma relação linear semelhante à equação (5), se utilizadas soluções suficientemente diluídas. O coeficiente de extinção molar, para um único resíduo, é dado por¹¹⁹ $\varepsilon(280 \text{ nm}) = 5.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, de forma que a relação entre a absorbância e a concentração torna-se:

$$\text{Absorbância (280 nm)} = 5.500 \cdot c \cdot l \quad (29)$$

sendo c a concentração molar do peptídeo, e l o caminho óptico igual a 1 cm.

4.2.2 Funcionalização - Espectroscopia UV-Vis

Os espectros das nanopartículas de Prata na presença de diferentes concentrações do peptídeo DS 01 são mostrados na Figura 7, exibidos de 300 nm a 550 nm, para os tempos de mistura de 10 minutos (a), 24 horas (b) e 120 horas (c) após a mistura. A evolução dos máximos de extinção exibidos por cada amostra após 10 minutos da mistura é retratada na figura 7(d).

Figura 7 - Espectros de extinção 10 minutos após a mistura (a), 24 horas (b) e 120 horas (c) de 3 nM de AgNps com diferentes concentrações de DS 01. (d) Evolução temporal do máximo de extinção para as amostras.

É possível observar na Figura 7(a) uma nítida alteração da banda plasmônica das nanopartículas para todas as concentrações de DS 01 adicionadas, sendo maior para a adição de 1 μM e menor para as concentrações de 2 e 5 μM . Além do decréscimo no valor do máximo de absorbância, há um deslocamento deste para maiores comprimentos de onda. De fato, mesmo a medição sendo realizada 10 minutos após a mistura, a adição de qualquer destas concentrações às nanopartículas de Prata provocavam uma visível e imediata mudança de coloração da solução. Para tempos maiores (figuras 7b, 7c), observa-se um decréscimo mais significativo do espectro de extinção para as menores concentrações de DS 01 adicionadas, inclusive para as que mostraram uma menor alteração a princípio, as de 2 e 5 μM . Essa tendência é observada mais claramente na figura 7(d), e considerando a relação linear existente entre a absorbância medida e a concentração de nanopartículas em solução (5), há necessariamente um decréscimo na quantidade de partículas que exibem tal banda plasmônica característica. O gráfico dos coeficientes de determinação dos ajustes Lorentzianos após 10 minutos da mistura, utilizando intervalos de ± 80 nm relativos aos máximos de extinção para cada um dos espectros obtidos, é mostrado na figura 8.

Figura 8 - Coeficiente de determinação (R^2) do ajuste Lorentziano para os espectros obtidos após 10 minutos da mistura.

O valor mais próximo de 1 de R^2 para maiores concentrações finais de DS 01 mostra que, para tais soluções, há uma maior quantidade de nanopartículas na amostra cuja resposta óptica equivale à condição de nanopartículas esféricas no limite quase estático, como discutido na seção 3.2.2. Como a solução na ausência da DS 01 exibe tais características, presume-se que para maiores concentrações de Dermaseptina 01 adicionadas, mais semelhantes permanecem as nanopartículas às do controle. Da posição da

ressonância, correspondente ao valor máximo da seção de choque de extinção, dada pela condição¹⁰² $\varepsilon_1(\lambda) = -2\varepsilon_{meio}$, podemos estimar o valor da função dielétrica do meio que circunda as nanopartículas. Na ausência da DS 01 o máximo é exibido em ca. 394 nm, comprimento de onda no qual a parte real (n) e imaginária (k) do índice de refração da Prata assumem os valores¹⁰⁵ (Refractive Index Database, 2013)¹²⁰:

$$n_{Ag} = 0,182 \text{ e } k_{Ag} = 1,88; \bar{n} = n + ik \quad (30)$$

sendo i a unidade imaginária e $\bar{n}$ o índice de refração complexo do material. Considerando a relação entre a função dielétrica e a permeabilidade magnética de um material e seu índice de refração¹⁰⁰:

$$\bar{n}^2 = \frac{\varepsilon \cdot \mu}{\varepsilon_0 \cdot \mu_0} \quad (31)$$

resulta, ao considerar a permeabilidade magnética relativa do meio igual a unidade¹⁰⁵:

$$\frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} = \varepsilon_r = \varepsilon_1 + i\varepsilon_2 = \bar{n}^2 = (n^2 - k^2) + i2nk \quad (32)$$

relação da qual obtém-se a parte real da função dielétrica da Prata em 394 nm:

$$\varepsilon_{1Ag}(394) = (n_{Ag}^2 - k_{Ag}^2) = (0,182^2 - 1,88^2) = -3,5 \quad (33)$$

temos, enfim, para a ressonância:

$$\varepsilon_{meio} = \frac{-\varepsilon_{1Ag}}{2} = 1,75 \quad (34)$$

do qual retiramos o índice de refração do meio por (32):

$$\sqrt{\varepsilon_{meio}} = n_{meio} = 1,32 \quad (35)$$

pois para um meio opticamente transparente, no qual a atenuação da radiação eletromagnética é desprezível¹⁰⁵:

$$k \cong 0 \therefore 2nk = \varepsilon_2 \cong 0 \therefore \varepsilon_{meio} \cong \varepsilon_1 \quad (36)$$

De fato, o valor obtido em (35) é bastante semelhante ao valor tabelado (Refractive Index Database, 2013)^{120;102} para a parte real do índice de refração da água $n = 1,339$, para

a qual a parte complexa assume o valor $k = 2,25 \cdot 10^{-9}$, sendo desprezível como consideramos. Realizando o mesmo procedimento para a amostra na qual adicionamos 20 μM de DS 01, cujo espectro de extinção foi o melhor descrito por uma Lorentziana, exibindo um máximo em ca. 403 nm:

$$\varepsilon_{1Ag}(403) = (0,173^2 - 1,99^2) = -3,93$$

$$\therefore \varepsilon_{meio} = 1,965 \quad (37)$$

resulta, por (35)

$$n_{meio} = 1,40 \quad (38)$$

Ao considerar que o espectro é muito bem descrito por uma Lorentziana para esta amostra, mesmo 120h após a mistura ($R^2 = 0,999$), é razoável supor que as nanopartículas encontram-se no limite quase estático ($r/\lambda \ll 1$). Da equação (9) na seção 3.2.2 é possível notar que a posição do máximo de extinção não é função do diâmetro das nanopartículas, e sim somente das funções dielétricas (desde que estas sejam independentes do tamanho das nanopartículas, aproximação, em geral, tanto pior quanto menor o tamanho das mesmas)^{102-103;121} do material que as constitui e do meio que as circunda. Nesse caso, o deslocamento do máximo da absorbância para maiores comprimentos de onda pode ser interpretado como uma alteração da função dielétrica, logo, do índice de refração do meio no entorno das nanopartículas. O valor obtido de 1,4 para o índice de refração está abaixo do valor próximo a 1,6 obtido para a maioria das proteínas¹²², embora argumente-se que valores inferiores são esperados quando há elevada presença de água na superfície.¹²²

Interpretou-se a redução da absorbância na amostra controle majoritariamente à oxidação e adsorção de íons Ag^+ na superfície das nanopartículas, justificado como a transferência de elétrons livres das AgNps para os cátions adsorvidos.¹²³ De forma análoga, relata-se na literatura uma redução e deslocamento do máximo de extinção ao adsorver íons (ânions) e compostos orgânicos de Enxofre em AgNPs¹²⁴⁻¹²⁵, de maneira dependente da concentração adicionada, efeito atribuído ao aumento da parte imaginária da função dielétrica da Prata (ε_2), inversamente proporcional à seção de choque segundo a equação (9), em função da presença do composto adsorvido.¹²⁴ O fato de termos observado redução semelhante (Figuras 7(a)-(d)) corrobora a ideia da adsorção da DS 01 na superfície das

nanopartículas. Um maior deslocamento do máximo foi obtido ao adicionar 1 μM (ca. 405 nm), no qual há uma nítida presença de um ombro em maior comprimento de onda (ca. 450 nm) em relação à banda plasmônica original. Atribui-se tanto o deslocamento quanto o ombro, majoritariamente, ao acoplamento de dipolos de nanopartículas muito próximas umas das outras (distâncias muito inferiores ao comprimento de onda da radiação incidente)¹⁰², característico da agregação da amostra. Este fato e sua razão foram melhor compreendidos ao observar o aumento do diâmetro hidrodinâmico através do experimento de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

4.2.3 Funcionalização - DLS e Potencial Zeta

Os resultados obtidos para o espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta das amostras são mostrados na Figura 9. É nítido o aumento do diâmetro medido para todas as amostras, em especial para as de menor concentração de Dermaseptina 01 adicionada, para as quais os diâmetros (dobro dos raios) hidrodinâmicos aumentaram uma ou até duas ordens de grandeza em relação ao controle (figura 9(b)). Após 24 horas, o aumento do diâmetro se mostra mais evidente para a adição de 1 μM de DS 01, e, assim como nos resultados de espectroscopia UV-Vis, as amostras contendo 10 e 20 μM do peptídeo apresentaram a longo prazo (figuras 9(b),(c)) características mais semelhantes às nanopartículas originais.

A figura 9(d) exhibe as distribuições obtidas 24 horas após a mistura para os potenciais Zeta em função da concentração de DS 01 adicionada. Sendo o potencial Zeta proporcional à carga contida na superfície de uma partícula, para um sistema cuja estabilização eletrostática seja importante, quanto maior seu valor em módulo, mais estável é a dispersão. Delimitamos arbitrariamente a região $-20 \text{ mV} \leq \zeta \leq 20 \text{ mV}$ em função da maior estabilidade observada nas soluções cuja maior parte da distribuição do potencial medido encontra-se fora desta faixa, no caso, a solução controle e as quais foram adicionadas 10 e 20 μM de DS 01, muito embora comumente considere-se¹²⁶ estáveis partículas que exibem potenciais fora da faixa $-30 \text{ mV} \leq \zeta \leq 30 \text{ mV}$.

Figura 9 - Distribuições dos diâmetros após (a) 24h e (b) 120h da mistura. (c) Evolução temporal da média dos diâmetros para as amostras. (d) Distribuição do potencial Zeta em função da concentração de DS 01 adicionada, 24h após a mistura.

Sendo assim, interpretamos a drástica redução da banda plasmônica e os elevados valores de tamanhos obtidos para as soluções nas quais houve menor adição de DS 01 (1, 2 e 5 μM) como agregação decorrente da perda da estabilização eletrostática, induzida pela neutralidade da soma das cargas negativas dos íons Citrato previamente adsorvidos e das positivas do peptídeo catiônico DS 01 adicionado. A depender da quantidade de peptídeo adicionado, as nanopartículas (ou, ao menos, a maior parte das presentes) adquirem uma carga suficientemente positiva para torná-las novamente estáveis (efeito dependente puramente da cinética de adsorção do peptídeo às nanopartículas, dada a rápida adição e homogeneização da DS 01). É, portanto, razoável supor que a estabilidade da dispersão vá depender não somente da razão entre as concentrações de DS 01 e AgNps, mas também da concentração de íons Citrato presentes.

O leve aumento do diâmetro hidrodinâmico das partículas nas amostras estáveis (10 e 20 μM), em relação à amostra controle, corrobora a ideia da adsorção da DS 01 à superfície das nanopartículas. Sendo obtido um valor próximo a 1,5 nm para o diâmetro hidrodinâmico da DS 01 pela técnica de DLS, e potencial Zeta igual a $3,5 \pm 0,7$ mV para a molécula, as alterações em tamanho e potencial Zeta obtidas para as amostras demandam múltipla adsorção por parte da DS 01 à superfície das AgNps. Os valores médios e respectivos desvios-padrão das distribuições obtidas 120 horas após a mistura são aproximadamente $7,6 \pm 6$ nm, 18 ± 15 nm e 15 ± 12 nm para as amostras controle, e nas adicionadas 10 e 20 μM de DS 01, respectivamente. Esperaríamos, porém, um maior valor médio do diâmetro hidrodinâmico para uma maior concentração de peptídeo adicionado. Da mesma forma, espera-se que a adsorção à superfície não ocorra indefinidamente, mas enquanto a repulsão eletrostática entre a superfície da nanopartícula, agora positiva, e uma molécula livre do peptídeo catiônico, permitir. É preciso observar também que parte significativa da população da amostra de 10 μM encontra-se no intervalo arbitrariamente definido como instável na figura 9(d). Dessa forma, lançamos mão do reportado por Meyer e colaboradores¹²⁷, em que a agregação de um sistema coloidal de fraca estabilidade eletrostática é limitada a um estado em que poucas nanopartículas, agora unidas, geram uma barreira de potencial suficientemente elevada para prevenir uma posterior agregação, estado denominado metaestável pelos autores.

Supomos então que na amostra na qual adicionou-se 10 μM de DS 01, gerou-se nanopartículas cuja repulsão eletrostática, quando isoladas, era insuficiente para impedir sua agregação induzida por uma interação do tipo *van der Waals*^{109;127}, porém suficiente para manter a dispersão quando unidas em pequenos agregados. O fato do espectro de extinção desta amostra ainda ser muito bem descrito por uma Lorentziana ($R^2 = 0,999$), sugere que mesmo em estado agregado, este ainda encontra-se no limite quase estático ($r/\lambda \ll 1$). Quando normalizados e sobrepostos os espectros das amostras 120 horas após a adição de 10 e 20 μM de DS 01 (gráfico não exibido), observou-se uma maior largura a meia-altura para a primeira, de forma assimétrica, em maiores comprimentos de onda, o que denota leve agregação em função do acoplamento de dipolos de partículas próximas.¹⁰²

4.2.4 Funcionalização - Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros gerados pela diferença de absorção de radiação circularmente polarizada à direita e à esquerda, no intervalo de 185 a 250 nm, para 10 μ M de DS 01 livre e na presença de 3 nM de AgNPs são exibidos na figura 10.

Figura 10 - Espectros de dicroísmo circular para a Dermaseptina 01 livre e na presença de 3 nM de nanopartículas de Prata.

Tabela 1 - Contribuição das estruturas secundárias para os espectros obtidos

	DS 01	DS01+AgNps
α -hélice	10.6%	19.4%
Folha β	23.3%	18.9%
Voltas	25.5%	23.7%
Desordenada	40.6%	37.8%

A partir dos espectros, utilizou-se o programa CDPro a fim de estimar a contribuição de espectros de estruturas secundárias características. Os resultados são mostrados na tabela 1. A presença das nanopartículas aumentou a proporção de estruturas do tipo α -hélice na amostra, em detrimento das demais. Castiglione-Morelli e colaboradores⁸⁸ observaram através de espectroscopia de dicroísmo circular uma tendência da DS 01 em

adotar estruturas do tipo α -hélice quando em misturas de água e trifluoretanol (TFE). Para maiores proporções de TFE, que propicia em múltiplas interações uma superfície hidrofóbica em meio aquoso, mais característico de α -hélice tornava-se o espectro.⁸⁸ Dessa forma, interpretamos a maior porcentagem de α -hélice no espectro pela interação do peptídeo com a superfície hidrofóbica da nanopartícula. É possível também que a alteração na estrutura se dê por variações no pH, uma vez que não utilizamos uma solução tampão para realizar a conjugação. Devido ao pequeno volume das amostras, não foi possível realizar a medição do pH com um eletrodo comum. Igualmente, dispensamos as fitas de medição, dada sua imprecisão.

4.2.5 Funcionalização - FTIRS

A fim de melhor visualizar as bandas da Dermaseptina 01 e evitar a influência do Citrato de Sódio no sinal obtido no experimento de espectroscopia no infravermelho, realizamos para este uma síntese na ausência deste sal como estabilizante. Nesse caso, as nanopartículas obtidas eram estabilizadas pelo excesso de íons Borohidreto (BH_4^-) presentes em solução, os quais tornavam as partículas suficientemente negativas e evitavam sua agregação ao adsorver em sua superfície.¹⁰⁴ Reduzimos as concentrações finais (para os 100 mL da mistura) de Prata para 0.1 mM e a de Borohidreto de Sódio para 0,6 mM para evitar agregação induzida por excesso de sal, preparando 90 mL de uma solução do primeiro e outra de 10 mL do segundo composto. Após 30 minutos no banho de gelo a mistura era efetuada, e a reação prosseguia por mais duas horas em agitação nesta condição. O espectro e distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas são mostradas na figura 11. O excelente ajuste Lorentziano ($R^2 = 0,993$) de um intervalo de ± 80 nm a partir do máximo de extinção (ca. 392 nm) permite concluir que as nanopartículas formadas possuem uma resposta óptica equivalente à obtida no limite quase estático, e diâmetros prevalentes inferiores a 10 nm, o que é confirmado na distribuição de tamanhos obtida através de medidas de espalhamento dinâmico de luz (Figura 11(b)).

Figura 11 - (a) Espectro das nanopartículas logo após a síntese, sem diluições. (b) Distribuição de tamanhos das nanopartículas para mesma amostra.

Ao tentar centrifugar as nanopartículas no intuito de remover o excesso de sais da síntese, uma agregação nítida e imediata era observada ao suspendê-las, pelo escurecimento e perda da coloração amarela característica de nanopartículas dispersas. Mesmo utilizando uma menor velocidade de centrifugação (5.000g por 2 horas ao invés dos 18.000g, como utilizado na síntese), resultado semelhante era obtido. Utilizamos portanto a solução sem alterações para realizar a conjugação com a DS 01. Para o cálculo da concentração de Nps resultante desta síntese, empregou-se o procedimento utilizado nas equações 22-24, seção 4.2.1, sendo o diâmetro considerado a média obtida da distribuição da Figura 11(b), igual a 7,7 nanômetros. O resultado obtido para a concentração é de 7,7 nM. No intuito de manter a estabilidade da dispersão coloidal, procedeu-se à diluição desta solução para uma concentração de 4,5 nM, misturando 1 mL desta a 500 μ L de uma solução 30 μ M de DS 01, obtendo concentrações finais de 3 nM e 10 μ M, respectivamente.

A fim de evitar o sinal do peptídeo livre e de sais resultantes da solução, após 24h em repouso, efetuou-se uma centrifugação das amostras a 18.000g por 2 horas, suspendendo o *pellet* formado em 1 mL de água deionizada, o qual foi novamente concentrado por outra centrifugação idêntica. O segundo *pellet* resultante de cada amostra foi então gotejado sobre uma pastilha de Silício. O processo de conjugação e separação foi repetido por 3 vezes, para aumentar a quantidade de amostra sobre o Silício. Interessante notar que, ao contrário da imediata agregação observada para a amostra de AgNps, a amostra contendo 10 μ M de DS 01 manteve uma coloração amarela viva após a suspensão do primeiro *pellet*

em água deionizada. Isso reforça o caráter estabilizante esperado pela adsorção da DS 01 na superfície das nanopartículas.

Os espectros de FTIR obtidos para as nanopartículas, a DS 01 e a mistura de ambas espécies são exibidos na figura 12. Nas figuras 13(a,b,c) destacamos 3 bandas de interesse¹¹³, relativas ao grupo tiol - e metileno adjacente -, do resíduo Cisteína do C-terminal da DS 01, do qual esperava-se que o átomo de Enxofre ligue-se covalentemente à Prata. Observa-se na figura 13(b), no espectro da amostra AgNp + DS 01, a ausência da banda observada em 2564 cm^{-1} no espectro da DS 01, relativa ao estiramento da ligação entre o Enxofre e o Hidrogênio do grupo tiol ($S - H$). A ausência desta banda relacionamos igualmente à ausência desta ligação na amostra contendo AgNps, em que interpretamos como a formação de uma ligação covalente entre o Enxofre e a Prata, sendo necessária a liberação do átomo de Hidrogênio para tal. As demais bandas - 1424 e 2939 cm^{-1} - relacionam-se à deformação e estiramento assimétrico, respectivamente, da ligação entre o átomo de Enxofre e o grupo metileno adjacente. O deslocamento observado para essas bandas nas figuras 13(a,c) relaciona-se à alterações em ligações químicas de seus constituintes, no caso, presume-se, o Enxofre. Alterações nessas três bandas corroboram a ideia da funcionalização das nanopartículas de Prata pela Dermaseptina 01 através de uma ligação covalente entre a Prata e o resíduo Cisteína presente no C-terminal do peptídeo.

Figura 12 - Espectros das amostras DS 01, AgNp, e AgNps + DS 01, com bandas de interesse destacadas.

Figura 13 - (a) Deslocamento da banda em 1424 cm^{-1} . (b) Supressão da banda em 2564 cm^{-1} . (c) Deslocamento da banda em 2939 cm^{-1} .

4.2.6 Funcionalização - Calorimetria de Titulação Isotérmica

Os calores de interação das AgNps com a DS 01 e de diluição da DS 01 em água deionizada podem ser observados nas figuras 14(a) e 14(b), respectivamente. Os valores negativos, observados em cada injeção do peptídeo, representam a redução da potência necessária para manter a mesma temperatura na célula das amostras em relação à equivalente célula de referência (preenchida, nesse caso, com água deionizada). O restante da energia fornecida à célula das amostras provém então da diluição do peptídeo e/ou da reação deste com as AgNps. Na figura 14(a) observa-se uma progressiva redução do calor liberado a medida em que aumentam o número de injeções da DS 01, até atingir um patamar constante. Interpreta-se a redução do calor liberado como uma redução do sítios de ligação disponíveis nas AgNps para a ligação com a DS 01, e o patamar constante como a ausência de sítios disponíveis para a ligação, sendo o calor restante liberado a cada injeção correspondente ao calor de diluição do peptídeo para esta amostra em específico.

A reação de ligação é, portanto, exotérmica ($\Delta H < 0$), e favorável do ponto de vista entálpico pela redução da energia interna (potencial) do sistema AgNps + DS 01, muito embora faz-se necessário medir a contribuição entrópica da reação (ΔS) para considerá-la favorável do ponto de vista termodinâmico (ΔG). Na Figura 14(b) é exibido o perfil de diluição da DS 01 - originada da mesma solução utilizada no caso anterior, logo, de mesma concentração - na ausência das nanopartículas, no qual o calor liberado é praticamente constante para todas as injeções.

Figura 14 - (a) Calor da titulação da DS 01 em solução de AgNps. (b) Calor da titulação da DS 01 em água deionizada

O calor de diluição obtido, foi, no entanto, superior ao medido na saturação ao titular a DS 01 na presença das nanopartículas, não obstante não haver diferença de concentração da solução de DS 01 que foi injetada em ambos os casos. O equipamento requer elevada concordância entre os calores observados na saturação e o calor de diluição para, a partir dos dados, obter parâmetros tais quais a variação de entalpia molar (ΔH), a constante de afinidade e a estequiometria da reação, e destes, a variação da energia livre de Gibbs molar (ΔG) e a variação da entropia molar do processo (ΔS). Afirma-se, no entanto, a necessidade da utilização de soluções tampão idênticas - de mesmo pH, concentração salina - ao obter os calores de reação e de diluição.¹²⁸ Supomos, então, que realizar tais experimentos em água deionizada pode ser tomado como a mais provável fonte da discordância entre os calores observados na saturação e o calor de diluição da DS 01. Nesse caso, para minimizar tal erro, é necessário repetir o processo em uma solução tampão capaz de manter o pH constante, ao mesmo tempo em que a concentração de sais não seja demasiado elevada a ponto de prejudicar a estabilidade das nanopartículas.

É possível calcular a concentração final de DS 01 no processo de titulação. Considerando 38 injeções de 5 μL a partir de uma solução 20 μM em um volume de 1,47 mL, temos:

$$[DS\ 01]_{final} = \frac{V_{titulado} \cdot [DS\ 01]_{inicial}}{(1470\mu\text{L} + V_{titulado})} = \frac{(38 \cdot 5\mu\text{L}) \cdot 20\mu\text{M}}{(1470\mu\text{L} + 38 \cdot 5\mu\text{L})} \cong 2,29\mu\text{M} \quad (39)$$

analogamente, para a concentração final de AgNps,

$$[AgNp]_{final} = \frac{1470\mu\text{L} \cdot 3\text{nM}}{(1470\mu\text{L} + 38 \cdot 5\mu\text{L})} \cong 2,66\text{nM} \quad (40)$$

A razão das concentrações finais equivale aproximadamente a uma solução contendo de 3 nM de AgNps e 2,6 μM de DS 01. De fato, semelhante ao observado para a mistura de concentrações próximas a estas nas seções 4.2.2 e 4.2.3, uma nítida agregação da amostra foi perceptível em poucos dias após a mistura. O espectro de extinção e a distribuição de tamanhos obtidos 120 horas após a realização do experimento de calorimetria de titulação isotérmica são mostrados nas figuras 15(a) e 15(b).

Figura 15 - (a) Espectros de extinção e (b) distribuição de tamanhos das AgNps e da mistura AgNps + DS 01, 120 horas após o experimento de calorimetria de titulação isotérmica.

Interessante notar que a saturação do processo de interação da DS 01 com as nanopartículas de Prata ocorre para uma concentração da primeira muito inferior à necessária para estabilizar as nanopartículas em seu tamanho original. Se atribuímos à ligação covalente entre o Enxofre a Prata a liberação de energia observada na figura 14(a), outra forma de interação diferente da covalente é necessária para estabilizar a dispersão coloidal, como observado para concentrações maiores de DS 01 adicionadas (10 e 20 μM). Do experimento de ITC observa-se portanto uma interação favorável entre as nanopartículas de Prata e a DS 01 do ponto de vista entálpico, do calor liberado (aumento da energia cinética) pela redução da energia potencial do sistema através da interação dos constituintes, processo, que deste ponto de vista, favorece a funcionalização da Prata com o peptídeo.

4.3 Ensaios Antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos, realizados em placa de diluição seriada, permitem a avaliação simultânea da mínima concentração de diversos compostos a inibir visivelmente o crescimento de micro-organismos, avaliados nesse caso, por medidas de absorbância (ou densidade óptica) das soluções. Os valores das concentrações mínimas de inibição (MIC) para os compostos testados são exibidos na tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações mínimas de inibição das diferentes amostras após 24 horas de incubação na presença de 5×10^5 UFC/mL de *E. coli*.

Amostra	MIC
AgNps (segundo <i>pellet</i>)	0,4 nM
DS 01	1,6 μ M
AgNps + 10 μ M DS 01 (segundo <i>pellet</i>)	0,56 nM
Ampicilina	5,4 μ M
Cloramfenicol	5,8 μ M

Os MICs observados para as nanopartículas de Prata e a DS 01 estão em mesma ordem de grandeza ao observado na literatura^{21;90;45}, assim como os observados¹¹⁵ para os antibióticos Ampicilina (ca. 1,88 μ g.mL⁻¹) e Cloramfenicol (ca. 1,87 μ g.mL⁻¹). O valor observado para o segundo *pellet* da mistura 3 nM AgNps + 10 μ M DS 01 foi superior (40%) ao das nanopartículas na ausência do peptídeo. Ao observar o número estimado de unidades formadoras de colônias/mL das bactérias para concentrações inferiores aos MICs de ambos os agentes antimicrobianos, nota-se um comportamento semelhante para ambas as curvas, como exibido na figura 16.

Figura 16 - Unidades formadoras de colônias de *E. coli*/mL em função da concentração de AgNps e AgNps + DS 01

A estimativa da concentração do segundo *pellet* da amostra 3 nM AgNp + 10 μ M DS01 foi feita através de um método semelhante ao empregado para as AgNps, exibido na Figura 6 da seção 4.2.1, na qual relacionamos de forma linear o valor do máximo de extinção para diluições conhecidas da amostra com a concentração de nanopartículas nas mesmas. Argumentamos, porém, na seção 4.2.3 em favor de estados metaestáveis para a mistura de AgNps e DS 01 nas proporções acima, em que instabilidade de parte da população da amostra gerava pequenos agregados suficientemente estáveis para prevenir posterior agregação. Há portanto redução do número de partículas efetivas no meio, o que torna nossa estimativa numérica da curva de calibração superior ao valor real. Nesse caso, as concentrações de nanopartículas consideradas na construção da curva AgNp + DS 01 do gráfico da figura 16 - e consequentemente o MIC - devem ser reduzidos, deslocando a curva vermelha para a esquerda, e aproximando o comportamento desta amostra ao das AgNps livres.

Em contrapartida, argumentamos na seção 2.2.1 que o modo de ação da Prata deve-se exclusivamente aos íons Ag^+ liberados no meio. Torna-se interessante, então, estimar uma eventual diferença na quantidade de íons de Prata liberados em função do tempo para nanopartículas livres na presença de diferentes concentrações da DS 01. É observado na literatura que a adsorção de íons de Prata desloca o máximo de extinção do espectro de AgNps segundo a forma¹²³:

$$\lambda = \lambda_0 \left(1 + \frac{[Ag^+]}{[Ag]} \right)^{1/2} \quad (41)$$

em que $[Ag]$ é a concentração de Prata presente nos coloides - aqui assumida como a concentração do precursor -, $[Ag^+]$ a concentração de íons de Prata adsorvidos - proporcional à Prata oxidada -, λ_0 o comprimento de onda para uma concentração nula de íons adsorvidos e λ o comprimento de onda para uma concentração qualquer de íons adsorvidos. Utilizamos então dos espectros obtidos na seção 4.2.2 para observar alterações nos máximos de extinção para as diferentes amostras consideradas estáveis (AgNps livres e na presença de 10 e 20 μ M de DS 01). Nas figuras 17(a,b,c) são exibidos os espectros destas amostras em 10 minutos, 24 e 120 horas após a mistura.

Figura 17 - Espectros em função do tempo para as amostras AgNp (a), AgNp + 10 μ M DS 01 (b) e AgNp + 20 μ M DS 01 (c). (d) Deslocamento dos máximos em função do tempo.

Pode-se observar um sutil deslocamento do máximo de extinção para todas as amostras selecionadas. Obtidas as derivadas de cada um dos espectros através do programa Origin (OriginLab Corporation®), definiu-se como o correspondente ao máximo o comprimento de onda intermediário aos que apresentavam a transição do valor de derivada primeira de negativo para positivo, sendo o erro associado o intervalo de 1 nm entre ambos. Descontado os valores iniciais, exibimos o deslocamento dos máximos observados para cada uma das três amostras. Para maiores tempos, o maior deslocamento em relação ao inicial foi verificado para a amostra na ausência do peptídeo, sendo menor para maiores concentrações deste. Doty e colaboradores⁹¹ demonstraram a elevada resistência à oxidação de AgNps estabilizadas com peptídeos de 5 aminoácidos, para as quais se observam alterações insignificantes na banda plasmônica mesmo após 24 horas em condições muito ácidas (ca. pH 2), nas quais a liberação de íons de Prata a partir das nanopartículas é favorecida.⁶⁸ Supomos observar o mesmo efeito aqui, na qual a oxidação das nanopartículas

é, em certa parte, prevenida pela adsorção e ligação covalente da DS 01 à superfície das mesmas. Infere-se portanto, menor liberação de íons de Prata, e menor adsorção destes à superfície, para maiores concentrações da DS 01 empregadas, o que pode, em parte, explicar o menor efeito antimicrobiano observado para o segundo *pellet* da amostra 3 nM AgNps + 10 μ M DS 01 em relação às nanopartículas livres.

De fato, ao empregar a equação (41) para estimar a concentração de Ag^+ adsorvida às nanopartículas após 24 horas - considerada aqui proporcional à liberada ao meio -, obtemos os seguintes valores (utilizando $[\text{Ag}] = 0,3\text{mM}$): 9,2 μ M para AgNps livres ($\lambda = 400,5\text{ nm}$; $\lambda_0 = 394,5\text{ nm}$), 9 μ M para a contendo 10 μ M de DS 01 ($\lambda = 408,5\text{ nm}$; $\lambda_0 = 402,5\text{ nm}$) e 7,5 μ M para a de 20 μ M de DS 01 ($\lambda = 407,5\text{ nm}$; $\lambda_0 = 402,5\text{ nm}$). Há de se considerar que o deslocamento para as amostras contendo o peptídeo é também influenciada por alterações na função dielétrica do meio no entorno das nanopartículas, valor que não necessariamente atinge a estabilidade 10 minutos após a mistura. Nesse caso, supõe-se que o comprimento de onda inicial λ_0 para o processo de adsorção de Ag^+ possui um valor ainda maior, o que reduz ainda mais a estimativa da concentração liberada de tais íons.

Ruden e colaboradores reportaram efeito aditivo e sinérgico ao incubar diferentes espécies de bactérias com AgNps combinadas a 6 diferentes peptídeos antimicrobianos, sendo a sinergia limitada a algumas das combinações de todos os fatores.⁴⁶ A incubação dos micro-organismos ocorreu na simples adição dos antibióticos ao meio, controlando apenas sua concentração final, não havendo qualquer caracterização da interação dos peptídeos com as nanopartículas, ou etapas de purificação dos eventuais complexos formados.⁴⁶ Não obstante, é interessante verificar o comportamento da mistura AgNps + DS 01 seguindo este protocolo. A explicação dos autores para a sinergia - em especial das nanopartículas com o peptídeo antimicrobiano Polimixina B contra bactérias gram-negativas - limita-se à hipótese de que "a permeabilização da membrana celular externa aumenta o efeito antimicrobiano intrínseco das AgNps".⁴⁶ Vale ressaltar que os autores desprezam o efeito das nanopartículas em virtude dos íons Ag^+ liberados. Os resultados aqui exibidos e discutidos limitam-se a uma situação particular. Uma caracterização mais completa da interação entre as nanopartículas de Prata e a Dermaseptina 01 deve envolver nanopartículas de diâmetros maiores e menores, e a utilização de moléculas da DS 01 sem a presença do aminoácido Cisteína em

seu C-terminal, o qual acreditamos ser fundamental para uma ligação covalente de ambas. Considerando a necessidade de muitas moléculas de peptídeos antimicrobianos próximas para que haja efeito na membrana celular⁸⁷, a utilização de nanopartículas de maior diâmetro, capazes de acomodar um maior número de moléculas, talvez demonstre uma sinergia interessante aqui aparentemente não observada.

4.4 Ensaios de Citotoxicidade - Citometria de Fluxo

A marcação com os corantes Anexina V - FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) e Iodeto de Propídio (PI - *Propidium Iodide*) permite estimar em uma população de células qual porcentagem das mesmas estão em processo de apoptose - morte celular programada - e necrose - células já mortas, nas quais evidencia-se rompimento da membrana plasmática -, respectivamente. Assim, ao submeter as células às nanopartículas de Prata e à DS 01, pode-se inferir sobre a toxicidade dos compostos ao observar alterações na porcentagem da população sujeitas aos processos de apoptose e necrose. O complexo Anexina V - FITC liga-se na presença de Cálcio à proteína Fosfatidilserina, a qual é deslocada para a parte externa da membrana plasmática durante os estágios iniciais da apoptose, enquanto o Iodeto de Propídio liga-se preferencialmente ao DNA, logo, apresentando maior fluorescência ao adentrar mais facilmente células com danos presentes na membrana plasmática, característicos de um estado de necrose. Distingue-se os sinais de ambos os marcadores pela fluorescência verde (ca. 520 nm) do complexo Anexina V - FITC, enquanto o PI apresenta fluorescência característica vermelha (ca. 610 nm).

Os eventos registrados em função da intensidade da fluorescência para ambos os marcadores (correspondentes aos eixos FL1 - Anexina/FITC e FL3 - PI) da amostra controle, ou seja, na ausência dos agentes antimicrobianos são exibidos na Figura 18.

Figura 18 - Eventos (pontos vermelhos) em função da intensidade da luz para os marcadores FL1 - Anexina/FITC e FL3 - PI da amostra controle.

A marcação evidencia células em processo natural de apoptose e necrose presentes na amostra controle. Limitou-se então a região do quadrante inferior esquerdo como o conjunto de intensidades naturalmente exibidos pelas células da cultura em função dos processos de apoptose e necrose, equivalente ao controle negativo. Em mesma representação, os eventos obtidos para as amostras AgNp 1 nM, DS 01 5 μ M e primeiro *pellet* AgNp 1 nM + DS 01 0,2 μ M são exibidos nas Figuras 19(a,b,c).

A extrapolação dos eventos do quadrante inferior esquerdo indica aumento da intensidade dos sinais de fluorescência em relação à amostra controle, evidenciando maior concentração dos marcadores em função do maior acesso destes aos respectivos ligantes, o que denota aumento da população em processo de apoptose e necrose. Eventos no quadrante superior direito denotam células em processo tardio de apoptose, no qual há danos na membrana celular e o material genético torna-se mais acessível ao Iodeto de Propídio, aumentando sua fluorescência, ao mesmo tempo em que há marcação da Fosfatidilserina devido ao primeiro processo.⁷⁵

Figura 19 - Eventos de fluorescência como resultado de processos de apoptose e necrose para as amostras (a) AgNp 1 nM, (b) DS 01 5 μ M e (c) primeiro *pellet* AgNp 1 nM + DS 01 0,2 μ M.

Considerando que o termo necrose designa não uma forma de morte, mas um estado celular em que há presença de alterações irreversíveis no núcleo e citoplasma das células¹²⁹, diferencia-se então as populações neste estado advindas de um processo apoptótico ou por um outro mecanismo qualquer. É possível observar na Figura 19 que a maior parte dos eventos relacionados ao estado de necrose decorrem de um processo apoptótico - ao comparar as populações no quadrante superior direito em relação ao quadrante superior esquerdo -. As médias (da triplicata) das porcentagens da população de células em processo de apoptose e/ou estado de necrose obtidas para cada amostra testada, em excesso ao controle, são mostrados na tabela 3.

Tabela 3 - Porcentagens médias da população de fibroblastos em processo de apoptose e em estado de necrose para os diferentes agentes antimicrobianos.

Amostra	Apoptose - FL1	Necrose - FL3
AgNp 1 nM	26.50%	13.10%
Ds01 5 uM	23.40%	11.90%
AgNp 1 nM Ds01 0.2 uM	27.90%	14%

AshaRani e colaboradores⁷⁵ obtiveram para AgNps recobertas com amido valores semelhantes aos nossos em concentrações de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que estimamos em $3,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a concentração em massa de 1 nM de AgNps de 10 nM de diâmetro providas de uma síntese de 0,3 mM de íons de Prata. Atribuímos a diferença observada principalmente ao recobrimento das mesmas, e, conseqüentemente, à taxa de liberação de íons Ag^+ , supostos responsáveis pela toxicidade, como discutido na seção 2.2.3. Como resultado preliminar observou-se também indução considerável por parte da DS 01 às células, embora o mesmo peptídeo (desprovido do resíduo Cisteína em seu C-terminal) tenha demonstrado baixa atividade em relação a eritrócitos, mesmo em altas concentrações ($128 \mu\text{g.mL}^{-1}$, equivalente a ca. $46 \mu\text{M}$)⁹⁰, sendo porém um pouco mais tóxico quando incubado com células de peritônio de ratos²¹. Os resultados aqui obtidos são decorrentes de uma avaliação da toxicidade dos compostos de interesse. Naturalmente uma comparação mais clara da toxicidade do complexo AgNps + DS 01 em relação aos mesmos separados dar-se-á ao incubar as células em iguais concentrações dos compostos em ambas as situações.

4.5 Espectroscopia de Fluorescência

Os experimentos de fluorescência foram realizados com nanopartículas de diâmetro hidrodinâmico médio de 1 nm, obtidas, porém, de protocolo de síntese idêntico ao da seção 4.1, alteração resultante do sistema de troca de água do laboratório. Adicionou-se às

mesmas 1 mM de NaCl para que a coloração da solução se tornasse amarelada ao invés de preta, denotando a presença aglomerados ligeiramente superiores à 1 nm. Os espectros de extinção e distribuição dos diâmetros da síntese e após a adição de NaCl são exibidos na figura 20.

Figura 20: Espectros de extinção (a) e distribuição de diâmetros (b) antes e após a adição de NaCl para síntese de mesmo protocolo.

Após a adição de NaCl, construímos uma curva de calibração em procedimento semelhante ao descrito na seção 4.2.1. O pequeno valor do diâmetro obtido (média $1 \pm 0,9$ nm - Figura 20(b)), mesmo após a adição de NaCl, leva a concentrações de nanopartículas da ordem de uma dezena de μM para a síntese (ca. $9,8 \mu\text{M}$), em relação a $9,8 \text{ nM}$ obtido anteriormente. Isso é justificável, pois ao empregar a equação (25) obtém-se, para nanopartículas de $0,5 \text{ nm}$ de raio:

$$\#Ag_{np} = 4 \cdot \frac{4\pi \cdot (0,5 \text{ nm})^3 / 3}{(0.409 \text{ nm})^3} \cong 31 \frac{\text{átomos}}{\text{nanopartícula}} \quad (42)$$

valor aproximadamente 1.000 vezes menor do que para nanopartículas de 10 nm de diâmetro. Ao concentrar então as amostras por 2 horas em centrifugação a $19.000g$, obtém-se valores próximos a uma centena de μM para a solução. Sendo assim, os valores obtidos para a fluorescência de $0,5 \mu\text{M}$ de DS 01 na presença de diferentes concentrações de AgNps oriundas de tal solução, duas horas após a mistura de ambas as espécies, e a adequação dos dados ao modelo de Stern-Volmer (equação 23, seção 3.2.11) são exibidas na figura 21.

Figura 21 - (a) Fluorescência da DS 01 em função da concentração de AgNps. (b) Razão da fluorescência da DS 01 livre e na presença de diferentes concentrações de AgNps.

Observou-se, como retratado na Figura 21(a), que a fluorescência da amostra cai a zero para maiores concentrações de nanopartículas presentes. Desse fato é possível inferir que todos os resíduos de Triptofano da DS 01 são acessíveis à supressão por parte das AgNps, muito embora não seja suficiente para distinguir entre uma supressão dinâmica, através da colisão das espécies em solução, ou uma supressão estática, correspondente à ligação de ambas¹¹⁶. O igual acesso do supressor a todos os fluoróforos é, em geral, bem descrito por uma relação linear (equação 23) entre a razão das fluorescências na ausência e na presença do supressor (F_0/F) e a concentração do supressor empregado¹¹⁶, em que o coeficiente linear é denominado constante de Stern-Volmer (K), e cuja adequação aos nossos dados é exibida na Figura 21(b). É notória a excelente adequação ao modelo ($R^2 = 0,998$), do qual obtivemos para a constante de Stern-Volmer o valor de $K = 2,54 \cdot 10^6 M^{-1}$.

A depender do processo de supressão - dinâmico ou estático - a constante de Stern-Volmer assume diferentes significados. Enquanto em um processo estático ela é equivalente à constante de equilíbrio de associação entre as espécies, em processos dinâmicos define-se tal constante como o produto do tempo de vida do fluoróforo τ_0 na ausência do supressor pela constante bimolecular de supressão k_q :

$$K = K_D := k_q \cdot \tau_0 \quad (43)$$

A constante bimolecular de supressão, por sua vez, é dependente da difusão das espécies no meio, e segundo o modelo de Smoluchowski¹¹⁶, à temperatura ambiente é

limitada à ordem de grandeza $10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$. Sendo assim, obter valores para constante de Stern-Volmer que acarretem valores de k_q superiores a este, revelam processos de supressão de fluorescência outros além da mera colisão das espécies em solução. Considerando o tempo de vida do Triptofano na ausência do supressor igual a¹¹⁶ 2,7 nanosegundos, resulta:

$$k_q = \frac{K}{\tau_0} = \frac{2,54 \cdot 10^6 M^{-1}}{2,7 \cdot 10^{-9} s} \cong 9,4 \cdot 10^{14} M^{-1} s^{-1} \quad (44)$$

valor 100.000 vezes superior ao que poderia ser obtido apenas por uma supressão em função de colisões entre o Triptofano da DS 01 e as AgNps, denotando portanto formação de complexo entre ambos. Sendo um processo de supressão estático, o valor de K obtido, doravante denominado K_{SV} , corresponde à constante de equilíbrio de associação entre as espécies. Seria possível compará-la à equivalente constante de afinidade obtida por medidas de ITC, caso pudéssemos extraí-la dos dados apresentados na seção 4.2.6. É necessário, porém, repetir tal experimento empregando nanopartículas de 10 nm de diâmetro (como de fato tentamos, sem sucesso, ao medir a fluorescência e adequar ao modelo de Stern-Volmer, 24 horas após a mistura das espécies, atribuído à instabilidade dos coloides após o período para certas proporções das concentrações de AgNps e DS 01) e medir o correspondente K_{SV} . Cedervall e colaboradores¹³⁰ observaram diferentes estequiometrias ao estudar a termodinâmica da interação da proteína Albumina de soro humano (HSA - *Human serum albumin*) com nanopartículas poliméricas, em que um maior número de proteínas eram adsorvidas para nanopartículas de maior diâmetro, porém, sem variação da constante de afinidade (equivalente à K_{SV}). Não é possível, afirmar, *a priori*, se diferente valor de K_{SV} seria obtido ao empregar AgNps de 10 nm de diâmetro.

5 Considerações finais e perspectivas

Os resultados deste trabalho sugerem a interação da Dermaseptina 01 com nanopartículas de Prata estabilizadas com Citrato de Sódio. A estabilidade ulterior da dispersão coloidal aparenta ser dependente da razão entre as concentrações de AgNps de aproximadamente 10 nm de diâmetro e da DS 01 presentes na mistura, sendo mais estável para maiores concentrações do peptídeo adicionado. Justificou-se tal comportamento pela transição de uma carga de superfície negativa, provida pelos íons Citrato e Borohidreto adsorvidos durante a síntese, para uma carga positiva característica do peptídeo catiônico nas condições empregadas. Conclusões mais gerais acerca da atividade antimicrobiana e citotoxicidade do composto demandam, porém, avaliação mais extensa em relação às concentrações empregadas, em especial para a toxicidade, e variação de parâmetros tais quais o tamanho das AgNps para efeitos antimicrobianos. A repetição do experimento de Calorimetria de Titulação Isotérmica de forma a fornecer aspectos quantitativos da interação dos compostos empregados faz-se igualmente necessária para a melhor caracterização do sistema. A demanda por novos compostos antimicrobianos cuja a seleção de cepas resistentes ao mesmo seja pouco provável é imediata, ao considerar o fenômeno de resistência antimicrobiana aos antibióticos convencionais como um grave problema de saúde pública. Nesse caso, compostos como a Prata e os peptídeos antimicrobianos cuja atividade contra micro-organismos se dê por múltiplos mecanismos, torna o estudo de tal sistema não somente interessante, porém absolutamente necessário.

Referências

- 1 FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom. **Engineering and Science**, v. 23, n. 5, p. 22-36, 1960.

- 2 ANDERSON, P. W. More is different - Broken symmetry and nature of hierarchical structure of science. **Science**, v. 177, n. 4047, p. 393-396, 1972.

- 3 EUROPEAN UNION. MEMO/11/704 18/10/2011: questions and answers on the Commission Recommendation on the definition of nanomaterial., 2011. Disponível em:<http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-11-704_en.htm>. Acesso em: 18 set.2013.

- 4 JUFFMANN, T.; MILIC, A.; MUELLNERITSCH, M.; ASENBAUM, P.; TSUKERNIK, A.; TUEXEN, J.; MAYOR, M.; CHESHNOVSKY, O.; ARNDT, M. Real-time single-molecule imaging of quantum interference. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 5, p. 296-299, 2012.

- 5 GROEBLACHER, S.; HAMMERER, K.; VANNER, M. R.; ASPELMEYER, M. Observation of strong coupling between a micromechanical resonator and an optical cavity field. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 724-727, 2009.

- 6 O'CONNELL, A. D.; HOFHEINZ, M.; ANSMANN, M.; BIALCZAK, R. C.; LENANDER, M.; LUCERO, E.; NEELEY, M.; SANK, D.; WANG, H.; WEIDES, M.; WENNER, J.; MARTINIS, J. M.; CLELAND, A. N. Quantum ground state and single-phonon control of a mechanical resonator. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 697-703, 2010.

- 7 WEBER, B.; MAHAPATRA, S.; RYU, H.; LEE, S.; FUHRER, A.; REUSCH, T. C. G.; THOMPSON, D. L.; LEE, W. C. T.; KLIMECK, G.; HOLLENBERG, L. C. L.; SIMMONS, M. Y. Ohm's law survives to the atomic scale. **Science**, v. 335, n. 6064, p. 64-67, 2012.

- 8 JOMPOL, Y.; FORD, C. J. B.; GRIFFITHS, J. P.; FARRER, I.; JONES, G. A. C.; ANDERSON, D.; RITCHIE, D. A.; SILK, T. W.; SCHOFIELD, A. J. Probing spin-charge separation in a Tomonaga-Luttinger liquid. **Science**, v. 325, n. 5940, p. 597-601, 2009.

- 9 SCHLAPPA, J.; WOHLFELD, K.; ZHOU, K. J.; MOURIGAL, M.; HAVERKORT, M. W.; STROCOV, V. N.; HOZOI, L.; MONNEY, C.; NISHIMOTO, S.; SINGH, S.; REVCOLEVSKI, A.; CAUX, J. S.; PATTHEY, L.; RONNOW, H. M.; VAN DEN BRINK, J.; SCHMITT, T. Spin-orbital separation in the quasi-one-dimensional Mott insulator Sr₂CuO₃. **Nature**, v. 485, n. 7396, p. 82-U108, 2012.

10 TADROS, T.; IZQUIERDO, R.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004. doi:10.1016/j.cis.2003.10.023.

11 PILLAI, S.; CATCHPOLE, K. R.; TRUPKE, T.; GREEN, M. A. Surface plasmon enhanced silicon solar cells. **Journal of Applied Physics**, v. 101, n. 9, 2007. doi:10.1063/1.2734885

12 POIZOT, P.; LARUELLE, S.; GRUGEON, S.; DUPONT, L.; TARASCON, J. M. Nano-sized transition-metaloxides as negative-electrode materials for lithium-ion batteries. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 496-499, 2000.

13 PARK, J.; WRZESINSKI, S. H.; STERN, E.; LOOK, M.; CRISCIONE, J.; RAGHEB, R.; JAY, S. M.; DEMENTO, S. L.; AGAWU, A.; LICONA LIMON, P.; FERRANDINO, A. F.; GONZALEZ, D.; HABERMANN, A.; FLAVELL, R. A.; FAHMY, T. M. Combination delivery of TGF- β inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. **Nature Materials**, v. 11, n.10, p.895-905, Oct. 2012. doi: 10.1038/nmat3355.

14 MILLER, J. C. S., R.; REPRESAS-CARDENAS, J.M.; KUNDAHL, G. **The handbook of nanotechnology: business, policy, and intellectual property law**. New Jersey: John Wiley, 2005.

15 RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.

16 XIU, Z.-M.; ZHANG, Q.-B.; PUPPALA, H. L.; COLVIN, V. L.; ALVAREZ, P. J. J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, v.12, n.8, p. 4271-5, Aug. 2012. doi: 10.1021/nl301934w.

17 LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. S122-S129, 2004.

18 THE PROJECT on Emerging Nanotechnologies. 2013. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/>>. Acesso em: 23 set.2013.

19 LI, P.; POON, Y. F.; LI, W.; ZHU, H.-Y.; YEAP, S. H.; CAO, Y.; QI, X.; ZHOU, C.; LAMRANI, M.; BEUERMANN, R. W.; KANG, E.-T.; MU, Y.; LI, C. M.; CHANG, M. W.; JAN LEONG, S. S.; CHAN-PARK, M. B. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. **Nature Materials**, v. 10, n. 2, p. 149-156, 2011.

20 HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

21 LEITE, J. R. S. A.; BRAND, G. D.; SILVA, L. P.; KÜCKELHAUS, S. A. S.; BENTO, W. R. C.; ARAÚJO, A. L. T.; MARTINS, G. R.; LAZZARI, A. M.; BLOCH JR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and

Phyllomedusa distincta: secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 151, n. 3, p. 336-343, 2008.

22 WAGNER, V.; DULLAART, A.; BOCK, A.-K.; ZWECK, A. The emerging nanomedicine landscape. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1211-1217, 2006.

23 NANOMEDICINE: a matter of rhetoric? **Nature Materials**, v. 5, n. 4, p. 243-243, 2006. doi:10.1038/nmat1625. Editorial.

24 CHURCH, G. M.; GAO, Y.; KOSURI, S. Next-generation digital information storage in DNA. **Science**, v.337, n.6102, p.1628, Sept.2012. doi: 10.1126/science.1226355

25 MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **Faseb Journal**, v. 19, n. 3, p. 311-330, 2005.

26 CARUTHERS, S. D.; WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. Nanotechnological applications in medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 26-30, 2007.

27 HARISINGHANI, M. G.; BARENTSZ, J.; HAHN, P. F.; DESERNO, W. M.; TABATABAEI, S.; VAN DE KAA, C. H.; DE LA ROSETTE, J.; WEISSLEDER, R. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 25, p. 2491-U5, 2003.

28 HOLME, M. N.; FEDOTENKO, I. A.; ABEGG, D.; ALTHAUS, J.; BABEL, L.; FAVARGER, F.; REITER, R.; TANASESCU, R.; ZAFFALON, P.-L.; ZIEGLER, A.; MULLER, B.; SAXER, T.; ZUMBUEHL, A. Shear-stress sensitive lenticular vesicles for targeted drug delivery. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 8, p. 536-543, 2012.

29 ALIVISATOS, A. P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 933-937, 1996.

30 NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. Nanotechnology applications in cancer. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.9, p.257-288, 2007. doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152025

31 NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M. A. Catalysis with transition metal nanoparticles in colloidal solution: Nanoparticle shape dependence and stability. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 26, p. 12663-12676, 2005.

32 LOO, C.; LIN, A.; HIRSCH, L.; LEE, M. H.; BARTON, J.; HALAS, N. J.; WEST, J.; DREZEK, R. Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 3, n. 1, p. 33-40, 2004.

33 ZIJLSTRA, P.; PAULO, P. M. R.; ORRIT, M. Optical detection of single non-absorbing molecules using the surface plasmon resonance of a gold nanorod. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 6, p. 379-382, 2012.

34 HANAY, M. S.; KELBER, S.; NAIK, A. K.; CHI, D.; HENTZ, S.; BULLARD, E. C.; COLINET, E.; DURAFFOURG, L.; ROUKES, M. L. Single-protein nanomechanical mass spectrometry in real time. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 9, p. 602-608, 2012.

35 MAIER, S. A.; BRONGERSMA, M. L.; KIK, P. G.; MELTZER, S.; REQUICHA, A. A. G.; ATWATER, H. A. Plasmonics - A route to nanoscale optical devices. **Advanced Materials**, v. 13, n. 19, p. 1501-1505, 2001.

36 OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823-839, 2005.

37 WARHEIT, D. B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 183-185, 2008.

38 FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 565-571, 2007.

39 ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 151-165, 2012.

40 KIRCHNER, C.; LIEDL, T.; KUDERA, S.; PELLEGRINO, T.; JAVIER, A. M.; GAUB, H. E.; STOLZLE, S.; FERTIG, N.; PARAK, W. J. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. **Nano Letters**, v. 5, n. 2, p. 331-338, 2005.

41 YE, L.; YONG, K. T.; LIU, L.; ROY, I.; HU, R.; ZHU, J.; CAI, H.; LAW, W. C.; LIU, J.; WANG, K.; LIU, Y.; HU, Y.; ZHANG, X.; SWIHART, M. T.; PRASAD, P. N. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 7, p. 453-458, 2012.

42 SAMUEL REICH, E. Nano rules fall foul of data gap. **Nature**, v. 480, n. 7376, p. 160-161, 2011.

43 HANSEN, S. F.; BAUN, A. When enough is enough. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 7, p. 409-411, 2012.

44 CHAMAKURA, K.; PEREZ-BALLESTERO, R.; LUO, Z.; BASHIR, S.; LIU, J. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 88-96, 2011.

- 45 LOK, C. N.; HO, C. M.; CHEN, R.; HE, Q. Y.; YU, W. Y.; SUN, H. Z.; TAM, P. K. H.; CHIU, J. F.; CHE, C. M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 4, p. 916-924, 2006.
- 46 RUDEN, S.; HILPERT, K.; BERDITSCH, M.; WADHWANI, P.; ULRICH, A. S. Synergistic interaction between Silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3538-3540, 2009.
- 47 PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, V. K.; NEVECNA, T. J.; ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 33, p. 16248-16253, 2006.
- 48 KVITEK, L.; PANACEK, A.; SOUKUPOVA, J.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PRUCEK, R.; HOLECOVA, M.; ZBORIL, R. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 15, p. 5825-5834, 2008.
- 49 DIBROV, P.; DZIOBA, J.; GOSINK, K. K.; HASE, C. C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668-2670, 2002.
- 50 SCHREURS, W. J. A.; ROSENBERG, H. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 152, n. 1, p. 7-13, 1982.
- 51 RUSSELL, L. M.; ROSENBERG, H. Linked transport of phosphate, potassium-ions and protons in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 184, n. 1, p. 13-21, 1979.
- 52 ROSENBERG, H.; GERDES, R. G.; CHEGWIDDEN, K. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 131, n. 2, p. 505-511, 1977.
- 53 BRAGG, P. D.; RAINNIE, D. J. Effect of silver ions on respiratory-chain of *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 883-889, 1974.
- 54 CHAPPELL, J. B.; GREVILLE, G. D. Effect of silver ions on mitochondrial adenosine triphosphatase. **Nature**, v. 174, n. 4437, p. 930-931, 1954.
- 55 TERADA, H. Uncouplers of oxidative-phosphorylation. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 213-218, July 1990.
- 56 HOLT, K. B.; BARD, A. J. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. **Biochemistry**, v. 44, n. 39, p. 13214-13223, 2005.
- 57 LODISH, H. **Molecular cell biology**. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2000.

58 SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

59 FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 662-668, 2000.

60 MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of Silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005.

61 LI, W.-R.; XIE, X.-B.; SHI, Q.-S.; DUAN, S.-S.; OUYANG, Y.-S.; CHEN, Y.-B. Antibacterial effect of Silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. **Biometals**, v. 24, n. 1, p. 135-141, 2011.

62 LOK, C.-N.; HO, C.-M.; CHEN, R.; HE, Q.-Y.; YU, W.-Y.; SUN, H.; TAM, P.; CHIU, J.-F.; CHE, C.-M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 527-534, 2007.

63 OJEA-JIMENEZ, I.; PUNTES, V. Instability of cationic gold nanoparticle bioconjugates: the role of Citrate ions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 37, p. 13320-13327, 2009.

64 PARK, H.-J.; KIM, J. Y.; KIM, J.; LEE, J.-H.; HAHN, J.-S.; GU, M. B.; YOON, J. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 1027-1032, 2009.

65 CHOI, O.; HU, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 12, p. 4583-4588, 2008.

66 LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

67 FARR, S. B.; KOGOMA, T. Oxidative stress responses in Escherichia-coli and Salmonella-typhimurium. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 561-585, 1991.

68 LIU, J.; HURT, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-Silver colloids. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 6, p. 2169-2175, 2010.

69 XIU, Z.-M.; ZHANG, Q.-B.; PUPPALA, H. L.; COLVIN, V. L.; ALVAREZ, P. J. J. Negligible particle-specific antibacterial activity of Silver nanoparticles. **Nano Letters**, v. 12, n. 8, p. 4271-4275, 2012.

70 DAL LAGO, V.; DE OLIVEIRA, L. F.; GONCALVES, K. D. A.; KOBARG, J.; CARDOSO, M. B. Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 33, p. 12267-12273, 2011.

71 SILVER, S. Bacterial Silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. **Fems Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 341-353, 2003.

72 SILVER, S.; PHUNG, L. T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to Silver compounds. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 627-634, 2006.

73 KLAUS, T.; JOERGER, R.; OLSSON, E.; GRANQVIST, C. G. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 24, p. 13611-13614, 1999.

74 CHOPRA, I. The increasing use of Silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 587-590, 2007.

75 ASHARANI, P. V.; MUN, G. L. K.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and genotoxicity of Silver nanoparticles in human cells. **Acs Nano**, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2009.

76 CARLSON, C.; HUSSAIN, S. M.; SCHRAND, A. M.; BRAYDICH-STOLLE, L. K.; HESS, K. L.; JONES, R. L.; SCHLAGER, J. J. Unique cellular interaction of Silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive Oxygen species. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 43, p. 13608-13619, 2008.

77 SUNG, J. H.; JI, J. H.; YOON, J. U.; KIM, D. S.; SONG, M. Y.; JEONG, J.; HAN, B. S.; HAN, J. H.; CHUNG, Y. H.; KIM, J.; KIM, T. S.; CHANG, H. K.; LEE, E. J.; LEE, J. H.; YU, I. J. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. **Inhalation Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 567-574, 2008.

78 JI, J. H.; JUNG, J. H.; KIM, S. S.; YOON, J.-U.; PARK, J. D.; CHOI, B. S.; CHUNG, Y. H.; KWON, I. H.; JEONG, J.; HAN, B. S.; SHIN, J. H.; SUNG, J. H.; SONG, K. S.; YU, I. J. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of Silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation Toxicology**, v. 19, n. 10, p. 857-871, 2007.

79 KIM, Y. S.; KIM, J. S.; CHO, H. S.; RHA, D. S.; KIM, J. M.; PARK, J. D.; CHOI, B. S.; LIM, R.; CHANG, H. K.; CHUNG, Y. H.; KWON, I. H.; JEONG, J.; HAN, B. S.; YU, I. J. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of Silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 575-583, 2008.

80 LIU, J.; WANG, Z.; LIU, F. D.; KANE, A. B.; HURT, R. H. Chemical transformations of nanosilver in biological environments. **Acs Nano**, v. 6, n. 11, p. 9887-9899, 2012.

- 81 WIJNHOFEN, S. W. P.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HERBERTS, C. A.; HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; HEUGENS, E. H. W.; ROSZEK, B.; BISSCHOPS, J.; GOSENS, I.; VAN DE MEENT, D.; DEKKERS, S.; DE JONG, W. H.; VAN ZIJVERDEN, M.; SIPS, A. J. A. M.; GEERTSMA, R. E. Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 2, p. 109-178, 2009.
- 82 LOWRY, G. V.; GREGORY, K. B.; APTE, S. C.; LEAD, J. R. Transformations of nanomaterials in the environment. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 13, p. 6893-6899, 2012.
- 83 THE ANTIMICROBIAL Peptide Database. 2013. Disponível em <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>>. Acesso em : 23 set. 2013.
- 84 JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.
- 85 ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.
- 86 HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006.
- 87 BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.
- 88 CASTIGLIONE-MORELLI, M. A.; CRISTINZIANO, P.; PEPE, A.; TEMUSSI, P. A. Conformation-activity relationship of a novel peptide antibiotic: structural characterization of dermaseptin DS 01 in media that mimic the membrane environment. **Biopolymers**, v. 80, n. 5, p. 688-696, 2005.
- 89 MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics Dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 50, p. 31635-31641, 1994.
- 90 BRAND, G. D.; LEITE, J.; SILVA, L. P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M. V.; AZEVEDO, R. B.; CARREGARO, V.; SILVA, J. S.; SA, V. C. L.; BRANDAO, R. A.; BLOCH, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta* - anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332-49340, 2002.
- 91 DOTY, R. C.; TSHIKHUDO, T. R.; BRUST, M.; FERNIG, D. G. Extremely stable water-soluble Ag nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 18, p. 4630-4635, 2005.

92 JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. **Chemical Communications**, n. 7, p. 617-618, 2001. doi: 10.1039/B100521I

93 PINTO, V. V.; FERREIRA, M. J.; SILVA, R.; SANTOS, H. A.; SILVA, F.; PEREIRA, C. M. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: effect of the synthesis and storage conditions. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1-3, p. 19-25, 2010.

94 LIZ-MARZAN, L. M.; PHILIPSE, A. P. Stable hydrosols of metallic and bimetallic nanoparticles immobilized on Imogolite fibers. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 41, p. 15120-15128, 1995.

95 POLTE, J.; TUAEV, X.; WUITHSCHICK, M.; FISCHER, A.; THUENEMANN, A. F.; RADEMANN, K.; KRAEHNERT, R.; EMMERLING, F. Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: analogies and differences to the growth of gold nanoparticles. **Acs Nano**, v. 6, n. 7, p. 5791-5802, 2012.

96. BERNI NETO, E. A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de Prata para aplicações bactericidas**. 2010. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

97 CHI, E. Y.; KRISHNAN, S.; RANDOLPH, T. W.; CARPENTER, J. F. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 9, p. 1325-1336, 2003.

98 MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. **Langmuir**, v. 12, n. 3, p. 788-800, 1996.

99 XIA, Y. N.; HALAS, N. J. Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. **Mrs Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 338-344, 2005.

100 BORN, M. W., E. **Principles of optics**. 6th. ed. Oxford, England: Cambridge University Press, 1980.

101 ZAYATS, A. V.; SMOLYANINOV, II; MARADUDIN, A. A. Nano-optics of surface plasmon polaritons. **Physics Reports**, v. 408, n. 3-4, p. 131-314, 2005.

102 KREIBIG, U.; VOLLMER, M. **Optical properties of metal clusters**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995.

103 ZHANG, J. Z.; NOGUEZ, C. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. **Plasmonics**, v. 3, n. 4, p. 127-150, 2008.

104 VAN HYNING, D. L.; ZUKOSKI, C. F. Formation mechanisms and aggregation behavior of borohydride reduced silver particles. **Langmuir**, v. 14, n. 24, p. 7034-7046, 1998.

- 105 PALIK, E. D. **Handbook of optical constant of solids**. San Diego: Academic Press, 1998.
- 106 BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics**. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2000.
- 107 FRISKEN, B. J. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. **Applied Optics**, v. 40, n. 24, p. 4087-4091, 2001.
- 108 KOPPEL, D. E. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy - method of cumulants. **Journal of Chemical Physics**, v. 57, n. 11, p. 4814-&, 1972.
- 109 FENNEL EVANS, D.; WENNERSTRÖM, H. **The colloidal domain : where physics, chemistry, biology and technology meet**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1999.
- 110 JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 17, n. 22, p. 6782-6786, 2001.
- 111 KISS, F. D.; MIOTTO, R.; FERRAZ, A. C. Size effects on Silver nanoparticles' properties. **Nanotechnology**, v. 22, n. 27, p.275708, 2011.
- 112 LIDE, D. R. **CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data**. 84th ed. Boca Ralton: Taylor & Francis, 2003.
- 113 COLTHUP, N. B. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**. 3th ed. San Diego: Academic Press, 1990.
- 114 GREENFIE.N; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-&, 1969.
- 115 ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.Supplement 1.
- 116 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006.
- 117 EVANOFF, D. D.; CHUMANOV, G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. **Chemphyschem**, v. 6, n. 7, p. 1221-1231, 2005.
- 118 GRANQVIST, C. G.; BUHRMAN, R. A. Ultrafine metal particles. **Journal of Applied Physics**, v. 47, n. 5, p. 2200-2219, 1976.

119 PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995.

120 REFRACTIVE Index Database. Disponível em: < <http://refractiveindex.info>>. Acesso em: 23 set. 2013.

121 JONATHAN, A. S.; AI LEEN, K.; JENNIFER, A. D. Quantum plasmon resonances of individual metallic nanoparticles. **Nature**, v. 483, n. 7390, p. 421-427, 2012.

122 JUNG, L. S.; CAMPBELL, C. T.; CHINOWSKY, T. M.; MAR, M. N.; YEE, S. S. Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. **Langmuir**, v. 14, n. 19, p. 5636-5648, 1998.

123 HENGLEIN, A. Colloidal Silver nanoparticles: photochemical preparation and interaction with O₂, CCl₄, and some metal ions. **Chemistry of Materials**, v. 10, n. 1, p. 444-450, 1998.

124 LINNERT, T.; MULVANEY, P.; HENGLEIN, A. Surface-chemistry of colloidal Silver - surface-plasmon damping by chemisorbed I⁻, SH⁻, and C₆H₅S. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 679-682, 1993.

125 HENGLEIN, A.; MEISEL, D. Spectrophotometric observations of the adsorption of organosulfur compounds on colloidal silver nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 43, p. 8364-8366, 1998.

126 MURDOCK, R. C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A. M.; SCHLAGER, J. J.; HUSSAIN, S. M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239-253, 2008.

127 MEYER, M.; LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. Self-limiting aggregation leads to long-lived metastable clusters in colloidal solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 12, p. 6040-6047, 2006.

128 MANUAL microcalorímetro VP-ITC Microcal. 2005. Disponível em: < http://www.uic.edu/orgs/ctrstbio/manuals/vpitc_manual.pdf>. Acesso em: 23 set. 2013.

129 MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 3-15, 1995.

130 CEDERVALL, T.; LYNCH, I.; LINDMAN, S.; BERGGARD, T.; THULIN, E.; NILSSON, H.; DAWSON, K. A.; LINSE, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2050-2055, 2007.