



JESSICA FERNANDA AFFONSO DE OLIVEIRA

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
COM ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS: UMA
ALTERNATIVA PARA A RESISTÊNCIA BACTERIANA**

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

JESSICA FERNANDA AFFONSO DE OLIVEIRA

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM
ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS: UMA ALTERNATIVA PARA A
RESISTÊNCIA BACTERIANA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MATEUS BORBA CARDOSO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. EDVALDO SABADINI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA
ÁREA DE FÍSICO-QUÍMICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR JESSICA FERNANDA AFFONSO DE OLIVEIRA, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
MATEUS BORBA CARDOSO.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

OL4f Oliveira, Jessica Fernanda Affonso de, 1989-
Funcionalização de nanopartículas de prata com antibióticos β -lactâmicos :
uma alternativa para a resistência bacteriana / Jessica Fernanda Affonso de
Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Mateus Borba Cardoso.

Coorientador: Edvaldo Sabadini.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Química.

1. Nanopartículas. 2. Organofuncionalização. 3. Prata. 4. Antibióticos beta-
lactâmicos. 5. Testes de sensibilidade bacteriana. I. Cardoso, Mateus Borba. II.
Sabadini, Edvaldo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functionalization of silver nanoparticles with β -lactam antibiotics : an
alternative to bacterial resistance

Palavras-chave em inglês:

Nanoparticles

Organofunctionalization

Silver

Antibiotics beta-lactams

Antimicrobial sensitivity tests

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestra em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Mateus Borba Cardoso [Orientador]

René Alfonso Nome Silva

Silvia Stanisquaski Guterres

Data de defesa: 24-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

Dedicatória

À Deus pela oportunidade de viver e de poder desenvolver tal trabalho.

À minha avó Maria Helena e à todos os amigos que já não fazem mais parte do plano terrestre, mas que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado durante os meus momentos mais difíceis.

Aos meus pais e meu irmão que sempre me apoiaram e me estimularam nas horas em que mais precisei. Serei eternamente grata aos sacrifícios e amor que eles me despenderam durante todos esses anos. À toda a minha família pela compreensão e carinho em todos os momentos da minha vida.

Aos meus professores do ensino fundamental, colégio, universitário e da pós-graduação, principalmente ao professor Edson de Souza, que despertou em mim o amor pela Química e me inspira a seguir o caminho da ciência.

A todos meus amigos, em especial Weberson Tizolin, Paula Christinelli, Heitor Crepaldi, Carlos Camargo, Ariele Moreira, Ingrid Prandi, Thais Milão, Leandro Assis, Renata Brito, Luciane Oliveira, Livia Covezzi, Ariadne Bido, Jaqueline Matsusato, Willian Takemitsu, Carlos Sato, Simone Betini, Tamiris Piva, com os quais compartilhei muitos momentos de minha vida e que me fizeram rir nas horas mais difíceis. Aos amigos da Tat Wong Kung Fu Academy, em especial aos Sihings Virgínio Gomes, Daniel Texeira, Érik Souza e ao Sifu Rodrigo Seixas.

Aos meus amigos e queridos companheiros da UFSCar e USP São Carlos, em especial Dra. Maria I. B. Bernardi, Prof. Dr. Antônio C. Hernandez, Dr. Vinicius F. Guimarães, Dr. Vinicius D. Araújo, Prof. Dr. Alexandre Mesquita, Prof. Dr. Emerson R. Camargo pela amizade, incentivo e companheirismo sempre presentes.

E à todas as pessoas que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

*"Nunca deixe que lhe digam
Que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos
Nunca vão dar certo
Ou que você nunca
Vai ser alguém."*

(Renato Russo)

Agradecimentos

- ✓ Ao meu orientador Prof. Dr. Mateus Borba Cardoso, pelos ensinamentos, paciência, conselhos e plena confiança em meu trabalho, que contribuíram muito para meu desenvolvimento pessoal e profissional ao longo desses anos. Aos membros da banca pela disposição em examinar e contribuir para este trabalho.
- ✓ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Projeto 2011/15937-2) pela bolsa de mestrado concedida e suporte financeiro ao LNLS.
- ✓ Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em especial ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho, em especial pelos experimentos realizados na linha de SAXS. Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), principalmente ao Sidnei Araújo, pela paciência e ajuda na caracterização dos compostos sintetizados. Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), principalmente ao Prof. Dr. Jörg Kobarg e à sua aluna Ângela Saito, que possibilitou a aplicação biológica dos materiais sintetizados ao longo do projeto.
- ✓ À Unicamp, em especial ao Instituto de Química, por ter me proporcionado um ensino de excelência durante todo o período de pós-graduação.
- ✓ À Profa. Dra. Dulce Helena e à sua aluna MSc Ariele Moreira, pela crucial colaboração nos fornecendo as cepas de *Escherichia coli* resistente e não-resistente à ampicilina. Ao Prof. Dr. David G. Whitten e ao seu aluno Eric Hill, pela hospitalidade, paciência e ensinamentos durante a realização de experimentos complementares na Universidade do Novo México. E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome: Jessica Fernanda Affonso de Oliveira

Data de nascimento: 05/01/1989

Naturalidade: São Carlos – SP

Nacionalidade: Brasileira

Endereço eletrônico: jessica.oliveira@lnls.br

Formação Acadêmica

Graduação em Bacharelado em Química com ênfase em Química Tecnológica – 03/2007 a 12/2011.

Instituição: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos – SP.

Artigos publicados

1. Oliveira, J.F.A.; Milão, T.M.; Araújo, V.D.; Moreira, M.L. ; Longo, E.; Bernardi, M. I. B. *Influence of different solvents on the structural, optical and morphological properties of CdS nanoparticles*. Journal of Alloys and Compounds, **2011**, 509, 6880-6883.
2. T. M. Milão, J. F. A. Oliveira, V. D. Araújo, M. I. B. Bernardi. *Zn_{0.97}M_{0.03}O (M = Co, Fe and V) pigments: Thermal, structural and optical characterization*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, **2011**, 103, 873-877.

Artigo aceito para publicação

1. Oliveira, J.F.A.; Cardoso, M. B. *Partial aggregation of silver nanoparticles induced by capping and reducing agents competition*. (aceito para publicação em 11/12/2013 – Langmuir - 10.1021/la403635c)

Artigos submetidos (aguardando avaliação)

1. Ferreira, D. C. M.; Giordano, G. F.; Soares, C. C. P.; Oliveira, J. F. A.; Piazzetta, M. H.; Cardoso, M. B.; Gobbi, A. L. *A Point-of-Care for Ascorbic Acid Detection Using Silver Nanoparticles Paper-based Sensor*. (Aguardando avaliação)

Trabalhos apresentados

1. Bido, A. T., Oliveira, J. F. A., Cardoso, M. B. *Avaliação das propriedades bactericidas do sistema Ag@SiO₂*, **XXI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp** (2013).
2. Oliveira, J. F. A., Bido, A. T., Cardoso, M. B. *Silver-silica core-shell systems: Promising antibacterial agents against Gram-positive and Gram-negative bacteria*, **XII SBPMat** (2013).
3. Bido, A. T., Oliveira, J. F. A., Cardoso, M. B. *Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata para obtenção de sistemas core-shell*, **XX Congresso de Iniciação Científica da UFSCar** (2013).
4. Oliveira, J. F. A., Bido, A. T., Cardoso, M. B. *Evaluation of bactericidal properties of silver-silica core-shell systems*, **II Conferência USP em Nanotecnologia** (2012).

Cursos e participação em eventos

1. Workshop "Redação de artigos científicos em inglês", IEL-Unicamp (2012).
2. Curso "Método lógico para a escrita científica", IEL-Unicamp (2012).

Resumo

O trabalho aqui descrito teve como objetivo a obtenção de um sistema com duplo poder de inibição bacteriana baseado em nanopartículas de prata (AgNPs) recobertas com sílica mesoporosa (SM) para subsequente funcionalização com antibióticos β -lactâmicos. O agente β -lactâmico utilizado durante o desenvolvimento do projeto foi a ampicilina. Além disso, o trabalho teve como foco: (1) analisar o possível sinergismo da utilização das AgNPs e do antibiótico β -lactâmico contra bactérias suscetíveis à ampicilina e (2) investigar uma possível ação bactericida dos sistemas sintetizados contra *Escherichia coli* resistente ao agente β -lactâmico escolhido. Durante o trabalho, duas sínteses distintas para a obtenção das AgNPs foram testadas. A primeira delas é baseada na redução química dos íon Ag^+ por boroidreto de sódio (NaBH_4) utilizando citrato de sódio como agente protetor. Através desse método, não foi possível recobrir as AgNPs com sílica. No entanto, essa metodologia possibilitou estudar o fenômeno de crescimento e agregação parcial das nanopartículas sintetizadas. Dessa forma, a segunda alternativa para sintetizar as AgNPs foi baseada na redução química dos íons Ag^+ em etileno glicol (EG), na presença de polivinilpirrolidona (PVP). Essa estratégia permitiu o recobrimento das AgNPs com sílica e essas nanopartículas foram então utilizadas para os procedimentos de funcionalização com a ampicilina. Foram realizados experimentos de atividade biológica com as bactérias *Escherichia coli* e *Escherichia coli* resistente à ampicilina (Gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), através da incubação do material juntamente com as bactérias, seguida pela cultura das mesmas em placas de ágar. Todos os materiais sintetizados apresentaram propriedades antibacterianas, que aumentam com o aumento da concentração dos materiais utilizados. A partir dos ensaios biológicos, foi possível observar que as nanopartículas de prata recobertas com sílica mesoporosa (Ag@SiO_2) possuem elevado efeito antimicrobiano, ocasionando 100% de redução do número de colônias para todas as bactérias estudadas. Além disso, é possível notar que a funcionalização com ampicilina aumentou as propriedades bactericidas das nanopartículas de sílica e, em altas concentrações, o sistema de prata funcionalizado com ampicilina (Ag@SiO_2 -Ampicilina), apresentou resultados semelhantes ao seu respectivo precursor sem funcionalização. Uma explicação viável para a menor eficiência do sistema Ag@SiO_2 -Ampicilina em baixas concentrações pode estar relacionada à oclusão dos poros da sílica mesoporosa, ocasionada pelo processo de funcionalização, impedindo assim a lixiviação da prata iônica. Apesar dos resultados satisfatórios obtidos para o sistema Ag@SiO_2 -Ampicilina, ainda é preciso investigar uma alternativa que não ocasione a obstrução dos poros da sílica e, dessa forma não reduza o efeito da prata presente no sistema estudado.

Abstract

The work described here aimed to obtain a dual bacterial inhibition system based on silver nanoparticles (AgNPs) coated with mesoporous silica (MS) for further functionalization with β -lactams antibiotics. Ampicillin was the β -lactam chosen for the project development. Moreover, this work is focused on: (1) analyzing the possible synergism of using AgNPs combined with β -lactam antibiotic against ampicillin susceptible bacteria and (2) investigating a possible bactericidal action of the synthesized systems against *Escherichia coli* strain which is resistant to β -lactam. Two different methodologies for AgNPs synthesis were tested. The first one is based on the chemical reduction of Ag^+ ions by sodium borohydride (NaBH_4) in the presence of sodium citrate as capping agent, which did not allow the silica coating. However, it allowed us to study growth and partial aggregation of these nanoparticles. Therefore, the second alternative to synthesize AgNPs was based on the chemical reduction of Ag^+ ions solubilized by ethylene glycol (EG) in the presence of polyvinylpyrrolidone (PVP). This strategy allowed us coating the AgNPs with silica and these nanoparticles were used for functionalization with ampicillin. Biological activity experiments were conducted with *Escherichia coli* and *Escherichia coli* resistant to ampicillin (Gram-negatives) and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive), through nanoparticles incubation test in tubes containing the bacteria, followed by culturing on agar plates. All synthesized materials showed antibacterial properties, which increase with increasing concentration of the materials tested. From the biological tests, it is observed that silver nanoparticles coated with mesoporous silica (Ag@SiO_2) have high antimicrobial effect, promoting 100% reduction in the number of colonies for all bacteria studied. Furthermore, it is noticed that the functionalization with ampicillin increased the bactericidal properties of silica nanoparticles, and in high concentrations, silver functionalized with ampicillin (Ag@SiO_2 -Ampicillin) presented similar results to its respective precursor without functionalization. One possible explanation for the lower efficiency of the Ag@SiO_2 -Ampicillin system at low concentrations may be related to the occluded pores of mesoporous silica, caused by the functionalization process, while preventing the leaching of ionic silver. Despite the satisfactory results obtained for Ag@SiO_2 -Ampicillin system, it is still necessary to investigate an alternative which does not cause occlusion of silica pores and, consequently, does not reduce the effect of silver in the studied system.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	XXIII
LISTA DE TABELAS.....	XXV
LISTA DE FIGURAS	XXVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	1
1.2. NANOMATERIAIS	5
1.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	7
1.4. AÇÃO BACTERICIDA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	8
1.5. SÍNTESE DA SHELL AO REDOR DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	10
1.6. FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	12
2. OBJETIVO	13
3. METODOLOGIA	14
3.1. MATERIAIS	14
3.2. SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS.....	15
3.2.1. <i>Síntese de nanopartículas de prata em presença de citrato de sódio (AgNP-Cit).....</i>	<i>16</i>
3.2.2. <i>Síntese de nanopartículas de prata em presença de PVP (AgNPs-PVP)</i>	<i>16</i>
3.2.3. <i>Formação da shell de sílica ao redor das nanopartículas AgNPs-PVP (Ag@SiO₂).....</i>	<i>17</i>
3.2.4. <i>Obtenção do sistema Ag@SiO₂ funcionalizado com grupamentos amino (Ag@SiO₂-NH₂).....</i>	<i>17</i>

3.2.5. Obtenção do sistema Ag@SiO_2 funcionalizado com ampicilina (Ag@SiO_2 -Ampicilina).....	18
3.2.6. Síntese de nanopartículas de sílica (SiO_2).....	18
4. CARACTERIZAÇÕES	19
4.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS	19
4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM).....	20
4.3. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	20
4.4. ADSORÇÃO/DESORÇÃO DE NITROGÊNIO.....	20
4.5. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)	21
4.6. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	21
4.7. POTENCIAL ZETA.....	22
5. ENSAIOS BIOLÓGICOS	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)	23
6.1.1. Síntese de nanopartículas de prata em presença de citrato de sódio (AgNPs-Cit).....	23
6.1.2. Síntese de nanopartículas de prata em presença de PVP (AgNPs-PVP)	38
6.1.3. Formação da shell de sílica ao redor das nanopartículas AgNPs-PVP (Ag@SiO_2).....	41
6.1.4. Síntese das nanopartículas de SiO_2	46
6.1.5. Obtenção dos sistemas funcionalizados com ampicilina.....	49
7. ENSAIOS BIOLÓGICOS	59
7.1. SUSCEPTIBILIDADE DAS BACTÉRIAS ÀS NANOPARTÍCULAS	59

8. CONCLUSÕES	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
10. ANEXOS	79
10.1. CURVA EXPERIMENTAL DE SAXS USANDO O PARÂMETRO CUT-OFF D = RAIO DA PARTÍCULA	79
10.2. GRÁFICO DE CHI-SQUARE DETERMINADO PARA OS DIFERENTES RAIOS DURANTE O PROCEDIMENTO DE AJUSTE DA CURVA EXPERIMENTAL DE SAXS .	80
10.3. CITOMETRIA DE FLUXO.....	81
10.4. ARTIGO SUBMETIDO (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM 11/12/2013 - LANGMUIR).....	91
10.5. ARTIGO SUBMETIDO (AGUARDANDO AVALIAÇÃO)	120

Lista de Abreviaturas

AgNPs	Nanopartículas de prata
APTES	3-aminopropiltriétoxisilano
BET	Brunauer-Emmett-Teller
β Ls	β -lactamases
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamonio
DLVO	Derjaguin e Landau, Verwey e Overbeek
DM	Dinâmica molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDC	Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EG	Etileno glicol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>fd</i>	Fator de diluição
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
I_0	Intensidade de espalhamento extrapolado para $q = 0$
λ	Comprimento de onda
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LSPR	Ressonância plasmônica superficial localizada
MES	Ácido-2-(N-morfolino) etanosulfônico
NaBH_4	Boroidreto de sódio
NHS	N-hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
POPC	1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina

PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucleíco
SAXS	Espalhamento de raios X a baixos ângulos
SM	Sílica mesoporosa
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TEOS	Tetraetilortosilicato
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Análise termogravimétrica
TSC	Citrato de trisódio
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visível
ζ	Potencial zeta

Lista de Tabelas

Tabela 1: Precursores utilizados para a preparação dos nanocompósitos.	14
Tabela 2: Fator de diluição (fd) empregado para a diluição das amostras, posição do máximo de absorção (λ), raio das partículas (R), desvio padrão do raio (σ) e intensidade de espalhamento extrapolado para ângulo zero (I_0) obtida através das medidas de SAXS.....	25
Tabela 3: Bandas de transmitância características das nanopartículas sintetizadas.	53
Tabela 4: Potencial zeta das nanopartículas sintetizadas.....	56
Tabela 5: Concentração dos materiais ($\mu\text{g/mL}$) utilizados na aplicação biológica.	60

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura básica da penicilina evidenciando o núcleo β -lactâmico em vermelho.....	1
Figura 2: Esquema de acilação do resíduo de serina da enzima transpeptidase.	2
Figura 3: Estrutura básica do peptídeo d-alanilalanina.....	2
Figura 4: Esquema dos três principais mecanismos de resistência bacteriana. (I) Degradação enzimática, (II) Mutação genética e (III) Bomba de efluxo. ⁹ ...	3
Figura 5: Esquema dos três principais mecanismos de transferência de resistência bacteriana. (I) Transdução, (II) Conjugação e (III) Transformação. ¹⁰	4
Figura 6: Esquema demonstrativo da reação de formação das nanopartículas de prata. O precursor de prata é representado pelos cátions Ag^+ , o agente redutor é esquematicamente apresentado em cima da seta reacional e o CTAB é arbitrariamente utilizado como agente estabilizante da nanopartícula formada. Os elementos reacionais apresentados na figura não estão na devida escala para uma melhor visualização do fenômeno.....	7
Figura 7: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão do sistema Ag@SiO_2 que foi obtida durante o programa “Bolsa de Verão 2011” do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela aluna Virginia Dal Lago.....	11
Figura 8: Etapas da síntese para a obtenção de nanopartículas de prata funcionalizadas com agentes β -lactâmicos. As AgNPs (b) foram formadas através da reação de redução do nitrato de prata (a) em presença de um agente redutor (o estabilizante não é apresentado por simplicidade). Em seguida, uma <i>shell</i> de SM foi produzida através da hidrólise e condensação do tetraetil	

ortosilicato (TEOS) na presença de amônia como catalisador. Isso produziu um sistema *core-shell* Ag@SiO₂ conforme apresentado na Figura 8c. Essas nanopartículas foram então revestidas por uma fina camada de sílica funcionalizada (3-aminopropil trietoxissilano – APTES) originando um sistema *core-shell* com grupamentos amino localizados na superfície da nanopartícula (d). Finalmente, as nanopartículas amino-funcionalizadas reagiram com os grupos carboxila da ampicilina através de uma reação de acoplamento ácido-base formando a estrutura esquematizada em (e).15

Figura 9: (A) Espectro de absorção UV-Vis das AgNPs-Cit. Amostras A1 até A6 são observadas da esquerda para a direita como indicado pela flecha. (B) Ampliação da região de máxima absorção de todos os espectros apresentados em (A).25

Figura 10: Curvas de espalhamento de SAXS para as amostras de AgNPs-Cit sintetizadas e seus ajustes correspondentes (linha sólida). (A) A1, (B) A2, (C) A3, (D) A4, (E) A5 e (F) A6.27

Figura 11: Distribuição de tamanho das partículas de todas as AgNPs-Cit obtidas através dos ajustes apresentados na Figura 10.31

Figura 12: Intensidade de espalhamento extrapolada para ângulo zero (I_0) obtido através dos dados de SAXS e fator de diluição (fd) obtido através das medidas de UV-Vis em função da concentração de NaBH₄. A amostra A1 corresponde ao ponto da esquerda no gráfico, a amostra A6 é o ponto à direita da figura e as amostras A2 a A5 são respectivamente plotadas entre as amostras A1 e A6.32

Figura 13: Variação de potencial zeta (quadrados pretos) e pH (círculos brancos) em função da concentração de NaBH₄. A linha vermelha indica o ajuste parabólico para os valores de pH conforme a concentração de NaBH₄

aumenta. Ambos os valores de potencial zeta e pH para as amostras A1 a A6 são observadas da esquerda para a direita, indicado pelas flechas.	34
Figura 14: Esquema proposto para o mecanismo de agregação das AgNPs devido ao aumento da razão $[\text{NaBH}_4]/[\text{Ag}^+]$. A primeira caixa (esquerda) mostra a formação de AgNPs com a adição de NaBH_4 . A transição da caixa da esquerda para a central mostra um aumento no tamanho das NPs. Conforme a concentração de NaBH_4 aumenta, a força iônica também aumenta e induz a remoção parcial de citrato fracamente associado à superfície das AgNPs. A caixa da direita indica um sistema onde há coexistência de estruturas não agregadas e do estruturas do tipo “corrente” que são interpretadas como resultado do processo de agregação parcial.	37
Figura 15: (A) Fotografia das AgNPs-PVP e (B) seu espectro de absorção UV-Vis correspondente.	39
Figura 16: (A) Curva de SAXS para a amostra de AgNPs-PVP e seu ajuste correspondente (linha sólida vermelha). (B) Distribuição de tamanho de partículas de prata obtida a partir do ajuste em vermelho apresentado na Figura 15A.	40
Figura 17: Estrutura básica da molécula de PVP.	42
Figura 18: Espectro de absorção UV-Vis do sistema <i>core-shell</i>	43
Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão por varredura do sistema Ag@SiO_2 . Imagens obtidas em (A) baixa e (B) alta magnificação.	44
Figura 20: Distribuição de tamanho obtida por microscopia eletrônica de transmissão do sistema Ag@SiO_2 . (A) tamanho da partícula Ag@SiO_2 e (B) tamanho do <i>core</i> de prata.	45
Figura 21: Curva de espalhamento de SAXS para a amostra Ag@SiO_2 e seu ajuste correspondente (linha sólida).	45

Figura 22: Mecanismo de reação de hidrólise básica, responsável pela formação dos silanóis. ⁷⁶	47
Figura 23: Mecanismo de condensação de duas moléculas de silanol, formando a estrutura básica que compõe as nanopartículas de SiO ₂ . ⁷⁶	47
Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de SiO ₂ . .	48
Figura 25: (A) Curva de SAXS para a amostra de nanopartículas de sílica e seu ajuste correspondente (linha sólida vermelha). (B) Distribuição de tamanho de partículas de sílica obtida a partir do ajuste em vermelho apresentado na Figura 25A.....	49
Figura 26: Etapas da síntese para a obtenção de nanopartículas funcionalizadas com agentes β-lactâmicos. Primeiramente, o sistema (A) é revestido por uma fina camada de sílica funcionalizada (3-aminopropil trietoxisilano – APTES) originando nanopartículas com grupamentos amino localizados na superfície (B). As nanopartículas amino-funcionalizadas reagem com os grupos carboxila da ampicilina através de uma reação de acoplamento ácido-base formando a estrutura Ag@SiO ₂ -Ampicilina esquematizada em (C). Esse esquema é meramente ilustrativo e não está na proporção de tamanho real do sistema.	50
Figura 27: Primeira etapa da reação de acoplamento. Em pH levemente ácido, inicialmente, ocorre a protonação da carbodiimida (EDC), originando o carbocátion representado em 1, que é hidrolisado, formando um derivado de uréia em 2. ⁷⁸	51
Figura 28: O ácido carboxílico (presente na ampicilina), reage com o carbocátion 1 através do ataque nucleofílico do grupo carboxilato, originando O-acilisouréia em 3. ⁷⁸	51

Figura 29: Mecanismo de reação entre a O-acilisouréia e o NHS. Quando o NHS reage com a O-acilisouréia, um éster bastante estável é formado. Como o composto também é estericamente impedido, não ocorre nenhum rearranjo, e a formação da ligação amida é então facilitada. ⁷⁸	52
Figura 30: Espectro de infravermelho das nanopartículas sintetizadas: (A) Espectro inteiro, (B) ampliação da região de 3300 a 2800 cm ⁻¹ , (C) ampliação da região de 1800 a 1300 cm ⁻¹ e (D) ampliação da região de 1250 a 700 cm ⁻¹ . Linha preta: Ag@SiO ₂ ; linha vermelha: Ag@SiO ₂ -NH ₂ ; e linha azul: Ag@SiO ₂ -Ampicilina.	54
Figura 31: Espectro de infravermelho da ampicilina.	55
Figura 32: Curvas de TGA de (A) ampicilina e (B) nanopartículas sintetizadas. Linha preta: Ag@SiO ₂ ; linha vermelha: Ag@SiO ₂ -NH ₂ ; e linha azul: Ag@SiO ₂ -Ampicilina.	57
Figura 33: Gráfico comparativo do efeito bactericida dos materiais sintetizados para as bactérias (A) <i>S. aureus</i> , (B) <i>E. coli</i> e (C) <i>E. coli</i> resistente à ampicilina. As concentrações a, b e c são referentes às concentrações dos materiais (em µg/mL) utilizados na aplicação biológica e estão descritas na Tabela 5. As colunas em laranja representam a ampicilina, em preto as AgNPs, em vermelho as nanopartículas de SiO ₂ , em azul o sistema Ag@SiO ₂ , em verde o composto SiO ₂ -Ampicilina e em rosa as nanopartículas de Ag@SiO ₂ -Ampicilina. O símbolo * representa as concentrações que não causaram inibição do crescimento bacteriano. Análise estatística foi realizada de acordo com o teste-t de Student. As letras minúsculas e em itálico na parte superior das barras indicam média <i>P</i> <0,05 para um mesmo grupo. As letras em comum denotam que os dados não são estatisticamente diferentes.....	61

Figura 34: Esquema representativo das nanopartículas Ag@SiO₂ (A) e das Ag@SiO₂-Ampicilina (B). Os poros existentes no sistema Ag@SiO₂, por onde há a liberação de íons Ag⁺, são parcialmente obstruídos com o processo de funcionalização⁴. Esse esquema é meramente ilustrativo e não está na proporção de tamanho real do sistema.65

Figura 35: Três etapas representando o mecanismo da translocação da ampicilina através proteína-F da membrana externa (OmpF). A OmpF se dobra, tendo configuração semelhante à um “barril-beta” (conformação beta da proteína), formando uma zona de constrição (CR). Além de tal constrição espacial, esta zona é também caracterizada por resíduos carregados negativamente (representados por D113, E117 e D121) e resíduos carregados positivamente (representados por R42, R82, e R132). Apenas os resíduos envolvidos nas interações de hidrogênio/hidrofóbicas com ampicilina são mostrados nessa figura. Os resíduos do monômero OmpF são representados usando representação bola-bastão (básico: azul, ácido: vermelho, hidrófobo: cinza), e as regiões hidrofóbicas são mostrados na representação “ondas” (cinza). Na etapa A, são mostradas as interações da ampicilina com os resíduos carregados acima da CR. Na etapa B, são apresentadas as diversas interações da ampicilina na região CR. Na etapa C, é evidenciada a interação final entre a OmpF e a ampicilina antes da completa translocação do antibiótico através da OmpF.⁸⁵67

Figura 36: (A) Representação esquemática do fosfolípídeo 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) e (B) representação esquemática da molécula de ampicilina na sua forma zwitteriônica.68

Figura A1: Curva de SAXS para as nanopartículas de prata da amostra A3 usando o parâmetro *cut-off D* = raio da nanopartícula.....79

Figura A2: Gráfico de *chi-square* determinado para os diferentes raios durante o procedimento de ajuste da curva experimental de SAXS. (A) A1, (B) A2, (C) A3, (D) A4, (E) A5 e (F) A6.....80

1. Introdução

1.1. Antibióticos β -lactâmicos

Desde a descoberta da penicilina, os β -lactâmicos tornaram-se os mais importantes e utilizados agentes antibacterianos, devido à seu amplo espectro de ação e baixa toxicidade.¹⁻⁴ Eles compõem uma ampla família de antibióticos que apresentam um núcleo β -lactâmico em sua estrutura molecular

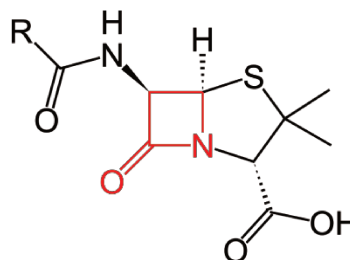


Figura 1: Estrutura básica da penicilina evidenciando o núcleo β -lactâmico em vermelho.

(**Figura 1**). Dependendo da vizinhança química do anel β -lactâmico, esta família pode ser subdividida em derivados da penicilina, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.⁵

Os antibióticos, em geral, agem principalmente nas estruturas bacterianas e celulares, especialmente na construção da parede celular, DNA, RNA e síntese de proteínas.⁶ Além disso, são capazes de inibir as enzimas presentes nas células bacterianas, como transpeptidases e as carboxipeptidases, através da acilação dos resíduos de serina³, como mostra a **Figura 2**.

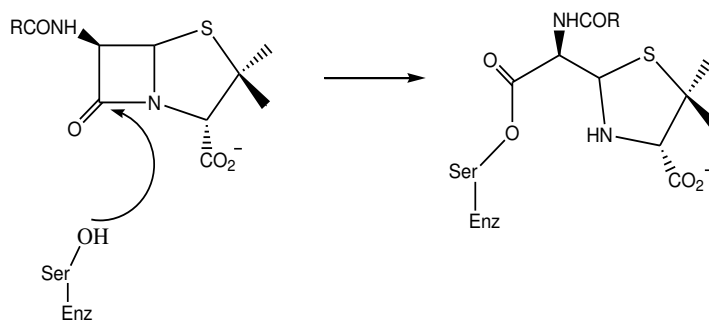


Figura 2: Esquema de acilação do resíduo de serina da enzima transpeptidase.

Os antibióticos β -lactâmicos se assemelham ao fragmento de peptídeo d-alanilalanina (**Figura 3**), o qual a enzima utiliza como substrato.³ No entanto, o uso descontrolado dos antibióticos resultou na

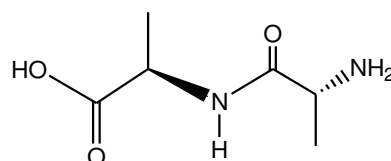


Figura 3: Estrutura básica do peptídeo d-alanilalanina.

adaptação e desenvolvimento de resistência bacteriana, levando à falha no tratamento, hospitalização prolongada, o que aumenta o custo do tratamento e eleva a mortalidade.⁶

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos variam. A **Figura 4** mostra um esquema de três principais mecanismos de resistência bacteriana. O primeiro está associado às enzimas beta-lactamases (β LS), pois elas catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, desativando-o, como pode ser observado na **Figura 4 (I)**. Essas enzimas são as principais responsáveis pela resistência associada às famílias das penicilinas e cefalosporinas.⁷ Um outro mecanismo está relacionado à alteração do alvo intracelular do antibiótico, como por exemplo, ribossomos, enzimas metabólicas ou proteínas envolvidas na replicação do DNA ou síntese da parede celular, como pode ser visto na **Figura 4 (II)**. Um terceiro tipo de mecanismo de resistência bacteriana bastante comum, é a bomba de efluxo

(Figura 4 (III)). A bomba de efluxo é um canal essencial na célula da bactéria, responsável por exportar ativamente agentes antibacterianos e outros compostos para fora da célula. Dessa forma, não há o acúmulo intracelular de substâncias tóxicas à bactéria. No entanto, mais de um tipo de mecanismo pode prover resistência ao mesmo antibiótico.⁸

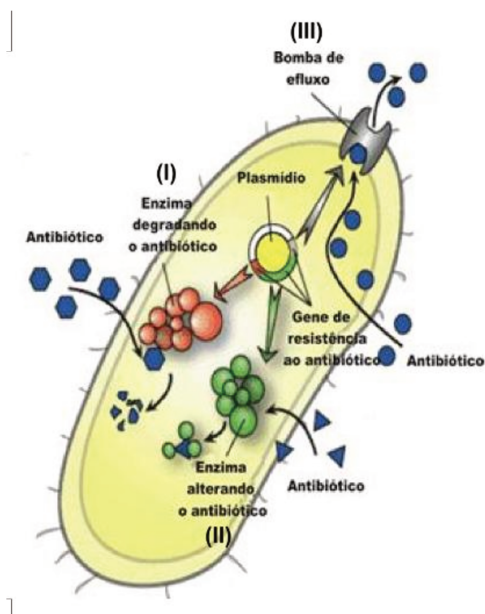


Figura 4: Esquema dos três principais mecanismos de resistência bacteriana. (I) Degradação enzimática, (II) Mutação genética e (III) Bomba de efluxo.⁹

A resistência bacteriana pode ser transferida entre bactérias por três principais mecanismos, (I) Transdução, (II) Conjugação e (III) Transformação. A Figura 5 mostra um esquema com esses três principais mecanismos:

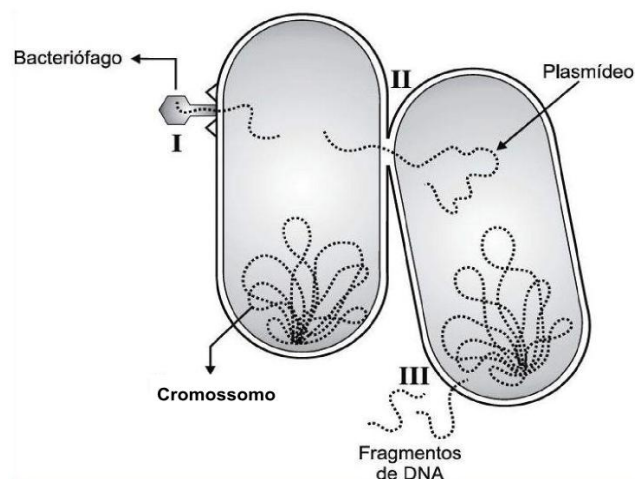


Figura 5: Esquema dos três principais mecanismos de transferência de resistência bacteriana. (I) Transdução, (II) Conjugação e (III) Transformação.¹⁰

A transdução (**Figura 5 (I)**) é o processo de reprodução no qual o DNA bacteriano é transferido de uma bactéria para outra por um vírus, conhecidos como bacteriófagos. Já a conjugação (**Figura 5 (II)**), ocorre quando duas células estão próximas uma da outra, e uma espécie de “ponte” é formada entre essas células. Isso permite que o plasmídeo (DNA bacteriano) de uma das células seja transferido para a outra, tornando uma bactéria susceptível em resistente. A transformação (**Figura 5 (III)**), ocorre quando uma bactéria resistente morre e seu DNA é liberado no meio circundante. Outras bactérias que estejam próximas, podem absorver esse DNA e incorporá-lo em seu próprio DNA, adquirindo então resistência.

Dessa forma, devido à eclosão de doenças infecciosas causadas por diferentes bactérias patogênicas e o desenvolvimento da resistência à antibióticos^{6, 11}, as companhias farmacêuticas e pesquisadores estão estudando novos agentes antibacterianos, livres de resistências e de baixo custo.¹²⁻¹⁴ Dentre as abordagens propostas até agora, uma delas propõe alterações estruturais dos β -lactâmicos buscando diminuir a sua sensibilidade à hidrólise

por β -lactamases. Outra abordagem sugere a utilização simultânea de dois agentes β -lactâmicos, pois no caso da bactéria apresentar resistência a um dos compostos, o outro agente antibacteriano atuaria de forma mais efetiva.¹⁵⁻¹⁷ No entanto, esses métodos/estratégias não têm se mostrado eficientes e novas alternativas estão sendo investigadas a fim de evitar a resistência bacteriana.¹⁸ Nesse cenário, materiais em escala nanométrica têm emergido como novos agentes antimicrobianos devido à sua grande razão área superficial/volume e às suas propriedades físico e químicas únicas.¹¹

1.2. Nanomateriais

O progresso na área da nanotecnologia fez o início do século XXI ser conhecido como o século da nanotecnologia.¹⁹ Nanociência é o estudo das propriedades dos materiais que, em pelo menos uma dimensão, está na escala do nanômetro (10^{-9} m).^{20, 21} A expansão da nanotecnologia deve-se à capacidade de modular os materiais, alterando drasticamente suas propriedades físicas, químicas e ópticas.²² O crescente interesse em materiais nanoestruturados vem do fato de que as propriedades destes são diferentes e frequentemente superiores àsquelas de materiais que apresentam estruturas na escala micrométrica.²³ Estas propriedades surgem devido a um aumento substancial da fração de átomos de superfície e ao aumento do papel dos efeitos de superfície e incluem confinamento quântico em semicondutores²⁴, ressonância de plasmons de superfície em metais²⁵ e superparamagnetismo em materiais magnéticos.²⁶

Uma das aplicações mais promissoras da nanotecnologia está no campo da medicina, dando origem à “nanomedicina”. O objetivo da nanomedicina

pode ser amplamente definida como melhoria de todos os sistemas biológicos humanos, utilizando nanoestruturas para atingir benefícios médicos.²⁷

Com o surgimento e propagação da resistência bacteriana, nanomateriais têm sido estudados como novos agentes antimicrobianos. Entre diversos materiais, as nanopartículas de prata (AgNPs), têm atraído muito interesse devido às suas potenciais aplicações biomédicas, pois apresentam propriedades bactericidas e baixa propensão de induzir resistência microbiana quando comparados aos antibióticos convencionais^{12, 14}, além de, em baixas concentrações, apresentarem baixa toxicidade para as células humanas.^{25, 28-32}

A prata têm sido utilizada por milhares de anos como um metal precioso pelos humanos em diferentes aplicações como jóias, ferramentas, moedas, materiais fotográficos ou explosivos.³⁰ Nos séculos XVII e XVIII, o nitrato de prata foi utilizado no tratamento de úlcera e sua atividade antimicrobiana foi estabelecida no século XIX, sendo especialmente empregado no tratamento de queimaduras.^{12, 33} No entanto, após a descoberta dos antibióticos em 1940, o uso de sais de prata diminuiu.^{22, 30}

As AgNPs foram definidas como “oligodinâmicas” devido à sua habilidade de produzir efeitos bactericidas em baixas concentrações. Isso se deve ao fato dos íons Ag^+ apresentarem alta afinidade por proteínas, enzimas, DNA, RNA, etc. graças às interações com grupos funcionais que podem interferir em processos microbianos tais como tiol, carboxilato, fosfato, hidroxila, imidazol, indol ou aminas.³⁴ O mecanismo mais aceito indica que essas nanopartículas aderem à superfície da membrana celular carregada negativamente levando à desnaturação das proteínas e consequente morte celular.^{22, 35, 36} Além disso, muitos autores têm sugerido que essas nanopartículas podem penetrar no interior das bactérias, causando danos

celulares por meio de liberação e posterior interação dos íons Ag^+ com compostos contendo enxofre e fósforo, como por exemplo, o DNA.³⁷

1.3. Síntese das Nanopartículas de Prata

Nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas através de métodos químicos, físicos e biológicos.¹⁸ Os métodos biológicos para a síntese de nanopartículas têm sido utilizados como uma possível alternativa sustentável aos métodos químicos e físicos.³⁸ De fato, diferentes espécies de bactérias, fungos,¹⁸ enzimas, plantas ou extrato de plantas,^{38, 39} são capazes de reduzir os íons metálicos, produzindo as nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas.¹⁸

Do ponto de vista biomédico, a síntese de nanopartículas requer o uso de métodos que permitam o controle preciso do tamanho e da forma das estruturas a fim de obter um conjunto de nanopartículas monodispersas que exibam uma propriedade específica. Em geral, a síntese de nanopartículas metálicas em suspensão coloidal é realizada utilizando os seguintes componentes: i) precursor metálico; ii) agente redutor e iii) agente estabilizante. Um esquema

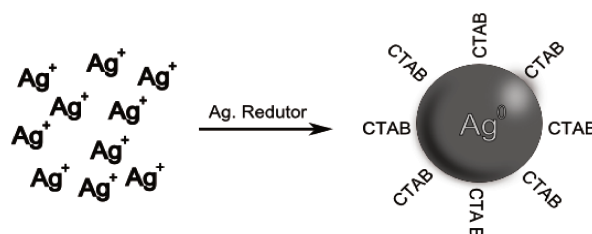


Figura 6: Esquema demonstrativo da reação de formação das nanopartículas de prata. O precursor de prata é representado pelos cátions Ag^+ , o agente redutor é esquematicamente apresentado em cima da seta reacional e o CTAB é arbitrariamente utilizado como agente estabilizante da nanopartícula formada. Os elementos reacionais apresentados na figura não estão na devida escala para uma melhor visualização do fenômeno.

demonstrativo da reação de formação das nanopartículas de prata é apresentado na **Figura 6**. Vários sais de prata, agentes redutores bem como agentes estabilizantes são utilizados a fim de obter nanopartículas com baixa polidispersão e alto rendimento reacional. Dentre os sais de prata, o mais comumente utilizado é o nitrato de prata (AgNO_3).²⁵ Já quando se trata de agentes redutores e estabilizantes, uma maior diversificação pode ser observada. Dentre os agentes redutores podemos citar o ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$),⁴⁰ a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)^{41, 42} e o borohidreto de sódio (NaBH_4) enquanto que para os agentes estabilizantes é possível destacar o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB),⁴⁰ a polivinilpirrolidona (PVP),²⁵ o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$),⁴¹ os polímeros do amido (amilose e amilopectina),^{42, 43} dentre outros.

1.4. Ação bactericida das Nanopartículas de Prata

Muitos fatores têm sido descritos por influenciar a ação antimicrobiana das AgNPs como o tamanho, forma, cristalinidade, química de superfície, agentes protetores, assim como fatores ambientais, tais como pH, força iônica e a presença de ligantes, cátions divalentes e macromoléculas.^{35, 44}

O real mecanismo pelo qual as nanopartículas de prata são capazes de inibir o crescimento bacteriano não foi ainda completamente elucidado, mas estudos sugerem que existem quatro possíveis mecanismos de ação: (1) interação com a membrana da célula da bactéria, (2) formação de íons Ag^+ , (3) interação das AgNPs com compostos que contém enxofre ou fósforo, tais como proteínas e DNA, e (4) formação de *pits* na membrana celular.⁴⁵ Além disso, alguns estudos têm demonstrado que a carga superficial das AgNPs é crucial para sua atividade antimicrobiana.⁴⁶ Uma hipótese é que a interação

entre as nanopartículas e as células bacterianas é devido às interações eletrostáticas entre a membrana da célula carregada negativamente e às partículas carregadas positivamente.^{22, 35, 36} No entanto, esse mecanismo não é explicado para a adesão e captação de partículas carregadas negativamente.^{22, 35, 36} Dessa forma, têm sido proposto que há sítios preferenciais de interação das AgNPs e da membrana celular, que podem estar relacionados com proteínas que contenham enxofre.^{35, 36} Isso parece mais provável do que as interações eletrostáticas devido à evidência aos danos das proteínas de membrana das bactérias após à exposição às AgNPs.^{35, 36}

Outro mecanismo comumente proposto na literatura está associado à geração de espécies oxigenadas reativas (ROS) e danificação da membrana celular ocasionada pelos íons Ag^+ liberados pelas AgNPs.³⁵ As espécies oxigenadas reativas (ROS) são subprodutos naturais do metabolismo de organismos aeróbicos. Excesso de produção de ROS pode causar estresse oxidativo e a geração adicional de radicais livres pode atacar os lipídeos da membrana, levando ao colapso da membrana ou, ainda, causando danos no DNA. No entanto, as AgNPs são mais tóxicas que outras espécies, indicando que outros fatores além da geração de ROS intracelular podem ter um papel na toxicidade total ocasionada por essas partículas.³⁵

Além disso, outros possíveis mecanismos propostos envolvem a interação da prata com macromoléculas biológicas tais como enzimas e DNA. Acredita-se que o DNA perde sua habilidade de replicação e as proteínas celulares se tornam inativadas sob tratamento com Ag^+ .^{22, 36, 45} Além disso, também têm sido mostrado que Ag^+ se liga a grupos de proteínas funcionais, principalmente à moléculas que apresentam o grupo tiol, resultando na desnaturação das proteínas.^{22, 36, 45} Em contraste, Sondi *et al*³⁶ mostraram que a

atividade bactericida das AgNPs nas bactérias gram-negativas depende da concentração das nanopartículas e está intimamente relacionado com a formação de *pits* na parede celular da bactéria.⁴⁶

A maioria dos estudos sugerem que as AgNPs não são tóxicas. Mas devido ao seu pequeno tamanho e as propriedades variáveis elas podem apresentar danos ao meio ambiente.²² Geralmente, o mecanismo antimicrobiano de agentes químicos depende de ligações específicas com a superfície e agentes do metabolismo dentro do microorganismo.⁴⁶ Por exemplo, a camada de peptidoglicano é uma característica específica das espécies de bactérias e não das células mamíferas. Portanto, se o efeito das AgNPs estiver associado à camada de peptidoglicano, sua aplicação como agente antimicrobiano é mais adequada e mais específica.⁴⁶

1.5. Síntese da Shell ao Redor das Nanopartículas de Prata

Sabe-se que nanopartículas metálicas apresentam baixa estabilidade em suspensão e alta tendência à agregação no meio biológico. Dessa forma, estruturas híbridas do tipo *core-shell* (caroço-casca) têm sido propostas para solucionar tal problema. Por exemplo, a sílica mesoporosa (SM) é amplamente utilizada como um material formador de *shell*, pois possui alta estabilidade química e térmica, além de apresentar grande área superficial e ótima biocompatibilidade. Estudos mostram que sistemas *core-shell* Ag@SiO₂ são bons candidatos para materiais antibacterianos, pois acredita-se que os núcleos de prata liberam lentamente íons Ag⁺ através da camada porosa de sílica, produzindo e mantendo os excelentes efeitos bactericidas.⁴⁰

O recobrimento das nanopartículas metálicas com SM tem se tornado uma prática muito comum. Isto se deve ao fato de que a SM previne a

agregação das nanopartículas enquanto mantém as propriedades dos núcleos metálicos. Esse recobrimento com sílica é um processo razoavelmente simples o qual é derivado da conhecida síntese de Stöber.⁴⁷ Nesse processo, as nanopartículas metálicas são utilizadas como semente da reação e a SM é produzida pela hidrólise e condensação do tetraetil ortosilicato (TEOS) na presença de hidróxido de amônia como catalisador. Dessa forma, o sistema *core-shell* é formado onde o *core* é formado pela nanopartícula metálica enquanto que a *shell* é formada pela SM.

Na **Figura 7**, uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão do sistema Ag@SiO₂ é apresentada, que foi obtida durante o Programa “Bolsa de Verão 2011” do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela aluna Virginia Dal Lago. Devido à maior densidade eletrônica, a região central corresponde à prata enquanto que a parte mais clara é a sílica.

A adição da SM é estrategicamente interessante por dois motivos: (1) previne que as nanopartículas se agreguem fazendo com que o sistema fique estável (sem precipitação) por longos períodos; e (2) possibilita a adição de novas funcionalidades às partículas fazendo com que suas propriedades bactericidas sejam melhoradas. Com base nas vantagens acima, o objetivo do trabalho é funcionalizar essas nanopartículas com grupamentos amino (utilizando

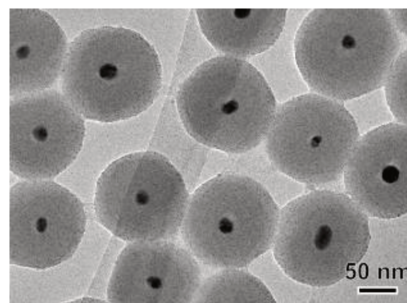


Figura 7: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão do sistema Ag@SiO₂ que foi obtida durante o programa “Bolsa de Verão 2011” do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela aluna Virginia Dal Lago.

3-aminopropiltrietoxissilano - APTES) para posterior reação química, buscando a ligação do antibiótico β -lactâmico à superfície do compósito, através de uma reação de acoplamento ácido-base (grupo carboxila do β -lactâmico com o grupo amino da sílica funcionalizada). Dessa forma, pretende-se obter um sistema com dupla atividade bactericida, contendo as AgNPs e as moléculas do antibiótico atuando em conjunto.

1.6. Funcionalização das Nanopartículas de Prata

A combinação da ciência dos materiais e da nanomedicina têm resultado no surgimento de campos alternativos que envolvem a funcionalização de nanoestruturas com vários materiais ativos. Embora existam vários trabalhos na literatura relacionados aos procedimentos básicos para a funcionalização e aplicação dos materiais especializados, pesquisas relacionadas às atividades antibacterianas de nanomateriais funcionalizados com biomoléculas terapeuticamente ativas são bastante raras.⁴⁸

Diferentes antibióticos agem de maneira específica frente as bactérias; dessa forma, o estudo particular da interação entre os antibióticos de amplo espectro e os patógenos é de alta importância para o desenvolvimento de novas drogas. Um estudo realizado por Amanulla *et al*¹⁴, reporta que as propriedades dos antibióticos ampicilina, canamicina, eritromicina e clorafenicol são aumentadas quando combinadas com AgNPs. O possível modo de ação dessas nanopartículas pode estar associado às interações de van der Waals e outras ligações fracas, que levam à interação entre as AgNPs funcionalizadas com o antibiótico e a parede da célula bacteriana. Essas interações resultam na lise da parede celular e penetração das nanopartículas na bactéria. Além disso, o complexo entre a ampicilina e as AgNPs, por

exemplo, reage com o DNA, impedindo seu desenovelamento, ocasionado a morte celular. Similarmente, Ping *et al*⁴⁹ obtiveram um efeito antibacteriano sinérgico contra *Escherichia coli* quando amoxicilina foi combinada com as AgNPs. De acordo com Ping *et al*⁴⁹, as AgNPs e a amoxicilina têm mecanismos de ação diferentes. Se a bactéria apresentar resistência à um dos dois agentes antimicrobianos, o outro pode ocasionar a morte bacteriana de forma bastante diferente. Além disso, Ping *et al*⁴⁹ acreditam que o possível efeito sinérgico nesse sistema é devido ao fato das AgNPs servirem como carreadores da amoxicilina.

2. Objetivo

O trabalho aqui descrito teve como objetivo sintetizar nanopartículas de prata (AgNPs) recobertas com sílica mesoporosa (SM) para subsequente funcionalização com antibióticos β -lactâmicos, de forma a obter um sistema com duplo poder de inibição bacteriana, contendo AgNPs e o agente β -lactâmico. O agente β -lactâmico testado durante o desenvolvimento do projeto foi a ampicilina. Além disso, o trabalho teve como foco: (1) analisar a possível ação combinada entre as AgNPs e do antibiótico β -lactâmico contra bactérias suscetíveis à ampicilina (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e (2) investigar uma possível ação bactericida dos sistemas sintetizados contra *Escherichia coli* resistente ao agente β -lactâmico escolhido.

3. Metodologia

3.1. Materiais

Os reagentes utilizados para a obtenção dos nanocompósitos estão listados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Precursores utilizados para a preparação dos nanocompósitos.

Produto	Fórmula	Origem	Pureza (%)	PM (g/mol)
Nitrato de prata	AgNO ₃	Sigma-Aldrich	P.A	169,87
Citrato de trisódio	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Sigma-Aldrich	P.A	258,06
Polivinilpirrolidona	(C ₆ H ₉ NO) _n	Sigma-Aldrich	P.A	40.000,00
Boroidreto de sódio	NaBH ₄	Sigma-Aldrich	P.A	37,83
Etilenoglicol	C ₂ H ₄ (OH) ₂	Synth	P.A.	62,07
Tetraetil ortosilicato	SiC ₈ H ₂₀ O ₄	Sigma-Aldrich	P.A.	208,33
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH	Ecibra	P.A.	35,00
APTES	C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	Sigma-Aldrich	98%	221,37
Ampicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Sigma-Aldrich	96%	349,90
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Synth	P.A.	46,00
MES	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S	Sigma-Aldrich	99%	195,24
NHS	C ₄ H ₅ NO ₃	Sigma-Aldrich	98%	115,09
EDC	C ₈ H ₁₇ N ₃	Sigma-Aldrich	97%	155,24

Todos os reagentes foram utilizados sem prévia purificação. A água utilizada em todos os procedimentos foi obtida do sistema de purificação de água (Purelab da ELGA) cuja medida de resistividade é de 18.2 MΩ cm⁻¹.

3.2. Síntese dos nanocompósitos

As etapas das sínteses dos nanocompósitos estão descritas no esquema apresentado na **Figura 8**.

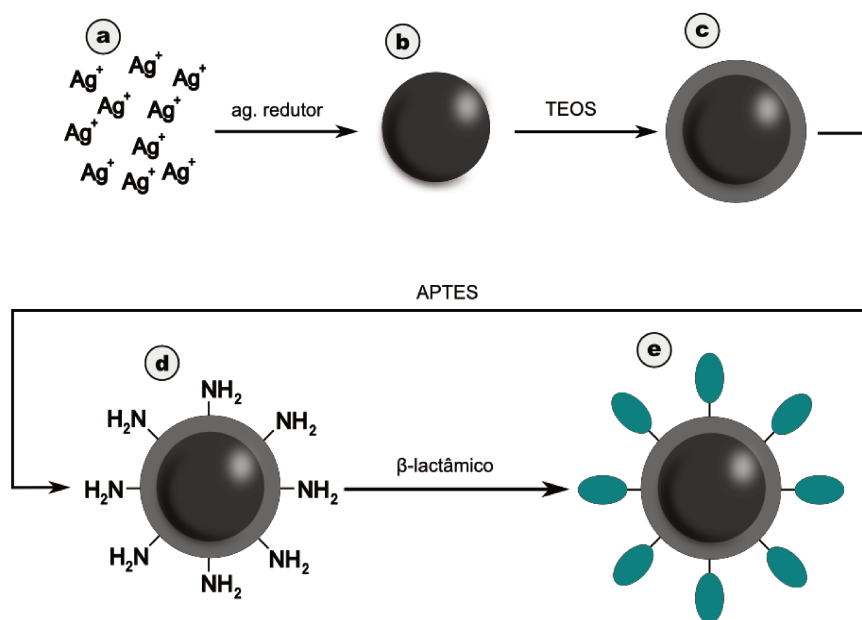


Figura 8: Etapas da síntese para a obtenção de nanopartículas de prata funcionalizadas com agentes β -lactâmicos. As AgNPs (b) foram formadas através da reação de redução do nitrato de prata (a) em presença de um agente redutor (o estabilizante não é apresentado por simplicidade). Em seguida, uma *shell* de SM foi produzida através da hidrólise e condensação do tetraetil ortosilicato (TEOS) na presença de amônia como catalisador. Isso produziu um sistema *core-shell* Ag@SiO₂ conforme apresentado na Figura 8c. Essas nanopartículas foram então revestidas por uma fina camada de sílica funcionalizada (3-aminopropil trietoxisilano – APTES) originando um sistema *core-shell* com grupamentos amino localizados na superfície da nanopartícula (d). Finalmente, as nanopartículas amino-funcionalizadas reagiram com os grupos carboxila da ampicilina através de uma reação de acoplamento ácido-base formando a estrutura esquematizada em (e).

3.2.1. Síntese de nanopartículas de prata em presença de citrato de sódio (AgNP-Cit)

A primeira metodologia utilizada para a obtenção da AgNPs foi através da síntese por redução química descrita por Nezhad e colaboradores.⁵⁰ Brevemente, 0,0102 g de nitrato de prata (AgNO_3) e 0,0141 g de citrato de trisódio (TSC) foram dissolvidos em 200 mL água deionizada, sob agitação vigorosa e em banho de gelo. Em seguida, uma solução aquosa de NaBH_4 (0,1 M) foi adicionada à uma taxa de 10 $\mu\text{L}/30$ s e amostras de 20 mL foram coletadas quando 100, 200, 300, 400, 500, 600 μL de NaBH_4 , respectivamente, foram atingidos. Dessa forma, obtivemos as amostras denominadas A1, A2, A3, A4, A5 e A6 que foram mantidas em total ausência de luz. A concentração de NaBH_4 aumenta de A1 para A6 e, conseqüentemente, aumenta a razão $[\text{NaBH}_4]/[\text{Ag}^+]$, sendo esta igual a 0,17; 0,20; 0,23; 0,27; 0,30 e 0,33, respectivamente.

3.2.2. Síntese de nanopartículas de prata em presença de PVP (AgNPs-PVP)

As AgNPs-PVP foram sintetizadas segundo Graf *et al*⁵¹ e Silvert *et al*.⁵² Inicialmente, 1,5 g de PVP foi completamente dissolvido em 75 mL de etileno glicol (EG), sob agitação magnética, à temperatura ambiente. Em seguida, 0,05 g de AgNO_3 foi adicionado à solução, mantendo a agitação até que esse fosse completamente dissolvido. Então, a solução foi aquecida de 22 °C até 120 °C com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min, mantendo-se nessa temperatura por 1 hora. O sistema reacional foi então resfriado em banho de água, sob agitação magnética, até atingir a temperatura ambiente.

3.2.3. Formação da shell de sílica ao redor das nanopartículas AgNPs-PVP (Ag@SiO₂)

A adição da *shell* de sílica às AgNPs-PVP foi realizada utilizando a técnica de polimerização com semente (do inglês *seeded polymerization*) através da reação sol-gel descrita por Graf e seus colaboradores.⁵¹ As AgNPs-PVP descritas na **Seção 3.2.2** foram centrifugadas com acetona, a 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi redissolvido em 50 mL de etanol. Então, a solução foi novamente centrifugada a 15000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi redissolvido em 20 mL de etanol e novamente centrifugado a 15000 rpm por 15 min. O precipitado foi ressuspensionado em uma solução de amônia (4,2 %[V/V] em etanol) e, imediatamente, uma solução de TEOS (10 %[V/V] em etanol) foi adicionada à mistura sob agitação. A reação foi mantida sob agitação durante a noite, seguida de centrifugação a 8000 rpm por 10 min para eliminar o excesso de TEOS. O precipitado foi lavado três vezes com etanol e posteriormente seco, obtendo-se o compósito Ag@SiO₂.

3.2.4. Obtenção do sistema Ag@SiO₂ funcionalizado com grupamentos amino (Ag@SiO₂-NH₂)

A reação com 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES) foi realizada em duas etapas utilizando o mesmo frasco reacional. Inicialmente, foi realizado o mesmo procedimento de formação da síntese da *shell* conforme descrito na **Seção 3.2.3** e após a agitação durante a noite, 10,5 µL de APTES foi adicionado ao *core-shell*. A reação foi novamente mantida sob agitação durante a noite, seguida de centrifugação a 8000 rpm por 10 min para eliminar

o excesso de TEOS e APTES. O precipitado foi lavado três vezes com etanol e posteriormente seco, obtendo-se o compósito Ag@SiO₂-NH₂.

3.2.5. Obtenção do sistema Ag@SiO₂ funcionalizado com ampicilina (Ag@SiO₂-Ampicilina)

Para a funcionalização dos compósitos com ampicilina, inicialmente foram preparadas soluções de 69,88 mg de ampicilina em 1,1 mL de MES (ácido-2-(N-morfolino) etanosulfônico - 0,1 M, pH 5), de 21,06 mg de NHS (N-hidroxisuccinimida) em 1,6 mL de MES e 153 mg do composto Ag@SiO₂-NH₂ em 7,8 mL de MES. Sob agitação magnética, 56,16 µL de EDC (Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) foi adicionado à solução de NHS, seguida pela adição imediata da solução do antibiótico. A agitação foi mantida por 1 hora e, em seguida, a solução do compósito Ag@SiO₂-NH₂ foi adicionada. A reação foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente durante a noite, seguida de centrifugação a 8000 rpm por 10 min. O precipitado foi lavado três vezes com etanol e posteriormente seco, obtendo-se o compósito Ag@SiO₂-Ampicilina.

3.2.6. Síntese de nanopartículas de sílica (SiO₂)

Para podermos verificar a verdadeira ação bactericida do sistema *core-shell*, nanopartículas de sílica (SiO₂) foram sintetizadas a fim de avaliar as possíveis propriedades bactericidas das mesmas e assim identificar um possível efeito sinérgico entre a prata e a sílica no sistema Ag@SiO₂. Utilizamos o método Stöber⁴⁷ para a síntese dessas nanopartículas, que consiste em reações de hidrólise e condensação de alcóxidos de silício. Dessa forma, 400 µL de TEOS foram misturados com 4,7 mL de etanol P.A. sob

agitação por 5 minutos. Em seguida, 428 μL de NH_4OH foram adicionados e deixados sob agitação durante a noite, a temperatura ambiente. A amostra foi posteriormente centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspenso em etanol, centrifugando e posteriormente seco a temperatura ambiente obtendo as nanopartículas chamadas aqui de SiO_2 .

Da mesma maneira, foram sintetizadas nanopartículas de sílica funcionalizadas com APTES e com Ampicilina. A reação com 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) foi realizada em duas etapas utilizando o mesmo frasco reacional. Inicialmente, foi realizado o mesmo procedimento de formação da síntese das nanopartículas de SiO_2 conforme descrito acima e após a agitação durante a noite, 200 μL de APTES foram adicionados ao sistema. A reação foi novamente mantida sob agitação durante a noite, seguida de centrifugação a 8000 rpm por 10 min para eliminar o excesso de TEOS e APTES. O precipitado foi lavado três vezes com etanol e posteriormente seco, obtendo-se o compósito $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$. O mesmo procedimento descrito na **Seção 3.2.5** foi utilizado para a obtenção das nanopartículas de SiO_2 funcionalizadas com ampicilina ($\text{SiO}_2\text{-Ampicilina}$).

4. Caracterizações

4.1. Espectroscopia UV-Vis

Espectroscopia UV-Vis foi a primeira técnica a ser utilizada após cada etapa da síntese, já que o máximo e a forma dos espectros podem fornecer informações estruturais do sistema. O espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453

foi utilizado para fazer leituras entre 300 e 600 nm, sendo água deionizada utilizada como referência.

4.2. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi utilizada para verificar a forma das nanopartículas bem como para confirmar a formação do sistema *core-shell*. Uma gota da suspensão contendo as nanopartículas foi depositada em uma grade de microscopia de 400 meshes e as amostras foram examinadas utilizando um microscópio FEI Inspect F50 (LNNano).

4.3. Análise termogravimétrica (TGA)

Os perfis de decomposição térmica foram correlacionados com os constituintes do sistema. As amostras foram aquecidas de 20 a 1000 °C sob atmosfera de O₂ a uma taxa de aquecimento de 10 °C por minuto. As amostras foram analisadas no equipamento *Perkin-Elmer Thermogravimetric Analyser Pyris 1 TGA*.

4.4. Adsorção/dessorção de nitrogênio

A estrutura mesoporosa das nanopartículas que continham sílica foi investigada através da técnica de adsorção/dessorção de nitrogênio. As amostras foram previamente degasadas (10⁻² mbar) a 110 °C por 24 h e as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio foram medidas a -196 °C em um equipamento Autosorb[®]-1. As áreas superficial específicas (S_{BET}) foram determinadas pela equação de Brunauer-Emmett-Teller (método BET) na faixa de $P/P^0 = 0,07$ a 0,30.

4.5. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

As medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulo (SAXS) foram realizadas na linha D1B-SAXS1 no LNLS para determinar tamanho, forma, polidispersão das nanopartículas e estado de agregação das nanopartículas. O feixe de raios X com comprimento de onda (λ) de 1.488 Å foi utilizado e todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente. A imagem bidimensional da amostra corrigida foi subtraída da imagem bidimensional corrigida da água pura ou etanol absoluto, dependendo do solvente no qual as partículas estavam dispersas. Uma integração radial da imagem foi aplicada para o padrão de espalhamento isotrópico da amostra resultando no gráfico $I(q)$ x q onde $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$, na faixa de 0,1 a 2 nm⁻¹, onde 2θ = ângulo de espalhamento. Então, os perfis $I(q)$ x q foram fitados utilizando diferentes fatores de forma com o auxílio do software SASfit.

4.6. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho das amostras sintetizadas foi obtido na faixa de 4000 a 550 cm⁻¹ utilizando o espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum One. Os espectros são médias de duas medidas independentes com 32 scans cada com resolução de 4 cm⁻¹. Para a análise dos nanocompósitos foram preparadas pastilhas de aproximadamente 1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro contendo ~ 10% da amostra e ~ 90% de KBr previamente seco.

4.7. Potencial zeta

A carga da superfície das nanopartículas foi determinada através das medidas do potencial zeta que indicam a eficiência da funcionalização da superfície das nanopartículas. A determinação do potencial zeta das amostras foi realizada utilizando o equipamento Malvern Zetasizer – Nano ZS90. Para realizar as medidas, cerca de 750 µL das suspensões foram colocadas na *Dip cell* de poliestireno e as medidas foram realizadas em triplicata.

5. Ensaios biológicos

Os testes bacteriológicos foram realizados com as bactérias *Escherichia coli* (DH5α) e *Escherichia coli* (DH5α) resistente à ampicilina (Gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Ambas as *E. coli* foram fornecidas pela Prof. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar). O meio de cultura utilizado para preparação do pré-inóculo de *E. coli* e *S. aureus* e das placas sólidas foi Luria-Bertani (LB), composto por 10 g de peptona, 10 g de NaCl, 5 g de extrato de levedura e 18 g de ágar bacteriológico, este último responsável pela solidificação. Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo utilizando 5 mL de meio LB (sem ágar bacteriológico) e uma pequena quantidade de bactéria obtida por repique de placas com cultura das células de interesse, os quais foram colocados em *shaker* a 200 rpm e a 37 °C por cerca de 5 h. Posteriormente foram feitas 2 diluições (em meio LB) do pré-inóculo, na proporção de 50 mL de meio LB para 5 µL do pré-inóculo (diluição 1) enquanto que a segunda diluição foi feita na proporção de 40 mL de meio LB para 10 mL da diluição 1 (diluição 2). Os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando como fator de normalização e comparação a concentração

de prata. Em seguida, foram encubadas 50 μL bactérias provenientes da diluição 2, com 1 mL de meio LB e 700 μL de solução aquosa das amostras nas concentrações desejadas. Os tubos foram agitados em um *shaker* a 200 rpm e a 37 °C por cerca de 5 h.

Para o plaqueamento das bactérias, 10 μL do material encubado foi diluído em 1 mL de meio LB e 100 μL dessa diluição foi aplicada uniformemente nas placas com meio LB-ágar. O processo de plaqueamento foi realizado em triplicata (1 placa por tubo), as placas foram mantidas em estufa a 37 °C durante a noite e as colônias foram individualmente contadas.

6. Resultados e discussão

6.1. Síntese de nanopartículas de prata (AgNPs)

Nesse trabalho, duas metodologias foram utilizadas para a obtenção das AgNPs. Primeiramente a metodologia de redução química por boroidreto de sódio (NaBH_4) foi utilizada, sendo o citrato de sódio usado como agente protetor, obtendo como produto as AgNPs-Cit. A outra metodologia adotada para a síntese das nanopartículas de prata foi através do método do poliol, onde PVP foi utilizado como agente protetor e etileno glicol como agente redutor, originando as AgNPs-PVP.

6.1.1. Síntese de nanopartículas de prata em presença de citrato de sódio (AgNPs-Cit)

A primeira metodologia utilizada para a obtenção das AgNPs foi através da síntese por redução química descrita por Nezhad e colaboradores,⁵⁰ que

consiste na redução química do AgNO_3 por boroidreto de sódio (NaBH_4), sendo o citrato de sódio utilizado como agente protetor.

A espectroscopia UV-Vis foi a primeira técnica de caracterização empregada para verificar a formação das AgNPs-Cit. As soluções foram arbitrariamente diluídas de forma que a máxima intensidade de absorção fosse igual a 1, uma vez que as amostras eram excessivamente concentradas para serem analisadas no espectrômetro. Como descrito no procedimento experimental (**Seção 3.2.1**), a síntese com citrato de sódio originou 6 amostras, devido à adição gradual de NaBH_4 . Dessa forma, a **Tabela 2** mostra o valor do fator de diluição (fd), definido por $fd = \frac{\text{volume de água usada para a diluição do sistema}}{\text{volume de solução AgNPs}}$ e indica a concentração total de AgNPs-Cit em cada amostra. De acordo com dados da literatura, o aumento da quantidade de NaBH_4 leva a um aumento do máximo de absorbância.⁵³ Consequentemente, maiores valores de fd estão relacionados às soluções mais concentradas.

A **Figura 9A** apresenta os espectros de absorção UV-Vis para todas as nanopartículas de prata sintetizadas em presença de citrato de sódio após a diluição das amostras.

Tabela 2: Fator de diluição (fd) empregado para a diluição das amostras, posição do máximo de absorção (λ), raio das partículas (R), desvio padrão do raio (σ) e intensidade de espalhamento extrapolado para ângulo zero (I_0) obtida através das medidas de SAXS.

Amostra	fd	λ (nm)	R (nm) ^a	σ ^a	I_0 (cm ⁻¹)
A1	0,86	391	2,3 ± 0,2	0,47	0,86
A2	2,40	391	2,9 ± 0,1	0,42	1,10
A3	4,45	392	3,4 ± 0,1	0,27	1,29
A4	6,00	392	3,4 ± 0,2	0,28	1,54
A5	7,07	393	3,5 ± 0,1	0,28	1,70
A6	7,46	393	3,5 ± 0,1	0,29	1,73

^a Valores obtidos do SASfit

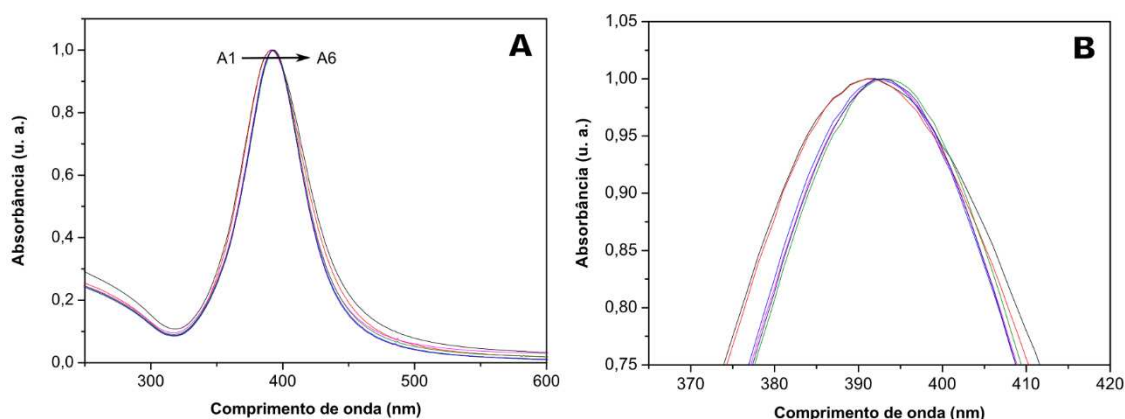


Figura 9: (A) Espectro de absorção UV-Vis das AgNPs-Cit. Amostra A1 até A6 são observadas da esquerda para a direita como indicado pela flecha. (B) Ampliação da região de máxima absorção de todos os espectros apresentados em (A).

A **Figura 9A** mostra que o comprimento de onda (λ) do máximo de absorção para todas as nanopartículas está localizado em ~390 nm, o que é um indicativo da formação das AgNPs-Cit.²⁵ Como pode ser observado, todas as amostras apresentam espectros que são razoavelmente simétricos. De acordo com a teoria de Mie, as propriedades ópticas das nanopartículas metálicas são dominadas pela ressonância plasmônica superficial localizada (LSPR) e o

número de bandas de LSPR dependem da forma da partícula.²⁵ Para nanopartículas metálicas esféricas, uma única banda LSPR é esperada no espectro de absorção, enquanto que partículas não-esféricas podem originar duas ou mais bandas.^{25, 54}

Devido à significativa sobreposição dos espectros na **Figura 9A**, uma ampliação da região do máximo de absorbância é apresentada na **Figura 9B**. As amostras A1 e A2 apresentam λ localizado em 391 nm, enquanto que as demais amostras estão levemente deslocadas para 392-393 nm. A concentração de NaBH_4 aumenta de A1 para A6 e, conseqüentemente, aumenta a razão $[\text{NaBH}_4]/[\text{Ag}^+]$, sendo esta igual a 0,17; 0,20; 0,23; 0,27; 0,30 e 0,33, respectivamente. Os valores de λ são apresentados na **Tabela 2**, onde podemos observar uma sutil tendência do aumento do valor de λ , conforme a razão $[\text{NaBH}_4]/[\text{Ag}^+]$ é aumentada. O deslocamento para maiores comprimentos de onda pode estar relacionado ao aumento de tamanho da partícula.⁵⁵

Para confirmar os resultados referentes a forma e tamanho obtidos por UV-Vis, medidas de SAXS foram realizadas. A **Figura 10** mostra as curvas experimentais para as soluções das amostras sintetizadas e seus ajustes correspondentes.

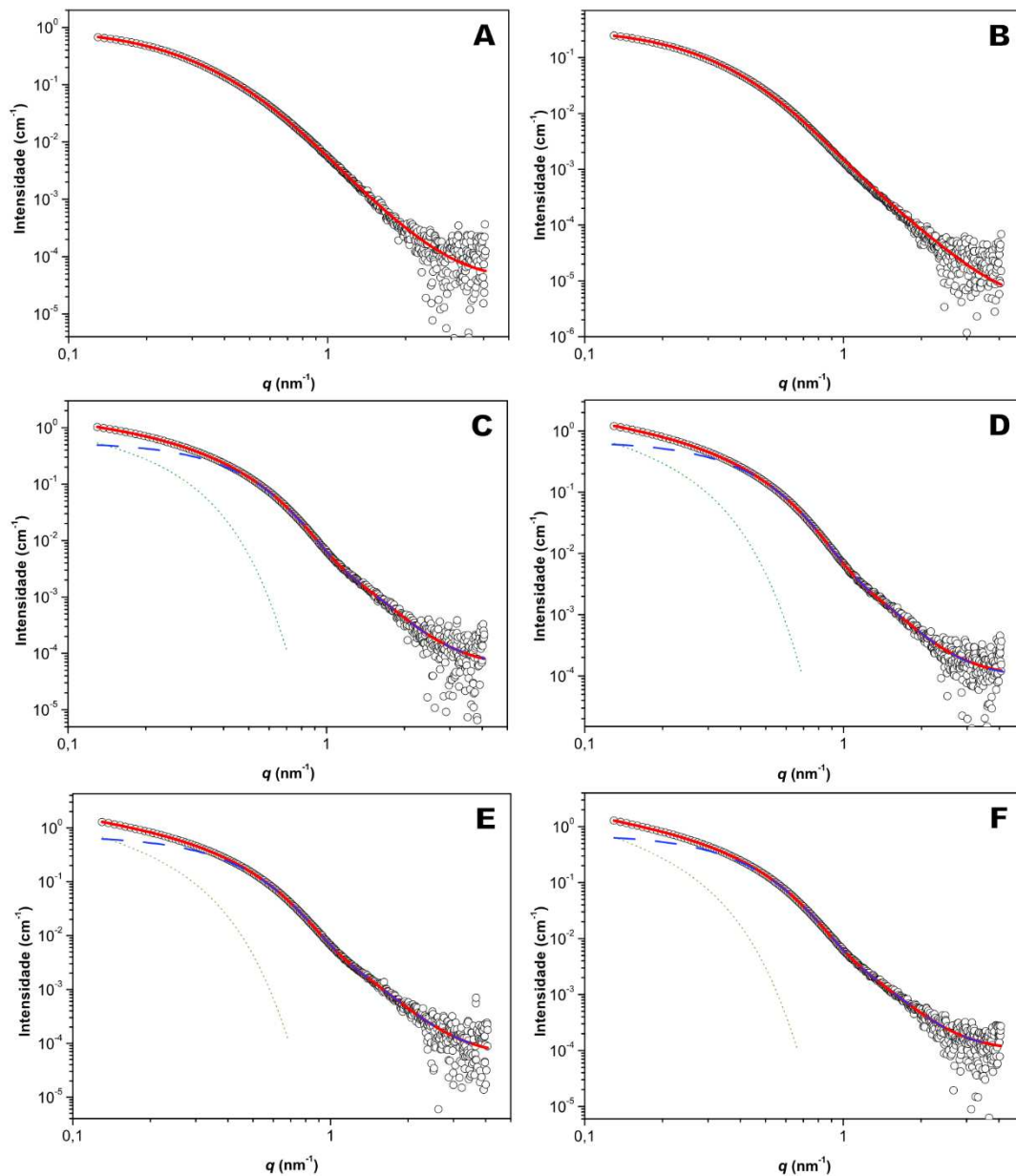


Figura 10: Curvas de espalhamento de SAXS para as amostras de AgNPs-Cit sintetizadas e seus ajustes correspondentes (linha sólida). (A) A1, (B) A2, (C) A3, (D) A4, (E) A5 e (F) A6.

As amostras A1 e A2 (**Figuras 10A e 10B**, respectivamente) têm perfis de espalhamento descritos por um fator forma de esfera polidispersa como descrito nas **Equações 1 e 2**:

$$I(q) = N V^2 (\Delta\rho)^2 \left(\frac{3[\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3} \right)^2 \quad (\text{Equação 1})$$

onde N é o número de partículas por unidade de volume, V é o volume da partícula, R é o raio da partícula e $\Delta\rho$ é a diferença de contraste entre as partículas e o solvente. O fator forma foi associado com uma distribuição log-normal que está descrita matematicamente na **Equação 2**:

$$f(\mu, \sigma) = \frac{1}{R\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\ln R - \mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{Equação 2})$$

onde μ e σ são a média e o desvio padrão da distribuição log-normal, respectivamente.

Ambos os perfis de espalhamento (amostras A1 e A2) podem ser divididos em três partes distintas, destacando características estruturais das amostras.^{56, 57} Na região de baixo- q ($q < 0,3 \text{ nm}^{-1}$), um ombro típico da região de Guinier é observado. Essa região é importante para determinar o raio da partícula. Na região intermediária de q ($q \sim 1,0 \text{ nm}^{-1}$), uma oscilação sutil é observada e também está relacionada com o tamanho das AgNPs assim como com seu grau de polidispersão. Finalmente, a região de alto- q ($q > 1,1 \text{ nm}^{-1}$) corresponde ao decaimento exponencial q^{-4} , que está associado à superfície lisa das AgNPs-Cit, seguido pelo *background*. O raio médio obtido nos ajustes para as amostras A1 e A2 são, respectivamente, 2,3 e 2,9 nm conforme apresentado na **Tabela 2**.

Embora essa aproximação convencional também possa ser utilizada para as amostras A3-A6, foram encontrados desvios significativos na região de baixo- q que impossibilitaram os ajustes utilizando exclusivamente o fator

forma de esfera.^{58, 59} Esses desvios podem ser atribuídos ao estado de agregação das nanopartículas ou à presença de estruturas maiores. A presença dessas estruturas maiores foi descartada uma vez que o conceito de fractal usado para ajustar os dados de SAXS (**Equação 2**) não está relacionada à uma curva de distribuição bimodal. Dessa forma, para ajustar todas as demais curvas de espalhamento, um regime de lei de potência (q^P) foi introduzido na região de baixo- q para extrair as informações estruturais sobre os agregados. O conceito de *cut-off* descrito por Beaucage^{60, 61} foi utilizado devido às correlações entre as AgNPs-Cit elementares e seus agregados. Finalmente, a equação usada para ajustar os dados é:

$$I(q) = N V^2 (\Delta\rho)^2 [B q^P \exp\left(\frac{-q^2 D^2}{3}\right) + \left(\frac{3[\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3}\right)^2] \quad (\text{Equação 3})$$

onde B é o fator de escala específico para o tipo de lei de potência, P é definido de acordo com o regime no qual da lei de potência decai, e D é a dimensão do *cut-off*. Dessa forma, as curvas de espalhamento apresentadas nas **Figuras 10C-F** podem ser divididas em duas partes distintas: (a) região de baixo- q onde as curvas de espalhamento decaem seguindo um regime de lei de potência (linha pontilhada) e (b) região intermediária e de alto- q onde o fator forma de esfera foi utilizado (linha tracejada).

Pode-se observar que a região de baixo- q , o fator de escala B é reduzido de 0,16 (amostra A3) para 0,08 (amostra A6) conforme a quantidade de NaBH_4 é aumentada no sistema. Isso é provavelmente um indício de que a quantidade geral de agregados permanece quase constante ao longo da reação já que o espalhamento relacionado ao fator de forma esférica é aumentado com a adição do agente redutor e a contribuição total do espalhamento dos

agregados diminui (B) devido à formação e ao aumento de tamanho das AgNPs-Cit. O expoente P não varia ao longo do processo da reação. As amostras A3-A6 apresentaram valores de $P \sim 1$, o que sugere que o processo de agregação ocorre preferencialmente ao longo de um eixo de simetria, uma vez que $P=1$ está relacionado com estruturas alongadas, resultando em AgNPs-Cit auto-organizadas como estruturas tipo “corrente”. Dois parâmetros de *cut-off* (D) foram testados. Inicialmente, o raio das partículas foi utilizado como D e os ajustes com o menor valor de *chi-square* foram obtidos. Um exemplo de ajuste onde D = raio da partícula está apresentado na **Figura A1** do **Anexo 10.1**. É possível notar que o modelo não é capaz de ajustar a região de sutil oscilação em $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$, como indicado pela flecha. Posteriormente, o diâmetro das partículas foi utilizado como D e melhores ajustes foram obtidos (**Figuras 10C-F**) quando comparados ao apresentado na **Figura A1**. Usando D = diâmetro da partícula, é possível ajustar completamente a região de $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$ e, conseqüentemente, o valor de *chi-square* foi reduzido. Os gráficos de *chi-square* determinados para os diferentes raios das partículas de AgNPs-Cit obtidos durante o procedimento de ajuste da curva de SAXS, estão apresentados na **Figura A2** do **Anexo 10.2**.

As regiões intermediárias e de alto- q nas **Figuras 10C-F** são atribuídas à contribuição do fator forma esférica, semelhante aos apresentados nas **Figuras 10A e 10B**. Embora um ombro na região de Guinier não tenha sido visto para as amostras A3-A6, a oscilação em $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$ permite determinar o tamanho médio e a polidispersão das AgNPs-Cit. As amostras A3 e A4 apresentam raio de 3,4 nm enquanto que as amostras A5 e A6, têm raio médio de 3,5 nm.

A **Figura 11** apresenta as distribuições log-normal das partículas para cada uma das amostras que foram obtidas através dos ajustes dos dados de SAXS. Deve-se ressaltar que para as amostras A3-A6, a região da lei de potência (baixo q) não foi levada em consideração na obtenção do tamanho das partículas.

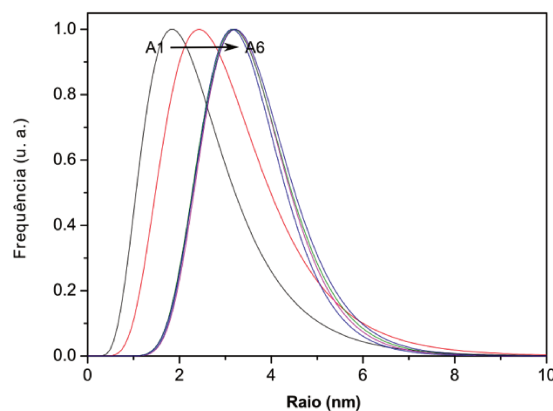


Figura 11: Distribuição de tamanho das partículas de todas as AgNPs-Cit obtidas através dos ajustes apresentados na **Figura 10**.

Como esperado, a amostra A1 apresenta o menor tamanho médio e, conseqüentemente, sua distribuição de tamanho se encontra na região à esquerda da **Figura 11**. Uma vez que a concentração de NaBH_4 começa a aumentar, o tamanho médio das AgNPs-Cit é deslocado para maiores valores de raio. Dessa forma, a amostra A2 apresenta sua distribuição deslocada para maiores valores comparada à amostra A1. Por outro lado, as amostras A3-A6 demonstraram uma sobreposição razoável entre suas distribuições de tamanho. O valor máximo da distribuição de raios é muito similar para as amostras A3-A6 e as diferenças no raio médio é observada pela sutil diferença na largura das distribuições.

Na **Figura 12**, intensidade de espalhamento extrapolado para ângulo zero (I_0) obtido através dos dados de SAXS e o fator de diluição (fd) obtido das medidas de UV-Vis foram plotados contra a concentração de NaBH_4 . Sabe-se que I_0 está relacionado ao número de partículas em solução (concentração), ao tamanho e à polidispersão das nanopartículas (**Equação 1**). Além disso, a intensidade máxima de absorvância está relacionada à concentração da solução. Consequentemente, maiores valores de I_0 e fd estão relacionados a soluções mais concentradas.

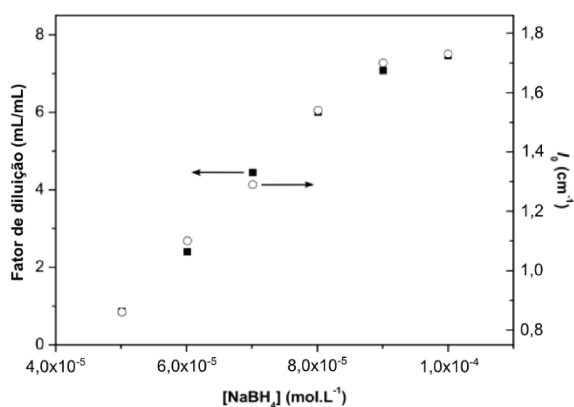


Figura 12: Intensidade de espalhamento extrapolada para ângulo zero (I_0) obtido através dos dados de SAXS e fator de diluição (fd) obtido através das medidas de UV-Vis em função da concentração da concentração de NaBH_4 . A amostra A1 corresponde ao ponto da esquerda no gráfico, a amostra A6 é o ponto à direita da figura e as amostras A2 a A5 são respectivamente plotadas entre as amostras A1 e A6.

Podemos notar que I_0 e fd aumentam praticamente linearmente com o aumento da concentração do agente redutor para as quatro soluções de NaBH_4 menos concentradas. Por outro lado, um desvio sutil da linearidade pode ser visto a partir da amostra A5 ($[\text{NaBH}_4] = 9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em diante, o que pode indicar que a concentração das AgNPs-Cit começa a se tornar constante e não

se nota mais a formação de nanopartículas. Há uma correlação entre ambas as abordagens uma vez que observamos uma sobreposição significativa entre elas. No entanto, nem as variações no I_0 ou no fator de diluição são capazes de inferir precisamente a respeito da possível formação de agregados. Embora o I_0 seja quantitativamente utilizado nos experimentos de SAXS, provavelmente não é sensível o suficiente para identificar uma amostra parcialmente agregada. Similarmente, os valores de fd associados ao deslocamento sutil na posição máxima do espectro de UV-Vis não são conclusivas para confirmar a formação de agregados. Por outro lado, a modelagem dos dados de SAXS apresentados na **Figura 10** aponta diferenças significativas quando as amostras sintetizadas são comparadas. As amostras A1 e A2 (obtidas com $[\text{NaBH}_4] = 5 \times 10^{-5}$ e $6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente) foram fitadas usando somente o fator de forma esférica enquanto que um ajuste mais complexo foi utilizado para fitar as amostras A3-A6.

Embora vários trabalhos tenham sido dedicados ao estudo da evolução estrutural de nanopartículas (crescimento e agregação),^{58, 62, 63} não existem relatos que correlacionem essa evolução estrutural com a carga total do sistema. Sabe-se que a estabilização eletrostática, descrita pela teoria DLVO (Derjaguin e Landau, Verwey e Overbeek), é fortemente correlacionada com o mecanismo de formação das NPs.^{64, 65} Entretanto, a estabilidade total de um dado sistema é definido por sua carga superficial, que é baseado na tendência de agregação e na possível redispersibilidade das NPs.³⁶ Considerando que a densidade de carga superficial não é diretamente medida, um termo relativo, chamado potencial zeta (ζ), pode ser obtido.⁶⁶ ζ é definido como o potencial no plano de cisalhamento da partícula, onde a velocidade relativa entre o líquido e a partícula é zero. Isso está relacionado à carga da superfície da

partícula e a natureza da composição do meio dispersante (pH, condutividade). Medidas de potencial zeta foram obtidas de forma que fosse possível correlacionar as informações de potencial elétrico com evidências estruturais obtidas por SAXS. A **Figura 13** mostra o potencial zeta para todas as amostras.

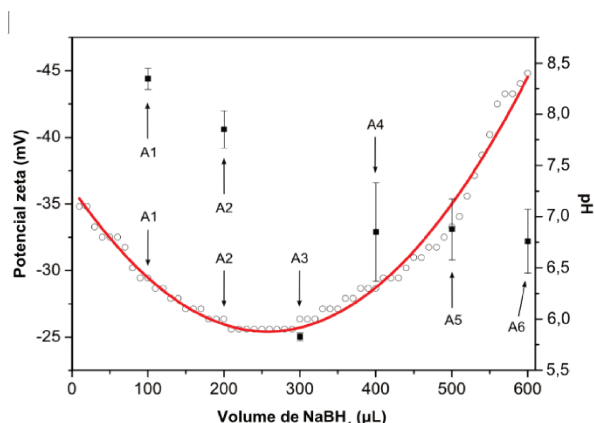


Figura 13: Variação de potencial zeta (quadrados pretos) e pH (círculos brancos) em função da concentração de NaBH₄. A linha vermelha indica o ajuste parabólico para os valores de pH conforme a concentração de NaBH₄ aumenta. Ambos os valores de potencial zeta e pH para as amostras A1 a A6 são observadas da esquerda para a direita, indicado pelas flechas.

As amostras A1 e A2 apresentam potencial de $-44,4 \pm 0,8$ e $-40,6 \pm 1,4$ mV, respectivamente. Quando o volume de NaBH₄ é aumentado e a amostra A3 é obtida, um significativo aumento no valor de ζ pode ser observado ($-25,1 \pm 0,3$ mV). Com a adição do agente redutor, é possível observar que os valores de potencial zeta são reduzidos e mantidos praticamente constantes em torno de -32,5 mV para as amostras A4, A5 e A6. Resultados similares foram obtidos por Zhang *et al*⁶⁷ para potenciais zeta de suspensões de AuNPs estabilizadas com citrato na faixa de pH de 5-10. Para serem consideradas estáveis, as soluções devem ter potencial zeta acima de +30 mV ou abaixo de

-30 mV.⁶⁸ Isso sugere que a amostra A3 não está dentro da faixa de estabilidade ótima quando ζ é levado em consideração.

Além disso, sabe-se que o valor do pH tem influência no potencial zeta, uma vez que afeta diretamente a ionização e a adsorção de íons na superfície da partícula.⁶⁴ Para as amostras preparadas nessa etapa do trabalho, a superfície de carga negativa depende do grau de ionização dos grupos -COOH do citrato (usados como agente protetor), da adsorção de íons borato (BH_4^-) e de contra-íons na dupla camada difusa.^{65, 69} A variação do pH durante o procedimento de síntese foi simultaneamente medido enquanto NaBH_4 era adicionado à solução. A **Figura 13** também mostra a variação do pH como função da adição de NaBH_4 durante o processo de síntese. Os dados de pH apresentam forma parabólica onde o mínimo foi encontrado através do ajuste e corresponde a 257 μL de NaBH_4 .

Embora não seja possível inferir a respeito da natureza exata relacionada às mudanças vistas na **Figura 13**, podemos sugerir que essa diminuição da estabilidade está provavelmente associada às mudanças na superfície das AgNPs-Cit. Nesse sistema, as AgNPs-Cit apresentam carga negativa que provavelmente estão relacionadas à adsorção de íons citrato e borato na superfície das NPs. Sabe-se que cátions podem interagir e entrar na camada difusa iônica em torno das nanopartículas como contra-íons, através de forças eletrostáticas atrativas.⁶⁹ Isso pode claramente mudar a força iônica da solução e resultar em mudanças como as observadas na **Figura 13**. O aumento da força iônica pode reduzir a espessura da dupla camada elétrica, podendo induzir a interação partícula-partícula, aumentando o nível de agregação.⁶⁶ Dessa forma, podemos sugerir que o aumento na concentração de NaBH_4 (da amostra A1 a A3) induz a remoção parcial do citrato fracamente

associado à superfície das AgNPs-Cit enquanto a força iônica da solução é aumentada. Isso explicaria a formação dos pequenos agregados vistos por SAXS. Em paralelo, podemos verificar que o ponto exato da formação dessas espécies maiores está localizado no mínimo da parábola da **Figura 13**. Além disso, esse mínimo está localizado entre as amostras A2 e A3 e pode ser correlacionado com os valores de ζ . Comparando ambas as amostras, a amostra A2 está dentro da faixa de estabilidade do potencial zeta, enquanto que a amostra A3 é considerada uma solução não estável. Isso reforça a modelagem e interpretação dos dados de SAXS, onde alguns agregados podem ser identificados. Podemos verificar que após o mínimo, o pH começa a aumentar novamente, tornando o sistema estável, onde possivelmente não é formado mais nenhum agregado durante o processo de síntese (a quantidade de agregados é mantida constante). As medidas de potencial zeta também sustentam essa hipótese, pois as amostras A4-A6 apresentam valores de ζ em torno do -32,5 mV. Podemos especular que a diminuição e o aumento na instabilidade das AgNPs-Cit (antes e depois do mínimo da parábola) pode estar relacionado às mudanças na razão $\text{BH}_4^-/\text{B(OH)}_4^-$ associada às variações de pH. Sabe-se que NaBH_4 reage lentamente com água e forma íons metaborato fortemente básicos.⁶⁷ Dessa forma, é possível observar que o valor de pH na mistura é aumentada quando NaBH_4 é adicionado após o mínimo da **Figura 13** ser atingido.

Baseado nesses resultados, foi possível propor uma representação esquemática (**Figura 14**) onde o crescimento e agregação parcial das amostras estão enfatizadas.

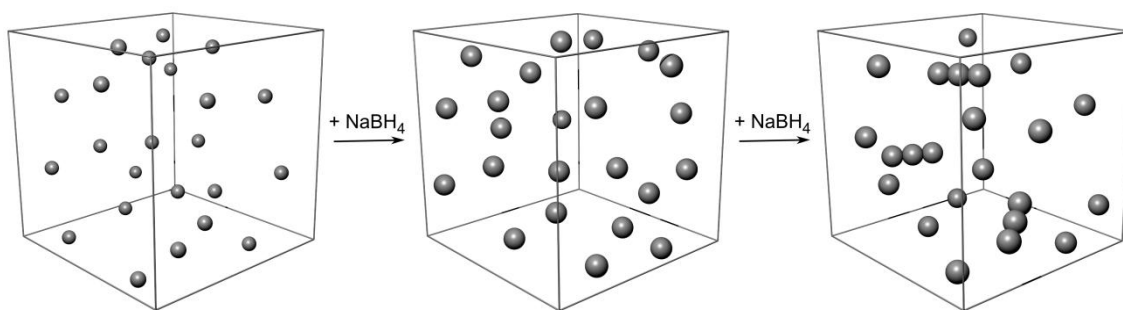


Figura 14: Esquema proposto para o mecanismo de agregação das AgNPs devido ao aumento da razão $[\text{NaBH}_4]/[\text{Ag}^+]$. A primeira caixa (esquerda) mostra a formação de AgNPs com a adição de NaBH_4 . A transição da caixa da esquerda para a central mostra um aumento no tamanho das NPs. Conforme a concentração de NaBH_4 aumenta, a força iônica também aumenta e induz a remoção parcial de citrato fracamente associado à superfície das AgNPs. A caixa da direita indica um sistema onde há coexistência de estruturas não agregadas e do estruturas do tipo “corrente” que são interpretadas como resultado do processo de agregação parcial.

Sabe-se que a adição de NaBH_4 inicialmente causa a redução de Ag^+ e consequentemente a formação de AgNPs (caixa à esquerda na **Figura 14**). Quando a força iônica da solução é aumentada, o aumento na concentração de NaBH_4 (da amostra A1 para A3) pode induzir a remoção parcial do citrato fracamente associado à superfície das AgNPs-Cit. Dessa forma, o tamanho médio das AgNPs é deslocado para maiores valores de raio como apresentado na **Figura 11** (caixa central da **Figura 14**). Além disso, para maiores concentrações de NaBH_4 , a força iônica aumenta e reduz a espessura da dupla camada elétrica. Isso induz a interação partícula-partícula aumentando o nível de agregação.⁶⁶ A agregação das NPs é observada quando desvios sutis são vistos nos padrões de espalhamento das amostras A3 – A6 (caixa da direita na **Figura 14**). Esses desvios em baixo- q nos padrões de espalhamento seguem a tendência de lei de potência com decaimento exponencial q^{-1} . Isso sugere que

o processo de agregação ocorre preferencialmente ao longo de um eixo de simetria, já que o decaimento q^{-1} está relacionado à estruturas alongadas, resultando em AgNPs-Cit possivelmente auto-organizadas como estruturas do tipo “corrente”. Além disso, a amostra A3 está localizada dentro de uma faixa não estável do potencial zeta, reforçando as evidências mostradas pelos dados de SAXS a respeito da formação de alguns agregados.

Também é importante mencionar que após a amostra A6, a adição de agente redutor no meio reacional leva a formação de agregados grandes, multimodais e polidispersos.⁷⁰ Entretanto, isso está fora do escopo do presente trabalho, pois esse tipo de amostra não pode ser utilizada em processos biomédicos e tecnológicos devido à falta de controle de tamanho.

6.1.2. Síntese de nanopartículas de prata em presença de PVP (AgNPs-PVP)

A primeira metodologia utilizada para a obtenção das AgNPs em presença de citrato (descrita acima; **Seção 6.1.1**), não permitiu o recobrimento das nanopartículas com sílica, pois, segundo a literatura, a presença dos íons citrato utilizados como agente protetor pode afetar a estabilidade das AgNPs.⁷¹ Segundo Vanderkooy,⁷¹ é muito provável que o efeito de blindagem dos íons citrato se torne mais dominante do que o efeito estabilizante com o aumento da concentração de NaBH₄. Com isso, a baixa repulsão eletrostática não é suficiente para balancear a atração de Van der Waals entre as AgNPs e, dessa forma, elas tendem a agregação quando em presença do silano e do catalisador.⁷¹ Alternativamente, foram buscadas rotas sintéticas que possibilitassem o recobrimento das AgNPs com sílica. Graf *et al*⁵¹ utilizaram o método do poliol para sintetizar as AgNPs, onde polivinilpirrolidona (PVP) é

empregada como agente protetor. O PVP aumenta a afinidade superficial das AgNPs pela sílica, não sendo necessária a utilização de agentes de acoplamento.⁷¹

A **Figura 15A** mostra uma fotografia da solução AgNPs-PVP sintetizada em presença de PVP, que apresenta a coloração característica da formação de nanopartículas de prata. Ao longo do processo reacional, o surgimento de uma solução de cor amarela é uma indicação da redução dos íons Ag^+ (a partir da solução de nitrato de prata) para Ag^0 . A solução de nitrato de prata e de PVP dissolvidos são incolores e, de acordo com a literatura,⁷² esta mudança de cor é um indicativo da formação das AgNPs.

Assim como para as AgNPs-Cit, a espectroscopia UV-Vis foi a primeira técnica de caracterização empregada para verificar a formação das AgNPs-PVP. A solução foi arbitrariamente diluída de forma que a máxima intensidade de absorção estivesse em torno de 0,7, uma vez que a amostra era excessivamente concentrada para ser analisada no espectrômetro. A **Figura 15B** apresenta o espectro de absorção UV-Vis para as AgNPs-PVP sintetizadas.

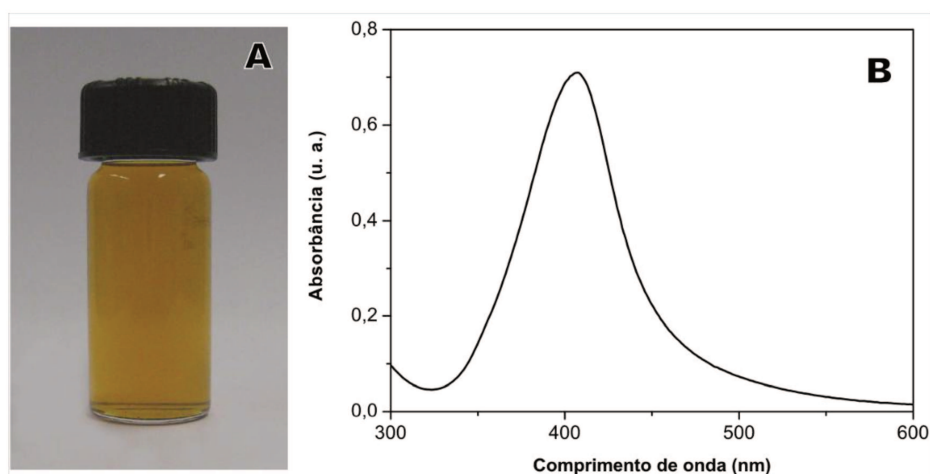


Figura 15: (A) Fotografia das AgNPs-PVP e (B) seu espectro de absorção UV-Vis correspondente.

Como descrito anteriormente, as propriedades ópticas das nanopartículas metálicas são dominadas pela ressonância plasmônica superficial localizada (LSPR).^{25, 54, 73, 74} A posição do máximo de absorção (λ), em 407 nm, está de acordo com os dados da literatura que indicam a formação das AgNPs.²⁵ Para confirmar os resultados referentes a forma e tamanho obtidos por UV-Vis, medidas de SAXS foram realizadas. A **Figura 16A** mostra a curva experimental de SAXS e seu ajuste correspondente enquanto que a **Figura 16B** apresenta a distribuição de tamanho das AgNPs-PVP obtida através do ajuste da curva de SAXS.

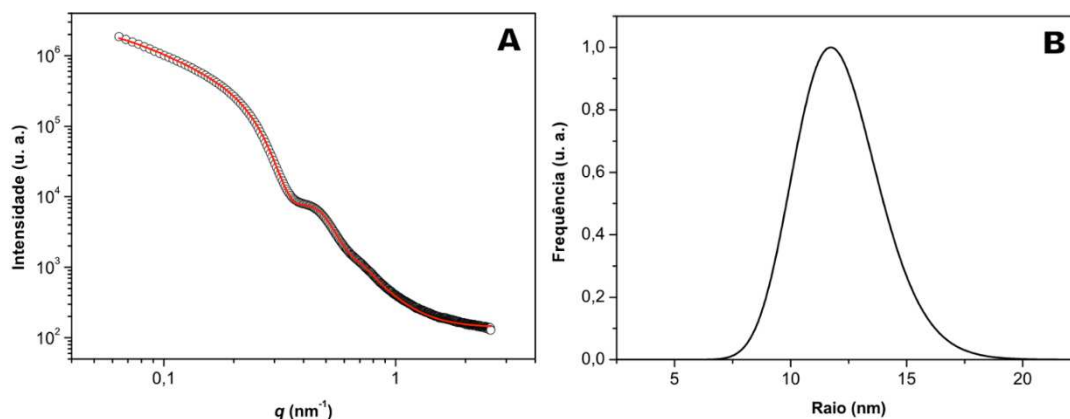


Figura 16: (A) Curva de SAXS para a amostra de AgNPs-PVP e seu ajuste correspondente (linha sólida vermelha). (B) Distribuição de tamanho de partículas de prata obtida a partir do ajuste em vermelho apresentado na **Figura 15A**.

O perfil de espalhamento para as AgNPs-PVP é novamente descrito por um fator forma de esfera polidispersa como descrito nas **Equações 1 e 2**. O perfil de espalhamento das AgNPs-PVP pode ser dividido em três partes distintas, destacando características estruturais das amostras. Na região de baixo- q ($q < 0,2 \text{ nm}^{-1}$), um ombro típico da região de Guinier é observado. Essa região é importante para determinar o raio da partícula. Na região

intermediária de q ($0,15 < q < 0,7 \text{ nm}^{-1}$), uma oscilação é observada e também está relacionada com o tamanho das AgNPs-PVP assim como com seu grau de polidispersão. Finalmente, a região de alto- q ($q > 0,7 \text{ nm}^{-1}$) corresponde ao decaimento exponencial q^{-4} , que está associado à superfície lisa das AgNPs-PVP, seguido pela linha de base. A **Figura 16B** apresenta a distribuição log-normal do raio das AgNPs-PVP obtida a partir do ajuste da curva de SAXS (**Figura 16A**), apresentando raio médio de 12 nm.

6.1.3. Formação da shell de sílica ao redor das nanopartículas AgNPs-PVP (Ag@SiO₂)

O recobrimento da superfície de nanopartículas metálicas com sílica tem sido considerado uma forma eficiente de aumentar a estabilidade química e coloidal das partículas, além de viabilizar posteriores modificações de superfície, aumentando assim a biocompatibilidade desses materiais. Nanoestruturas do tipo *core-shell* também são interessantes do ponto de vista econômico porque pequenas quantidades de um material mais barato pode ser utilizado para recobrir o *core* feito de um material caro.¹⁹

O crescimento da camada de sílica em torno de partículas coloidais baseada no método Stöber *et al*⁴⁷ é geralmente realizada com uma mistura de etanol/amônia.^{19, 51, 75} Entretanto, a aplicação direta desse método para encapsular AgNPs apresenta muitas dificuldades tais como baixa afinidade química da prata com a sílica, rápida oxidação e a alta tendência à agregação das AgNPs.⁵¹ Além disso, geralmente nanopartículas metálicas são instáveis na mistura água-etanol e, portanto, muitas vezes uma modificação prévia da superfície é necessária.

Silvert *et al*⁵² utilizaram o método do poliol para sintetizar as AgNPs, onde polivinilpirrolidona (PVP) é usada como agente protetor. O método do poliol é um método de síntese largamente utilizado para produção de várias nanopartículas metálicas, principalmente em solventes orgânicos. De acordo com a literatura,⁷¹ a interface do PVP é essencial para a formação da *shell* de sílica, já que o PVP apresenta alta afinidade pela sílica, devido à formação de ligação de hidrogênio e à interação eletrostática entre a sílica carregada negativamente e o PVP que possui carga positiva.⁷¹ Além disso, o oxigênio da carbonila da molécula de PVP (**Figura 17**) é um forte receptor de ligação

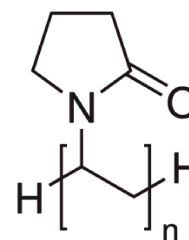


Figura 17: Estrutura básica da molécula de PVP.

de hidrogênio, e portanto interage bem com os grupos silanóis. Assim, a alta densidade dos grupos amida no polímero pode facilitar a substituição no silício, o que explicaria a formação preferencial da sílica na camada de PVP – primeiro sítio de reação. Uma vez que a condensação começa, facilitada pelas amidas do PVP, a sílica formada é estabilizada por ligações de hidrogênio com os grupos amida.⁷¹

A espectroscopia UV-Vis foi a primeira técnica de caracterização empregada para verificar a formação do composto Ag@SiO₂ e a **Figura 18** apresenta o espectro de UV-Vis para as nanopartículas de Ag@SiO₂ sintetizadas. Como explicado anteriormente, a forma e a posição da banda plasmônica das partículas coloidais de prata é dependente do tamanho, da constante dielétrica do meio e das espécies adsorvidas na superfície das partículas. No caso do *core-shell*, a constante dielétrica da prata difere das nanopartículas metálicas originais, uma vez que a sílica está recobrindo-as.

Dessa forma, observamos um máximo de absorção em 415 nm para o compósito Ag@SiO₂ que está deslocado em relação às AgNPs-PVP originais (407 nm), sendo uma primeira evidência do sucesso do recobrimento das AgNPs-PVP.

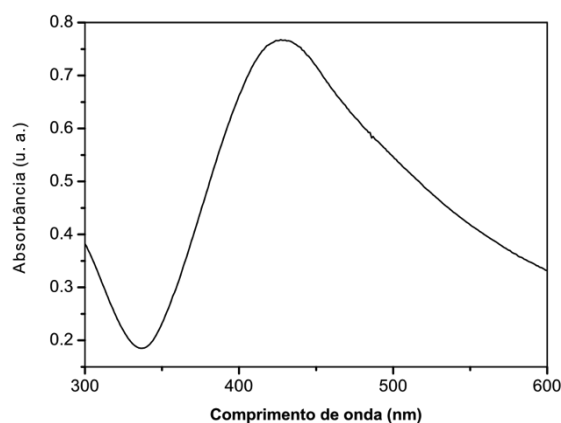


Figura 18: Espectro de absorção UV-Vis do sistema *core-shell*.

A única banda de absorção na **Figura 18** sugere que as nanopartículas sintetizadas apresentam formato esférico. Para confirmar a formação do sistema compósito Ag@SiO₂, análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi realizada. A **Figura 19** mostra a imagem de TEM das nanopartículas sintetizadas.

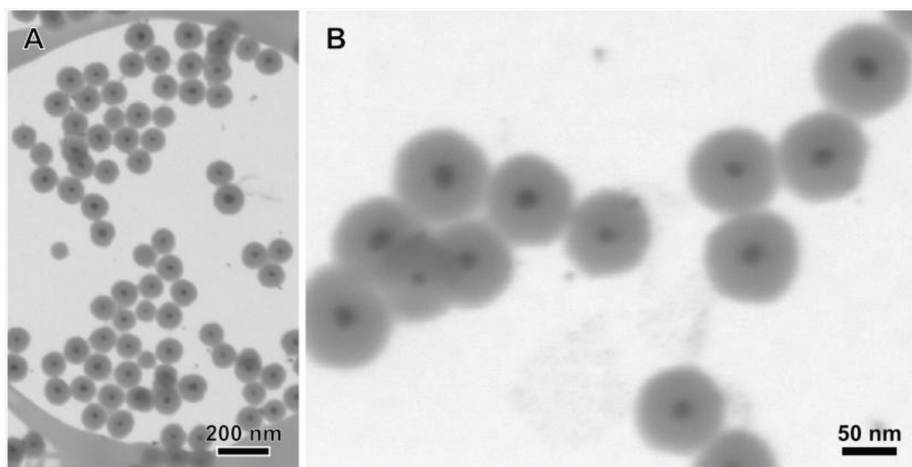


Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão por varredura do sistema Ag@SiO₂.
Imagens obtidas em (A) baixa e (B) alta magnificação.

As imagens de TEM mostram o sucesso no recobrimento das nanopartículas de prata com sílica amorfa. Além disso, é possível verificar que as nanopartículas estão completamente recobertas, formando estruturas esféricas bastante regulares, ocasionando baixa polidispersão. Como a densidade eletrônica do metal é significativamente maior do que a da sílica amorfa, as partes mais escuras estão associadas à prata enquanto que as mais claras correspondem à sílica. O tamanho médio determinado por TEM é aproximadamente de 15 nm para o *core* (raio de aproximadamente 7,5 nm) e uma *shell* de espessura de aproximadamente 39 nm, como mostra a **Figura 20** que apresenta a distribuição de tamanho obtida por TEM, utilizando cerca de 100 imagens para obter tal distribuição. As estruturas têm tamanho médio de aproximadamente 93 nm conforme observado na **Figura 20A**.

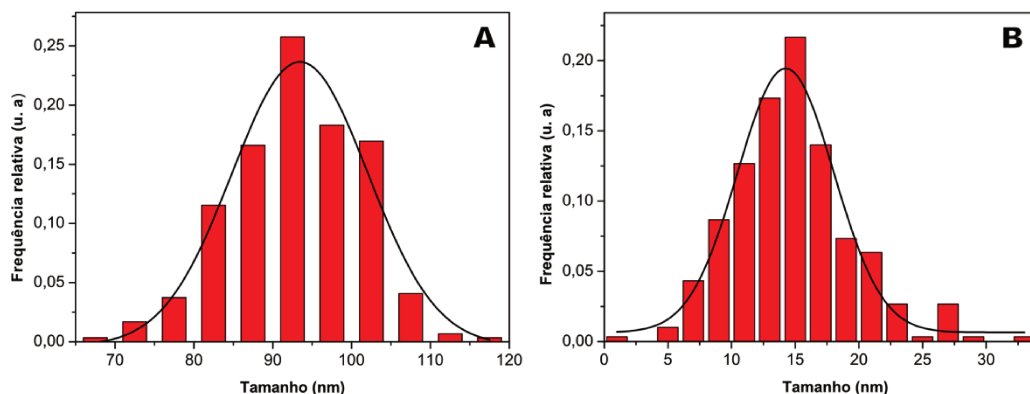


Figura 20: Distribuição de tamanho obtida por microscopia eletrônica de transmissão do sistema Ag@SiO₂. (A) tamanho da partícula Ag@SiO₂ e (B) tamanho do *core* de prata.

Como a microscopia é uma técnica local e requer preparação específica da amostra, a distribuição de tamanhos foi também obtida através de SAXS, técnica que evita a agregação das partículas decorrente da secagem da amostra. A **Figura 21** mostra a curva experimental para a Ag@SiO₂ e seu ajuste correspondente. Os tamanhos do *core* e da *shell* das nanopartículas Ag@SiO₂ foram obtidos a partir dos ajustes da medida de SAXS.

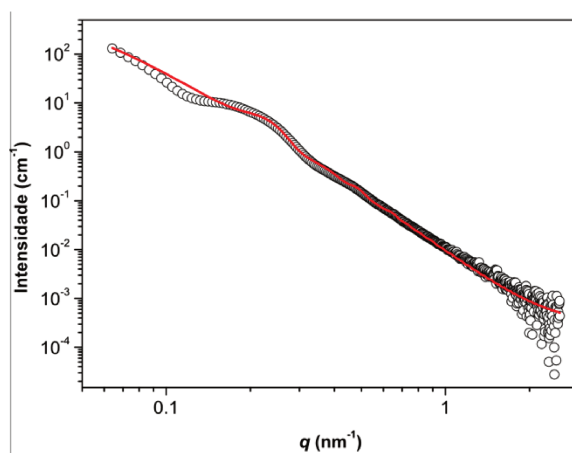


Figura 21: Curva de espalhamento de SAXS para a amostra Ag@SiO₂ e seu ajuste correspondente (linha sólida).

Modelo de *shell* esférica foi utilizada para ajustar a curva de espalhamento da amostra Ag@SiO₂. Para esse sistema, o melhor ajuste foi encontrado utilizando 11 nm para o raio do *core* de prata e espessura da *shell* de sílica de 38 nm. A presença das oscilações na curva de SAXS do sistema Ag@SiO₂ indicam que as esferas apresentam distribuição monomodal e polidispersão ($\sigma = 0.32$) de ~ 32 %. Esse resultado está de acordo com as imagens de TEM, onde observamos o formato esférico regular das nanopartículas *core-shell* sintetizadas.

6.1.4. Síntese das nanopartículas de SiO₂

Para podermos verificar as possíveis propriedades bactericidas das nanopartículas de sílica (SiO₂), as mesmas foram sintetizadas, de forma que possibilitasse identificar um possível efeito combinado entre a prata e a sílica no sistema Ag@SiO₂. Utilizamos o método Stöber⁴⁷ para a síntese dessas nanopartículas, que consiste em reações de hidrólise e condensação de alcóxidos de silício.

A solvólise dos tetraalcóxidos de silício em solvente orgânico, como o etanol, conduz à formação de silanóis, através de polimerização via condensação. Sabe-se que os alcóxidos de silício possuem baixa reatividade, dessa forma catalisadores ácidos ou básicos são adicionados ao processo, o que aumenta a velocidade das reações envolvidas. Os alcóxidos de silício são bastante propensos à reações de hidrólise e formação subsequente de sílica, SiO₂. A **Figura 22** mostra o mecanismo de hidrólise básica do tetraetilortosilicato (TEOS), para formar inicialmente um silanol (molécula contendo Si-OH). Esse mecanismo ocorre em 4 etapas, até que todos os grupos alcóxidos tenham sido substituídos pelo grupo -OH.⁷⁶

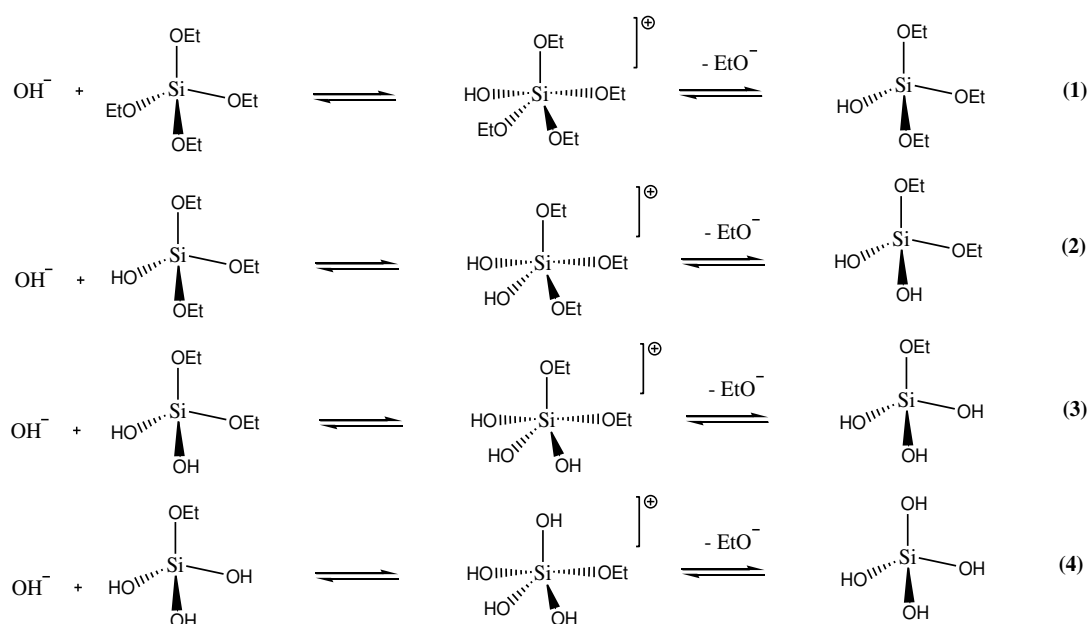


Figura 22: Mecanismo de reação de hidrólise básica, responsável pela formação dos silanóis.⁷⁶

Em seguida, as espécies $\text{Si}(\text{OH})_4$ originadas podem reagir tanto por hidrólise quanto por condensação e, ainda, essas reações podem ocorrer em átomos de silício quimicamente diferentes, uma vez que o átomo do centro do tetraedro é quimicamente distinto dos átomos terminais.⁷⁶ A **Figura 23** mostra o possível mecanismo de condensação de duas moléculas de silanol, formando a estrutura básica que compõe as nanopartículas de SiO_2 .

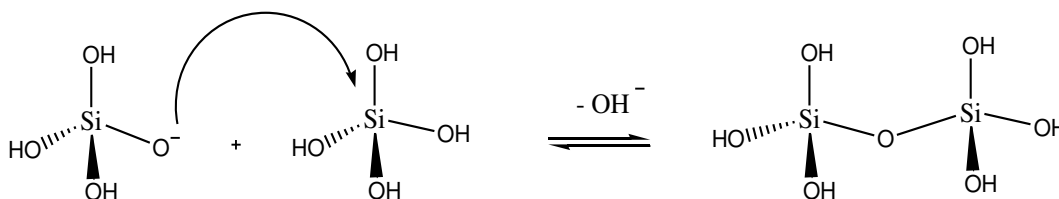


Figura 23: Mecanismo de condensação de duas moléculas de silanol, formando a estrutura básica que compõe as nanopartículas de SiO_2 .⁷⁶

A **Figura 24** apresenta a microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de SiO_2 . Podemos observar a formação de nanoesferas com tamanhos em torno de 100 nm.

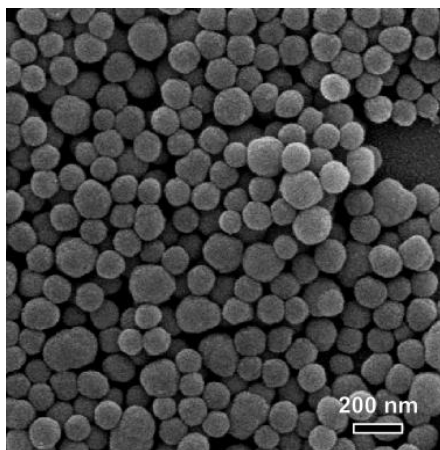


Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de SiO_2 .

Para confirmar os resultados referentes a forma e tamanho obtidos por MEV, medidas de SAXS foram realizadas. A **Figura 25** mostra a curva experimental para a solução contendo nanopartículas de sílica e seu ajuste correspondente.

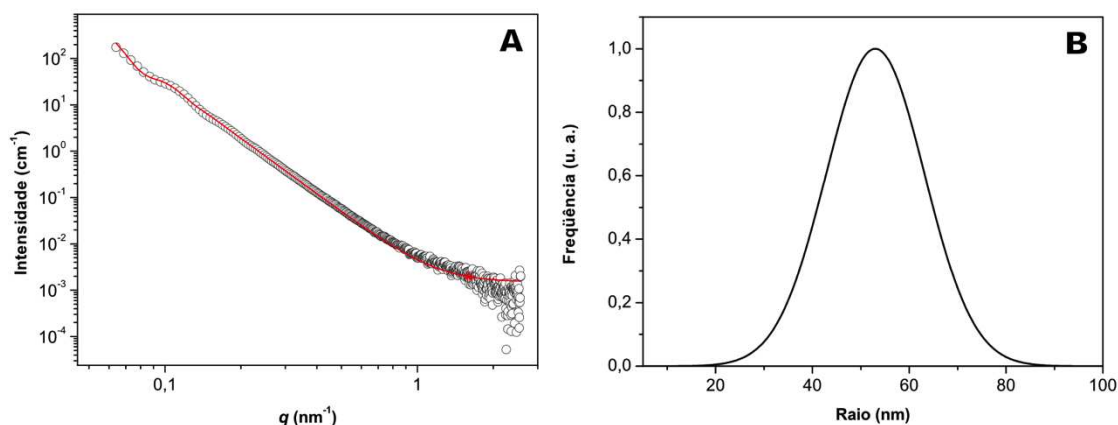


Figura 25: (A) Curva de SAXS para a amostra de nanopartículas de sílica e seu ajuste correspondente (linha sólida vermelha). (B) Distribuição de tamanho de partículas de sílica obtida a partir do ajuste em vermelho apresentado na **Figura 25A**.

O perfil de espalhamento das nanopartículas de sílica apresentaram duas regiões estruturais distintas. Na região de baixo- q ($q > 0,1 \text{ nm}^{-1}$), a curva descreve a organização do sistema quanto à estrutura do material, já que a região de Guinier não é observada. No entanto, a oscilação observada na curva está relacionada ao tamanho das nanopartículas, assim como com seu grau de polidispersão.⁷⁷ Em seguida, a região de médio/alto- q ($q > 0,5 \text{ nm}^{-1}$) corresponde ao decaimento exponencial q^{-4} , que está associado à superfície lisa das SiO₂, seguido pelo *background*. O tamanho médio obtido através do ajuste é 106 nm, conforme mostrado na **Figura 25B**.

6.1.5. Obtenção dos sistemas funcionalizados com ampicilina

Tanto as nanopartículas Ag@SiO₂ quanto as SiO₂ foram funcionalizadas com o grupamento amino (-NH₂) para posterior reação deste grupo com o grupo carboxila (-COOH) da ampicilina, conforme esquema apresentado na **Figura 26**.

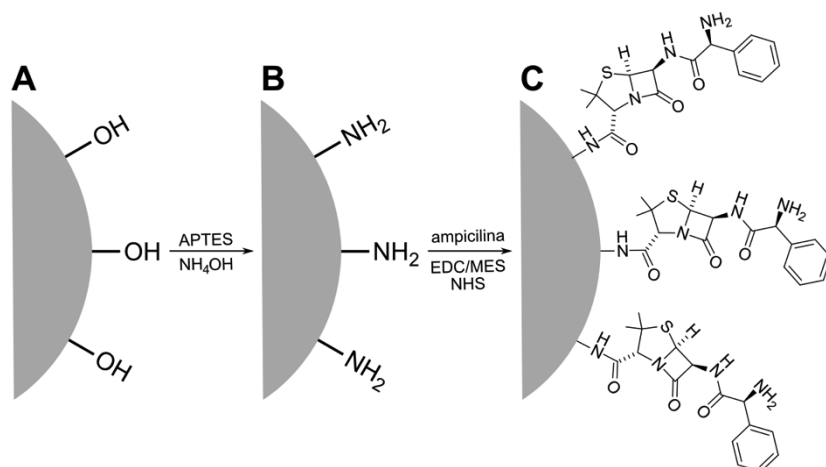


Figura 26: Etapas da síntese para a obtenção de nanopartículas funcionalizadas com agentes β -lactâmicos. Primeiramente, o sistema (A) é revestido por uma fina camada de sílica funcionalizada (3-aminopropil trietoxissilano – APTES) originando nanopartículas com grupamentos amino localizados na superfície (B). As nanopartículas amino-funcionalizadas reagem com os grupos carboxila da ampicilina através de uma reação de acoplamento ácido-base formando a estrutura Ag@SiO_2 -Ampicilina esquematizada em (C). Esse esquema é meramente ilustrativo e não está na proporção de tamanho real do sistema.

A reação dos grupos amino das nanopartículas com o ácido carboxílico da ampicilina se dá através de acoplamento ácido-base que ocorre seguindo os mecanismos apresentados nas **Figuras 27, 28 e 29**. A primeira etapa da reação de acoplamento (**Figura 27**), envolve a protonação da carbodiimida (EDC), em pH levemente ácido (pH 5,5), originando o carbocátion representado em **1**, que é hidrolisado, formando um derivado de uréia, representado em **2**:⁷⁸

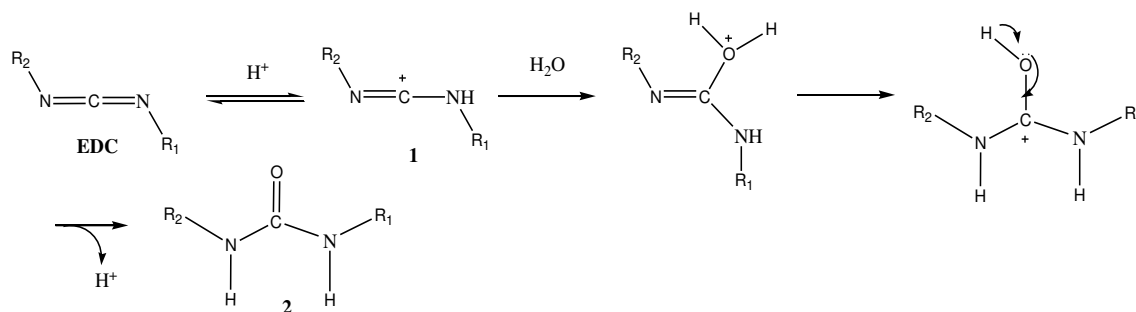


Figura 27: Primeira etapa da reação de acoplamento. Em pH levemente ácido, inicialmente, ocorre a protonação da carbodiimida (EDC), originando o carbocátion representado em 1, que é hidrolisado, formando um derivado de uréia em 2.⁷⁸

Posteriormente, o grupo ácido carboxílico (presente na molécula de ampicilina), reage com o carbocátion **1** (formado pela protonação do EDC), através do ataque nucleofílico do grupo carboxilato, originando O-acilisouréia, representada em **3**, como mostra a **Figura 28**.⁷⁸

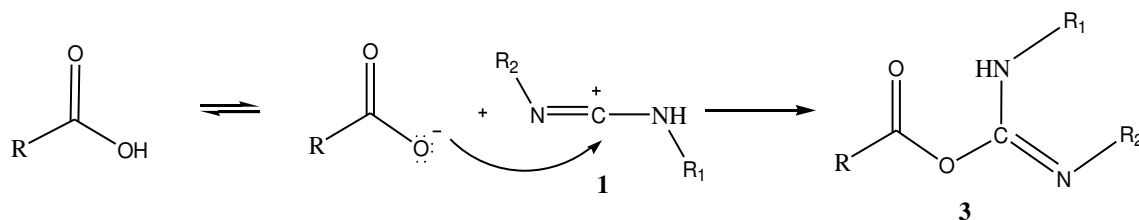


Figura 28: O ácido carboxílico (presente na ampicilina), reage com o carbocátion 1 através do ataque nucleofílico do grupo carboxilato, originando O-acilisouréia em 3.⁷⁸

A O-acilisouréia (representada em **3**) é um intermediário reativo que pode ser facilmente atacado por nucleófilos (por exemplo, -NH_2 , H_2O , etc.). Como a reação ocorre em meio aquoso, esse intermediário pode ser atacado pela H_2O , sofrendo hidrólise, o que causa a inativação do EDC. Por isso, é comum utilizar o NHS nessa reação, pois ele forma um éster mais estável (quando reage com a O-acilisouréia), menos sensível à hidrólise e mais reativo frente às amins primárias, facilitando a reação de acoplamento. Além disso,

esse composto formado também é estericamente impedido, o que dificulta possíveis rearranjos, por sua vez facilitando a formação da ligação amida, como mostra a **Figura 29**.⁷⁸

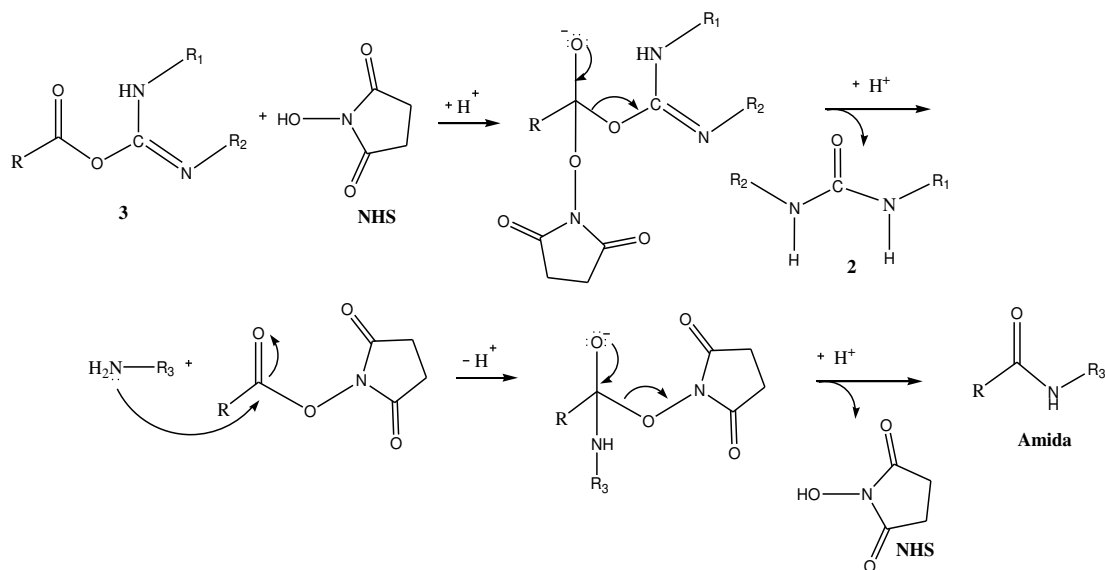


Figura 29: Mecanismo de reação entre a O-acilisouréia e o NHS. Quando o NHS reage com a O-acilisouréia, um éster bastante estável é formado. Como o composto também é estericamente impedido, não ocorre nenhum rearranjo, e a formação da ligação amida é então facilitada.⁷⁸

Para confirmar o sucesso da funcionalização das nanopartículas com grupamentos amina ($-NH_2$) e, posteriormente, com a ampicilina, foram realizadas medidas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e potencial zeta. A **Figura 30** apresenta o espectro de FTIR das nanopartículas sintetizadas, sendo as **Figuras 30B, C e D** ampliações das regiões do espectro que apresentaram sutil deslocamento de bandas que sugerem o sucesso da funcionalização. A **Tabela 3** apresenta as bandas de transmitância características dos sistemas sintetizados e suas devidas atribuições.

Tabela 3: Bandas de transmitância características das nanopartículas sintetizadas.

Bandas de transmitância (cm^{-1})			
Bandas características	Ag@SiO ₂ e SiO ₂	Ag@SiO ₂ -NH ₂ ^a e SiO ₂ -NH ₂ ^b	Ag@SiO ₂ -Ampicilina ^a e SiO ₂ -Ampicilina ^b
Estiramento OH e/ou NH ₂	3418	3431	3433
Estiramento C-H (metil e metileno)	-	2927, 2973	2971 ^a , 2982 ^b e 2727 ^b
Deformação angular H ₂ O adsorvida	1640	1638	1641
Deformação angular CH ₂ e CH ₃	1400 e 1384	1400 e 1384	1384
Estiramento assimétrico Si-O-Si	1095	1099	1099
Estiramento simétrico Si-OH	958	956	955
Estiramento simétrico Si-O-Si	796	796	797

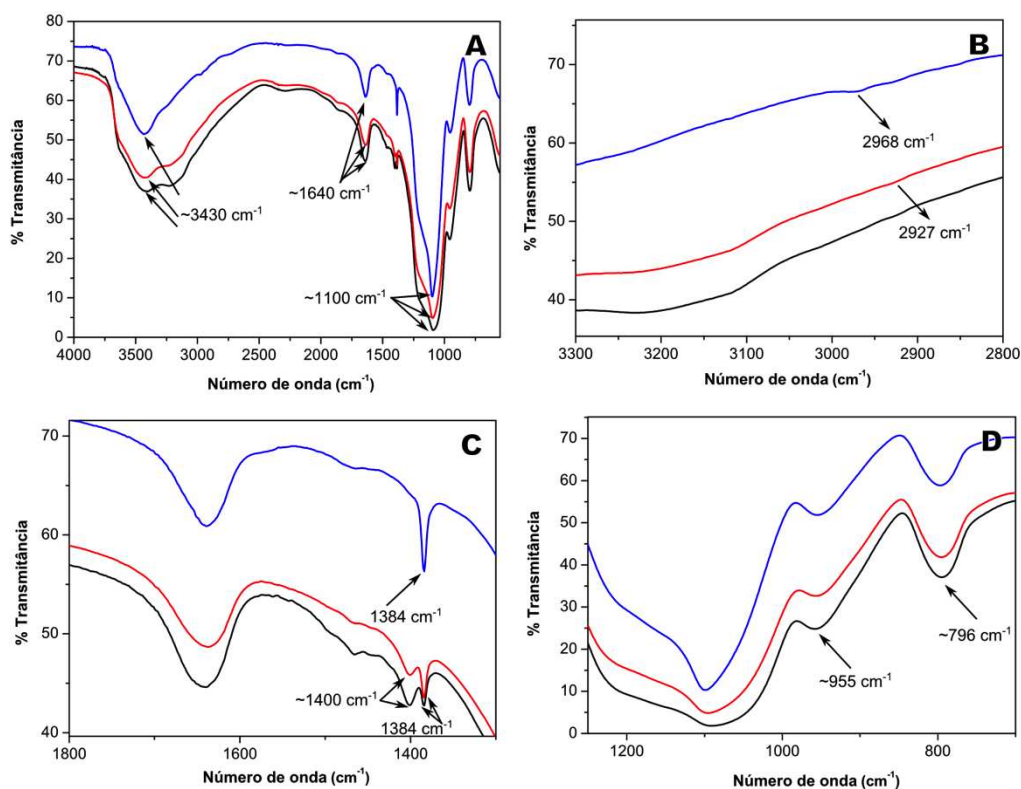


Figura 30: Espectro de infravermelho das nanopartículas sintetizadas: (A) Espectro inteiro, (B) ampliação da região de 3300 a 2800 cm^{-1} , (C) ampliação da região de 1800 a 1300 cm^{-1} e (D) ampliação da região de 1250 a 700 cm^{-1} . Linha preta: Ag@SiO₂; linha vermelha: Ag@SiO₂-NH₂; e linha azul: Ag@SiO₂-Ampicilina.

Os espectros de FTIR das nanopartículas de Ag@SiO₂ (linha preta – **Figura 30A**) apresentam bandas de transmitância referentes ao estiramento -OH (3430 cm^{-1}),⁷⁹⁻⁸¹ deformação angular da água adsorvida na superfície da sílica (1640 cm^{-1}),^{79, 80} estiramento assimétrico Si-O-Si (1100 cm^{-1}),⁸⁰⁻⁸² estiramento simétrico Si-OH (ν_s 955 cm^{-1})⁸² e Si-O-Si (ν_s 796 cm^{-1}), sendo essas duas últimas observadas na ampliação do espectro mostrada na **Figura 30D**, (linha preta). A posição e intensidade dessas bandas principais estão de acordo com dados da literatura.⁷⁷ Nenhuma ou apenas mudanças sutis foram observadas nos espectros dos compostos Ag@SiO₂-NH₂ e Ag@SiO₂-Ampicilina (linhas vermelha e azul na **Figura 30**, respectivamente). Por

exemplo, era esperado uma banda em torno de $1640\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ referente à deformação angular da ligação NH_2 . Além disso, a região de estiramento da ligação NH_2 ($3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$) é a mesma região de estiramento da ligação -OH ($3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$), sendo bastante complicado a atribuição dessa banda, já que a sílica possui -OH em sua superfície. Já para os espectros dos compostos funcionalizados com ampicilina, era esperado uma banda na região de $3150\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento C-H do anel benzênico, assim como uma banda referente à deformação angular fora do plano em $900\text{-}690\text{ cm}^{-1}$ para essa mesma ligação. Também deveríamos observar uma banda em torno de $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ para a ligação C=O da amida do anel beta-lactâmico, além das bandas referentes ao estiramento e à deformação angular da ligação NH_2 , presente na cadeia carbônica do antibiótico. A **Figura 31** apresenta o espectro FTIR da ampicilina, com as bandas anteriormente descritas.

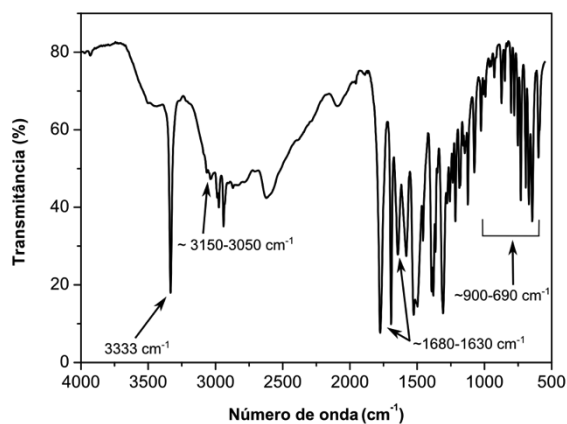


Figura 31: Espectro de infravermelho da ampicilina.

Porém, de acordo com Lin *et al.*,⁸² a intensidade da banda Si-OH ($\sim 955\text{ cm}^{-1}$) pode estar relacionada ao sucesso da funcionalização, uma vez que a diminuição da intensidade dessa banda (**Figura 30D**), pode estar associada ao recobrimento da sílica com os grupos -NH_2 . No entanto, como a banda ainda

está presente em todos os três materiais, significa que nem todos os grupos silanóis reagiram.⁸²

Além disso, uma possível explicação para essas mudanças sutis ou mesmo inexistentes pode estar relacionada à pequena quantidade de APTES e ampicilina utilizadas durante a síntese dos materiais ou ainda à sobreposição de bandas, uma vez que os compostos apresentam bandas características em regiões muito semelhantes. Apesar da espectroscopia FTIR apresentar apenas evidências sutis da funcionalização das nanopartículas sintetizadas, o potencial zeta das nanopartículas apresentou um forte indício do sucesso da funcionalização. A **Tabela 4** apresenta os valores de potencial zeta para as nanopartículas sintetizadas.

Tabela 4: Potencial zeta das nanopartículas sintetizadas.

Amostra	Potencial zeta (mV)
AgNPs	$-7,9 \pm 0,1$
Ag@SiO ₂	$-43,6 \pm 1,0$
Ag@SiO ₂ -NH ₂	$21,3 \pm 0,2$
Ag@SiO ₂ -Ampicilina	$-18,4 \pm 0,6$
SiO ₂	$-41,1 \pm 0,6$
SiO ₂ -NH ₂	$16,4 \pm 0,2$
SiO ₂ -Ampicilina	$-26,9 \pm 0,8$

O valor de potencial zeta da ampicilina é de $-11,9 \pm 2,8$

Como observado, o potencial zeta das AgNPs é levemente negativo e se torna mais negativo após o recobrimento com SiO₂, devido ao grupamento -OH negativamente carregado na superfície da sílica.⁷⁷ Com a funcionalização, o valor do potencial zeta se torna mais positivo, o que pode ser justificado pela presença dos grupamentos amina (positivamente

carregados) na superfície da sílica. Após a reação com ampicilina, o potencial zeta das nanopartículas volta a ser negativo, indicando o recobrimento da superfície do material com o antibiótico, visto que a ampicilina também é negativamente carregada. Podemos observar que o mesmo ocorre para as nanopartículas de SiO_2 , sendo que inicialmente o potencial zeta das mesmas é negativo devido ao grupamento $-\text{OH}$ negativamente carregado na superfície da sílica.⁷⁷ Em seguida, com a funcionalização com o grupamento $-\text{NH}_2$, o potencial das $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ se torna positivo, uma vez que o grupo $-\text{NH}_2$ é carregado positivamente. E por último, a funcionalização com a ampicilina, torna o potencial das partículas negativo, já que o potencial da ampicilina é negativo, indicando o sucesso da funcionalização.

Análise termogravimétrica (TGA) foi realizada a fim de obter os perfis de decomposição térmica dos materiais e correlacionar esses resultados com os constituintes dos sistemas sintetizados. A **Figura 32** apresenta as curvas de TGA da ampicilina e das amostras contendo prata, que são apresentadas para comparação (Ag@SiO_2 e $\text{Ag@SiO}_2\text{-NH}_2$ e $\text{Ag@SiO}_2\text{-Ampicilina}$).

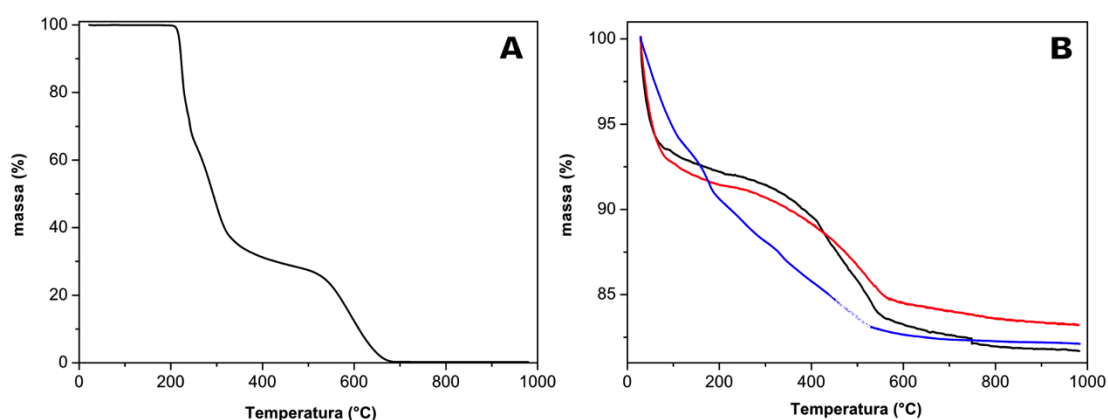


Figura 32: Curvas de TGA de (A) ampicilina e (B) nanopartículas sintetizadas. Linha preta: Ag@SiO_2 ; linha vermelha: $\text{Ag@SiO}_2\text{-NH}_2$; e linha azul: $\text{Ag@SiO}_2\text{-Ampicilina}$.

Para a ampicilina (**Figura 32A**) podemos notar três estágios de perda de massa. Um em torno de 210 °C, o segundo em ~260 °C e o terceiro próximo a 530 °C. De acordo com a literatura,⁸³ sabe-se que a temperatura na qual a ampicilina anidra sólida começa a liquefazer é em torno de 205 °C. Em temperaturas maiores que 220 °C, a maior perda de massa indica que o antibiótico é instável e começa a se decompor. Acima dessa temperatura, observamos a decomposição da matéria orgânica, proveniente da cadeia carbônica do material, formando CO₂,⁸³ em atmosfera de O₂.

Para compostos contendo prata na ausência de ampicilina (linhas preta e vermelha na **Figura 32B**), observamos dois estágios de perda de massa. O primeiro é observado em temperaturas abaixo de 200 °C (~8-9%) enquanto que o segundo estágio é observado entre 210 e 600 °C (~16-17%). O primeiro estágio pode ser atribuído à evaporação de água adsorvida fisicamente e/ou etanol residual. Por outro lado, o segundo estágio pode estar relacionado à desidroxilação da superfície da sílica, assim como à decomposição e carbonização completa das cadeias carbônicas presentes no TEOS e APTES utilizados durante a síntese dos compostos.⁷⁷ Já para os compostos que contêm ampicilina, foram observados três estágios de perda de massa. Assim como para os demais compostos, o primeiro estágio de perda de massa (~10%) é observado em baixas temperaturas (em torno de 180 °C), e pode estar associado à evaporação de água ou etanol residual. Por outro lado, as outras duas perdas de massa observadas acima de 200 °C (na faixa de temperatura de 200 a 340 °C) (~14%) e de 400 a 600 °C (~17%) podem estar relacionadas à decomposição e carbonização completa da ampicilina presente nas nanopartículas. Levando em consideração que a funcionalização das nanopartículas Ag@SiO₂-Ampicilina, utilizam como precursor as

nanopartículas Ag@SiO₂-NH₂, podemos verificar que na região de 200 a 600 °C da curva de TGA das nanopartículas Ag@SiO₂-NH₂ (linha vermelha, **Figura 32B**) a perda de massa associada é de 16%. A mesma região para o composto Ag@SiO₂-Ampicilina (linha azul, **Figura 32B**) apresentou perda de massa de 17%. Com isso, pode-se inferir que os 1% de diferença entre os dois compostos é devido à presença da ampicilina no material. Isso nos permitiu estimar teoricamente, a quantidade de moléculas de ampicilina por nanopartículas funcionalizadas. As massas de prata e sílica existentes no material sintetizado (Ag@SiO₂) foram utilizadas para calcular a massa de uma partícula do sistema *core-shell*. Por sua vez, o resultado de TGA prevê que há cerca de 1% de ampicilina no material Ag@SiO₂-Amp. Dessa forma, calculamos que, em teoria, há cerca de 23×10^3 moléculas de ampicilina por nanopartícula funcionalizada.

7. Ensaios biológicos

7.1. Susceptibilidade das bactérias às nanopartículas

Os materiais sintetizados foram testados em culturas de bactérias *Escherichia coli* susceptível e resistente à ampicilina (Gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) em placas de ágar. A massa de prata existente no *core* do material sintetizado (Ag@SiO₂) foi utilizada para normalizar as amostras e então calcular a massa de *core-shell* e sílica que deveriam ser utilizadas nos experimentos. Além disso, baseado nos resultados de TGA, foi possível calcular a quantidade de ampicilina presente nos materiais sintetizados e ensaios biológicos com a ampicilina foram realizados. As concentrações (**a**, **b**, **c**) utilizadas nos experimentos são apresentadas na

Tabela 5. Outras concentrações intermediárias foram testadas, mas não são apresentadas para melhor visualização dos resultados e das tendências obtidas.

Tabela 5: Concentração dos materiais ($\mu\text{g/mL}$) utilizados na aplicação biológica.

Amostra	[Ag] ($\mu\text{g/mL}$)	[SiO ₂] e [SiO ₂ - Amp] ($\mu\text{g/mL}$)	[Ag@SiO ₂] e [Ag@SiO ₂ -Amp] ($\mu\text{g/mL}$)	Ampicilina ($\mu\text{g/mL}$)
(a)	0,10	5,43	5,53	0,05
(b)	1,00	54,30	55,30	0,55
(c)	5,00	272,00	277,00	2,77

As placas foram encubadas a 37 °C por aproximadamente 17 h e o número de colônias foi individualmente contado e os resultados apresentados são a média de cada condição. Os resultados estão apresentados na **Figura 33**, onde há comparação da porcentagem de redução do número de colônias causadas pela aplicação dos materiais contra *S. aureus* e as duas *E. coli*, respectivamente.

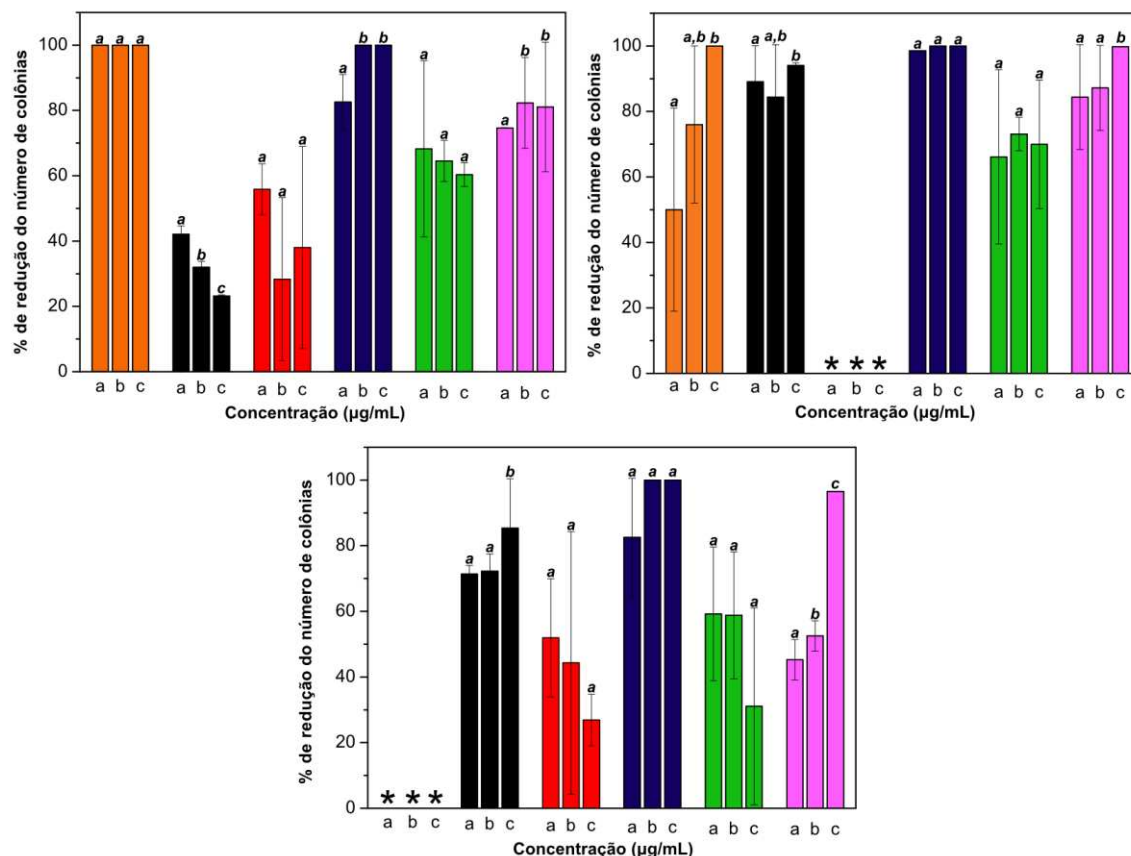


Figura 33: Gráfico comparativo do efeito bactericida dos materiais sintetizados para as bactérias (A) *S. aureus*, (B) *E. coli* e (C) *E. coli* resistente à ampicilina. As concentrações a, b e c são referentes às concentrações dos materiais (em µg/mL) utilizados na aplicação biológica e estão descritas na Tabela 5. As colunas em laranja representam a ampicilina, em preto as AgNPs, em vermelho as nanopartículas de SiO₂, em azul o sistema Ag@SiO₂, em verde o composto SiO₂-Ampicilina e em rosa as nanopartículas de Ag@SiO₂-Ampicilina. O símbolo * representa as concentrações que não causaram inibição do crescimento bacteriano. Análise estatística foi realizada de acordo com o teste-t de Student. As letras minúsculas e em itálico na parte superior das barras indicam média $P < 0,05$ para um mesmo grupo. As letras em comum denotam que os dados não são estatisticamente diferentes.

A presença dos materiais inibiu o crescimento bacteriano de maneira distinta, porém é possível notar que com o aumento da concentração, a porcentagem de redução do número colônias tende a aumentar para os

distintos materiais investigados. Porém, pode-se observar que alguns pontos estão fora da tendência predita, o que pode ser atribuído à estatística de contagem das colônias, sendo uma possível fonte de erro experimental. Durante o trabalho, citometria de fluxo foi empregada sem êxito, como uma possível alternativa que poderia aumentar a confiabilidade dos dados bem como a estatística de contagem. Alguns dos resultados obtidos por citometria de fluxo são apresentados no **Anexo 10.3**.

Os testes realizados com a ampicilina mostram que a *S. aureus* e a *E. coli* são suscetíveis a esse antibiótico. Podemos notar que todas as concentrações de ampicilina utilizadas ocasionaram a redução de 100% do número de colônias da *S. aureus* (**Figura 33A** – colunas laranjas), enquanto que para a *E. coli* (**Figura 33B** – colunas laranjas), o aumento da concentração de ampicilina aumenta seu efeito bactericida, causando inibição total do crescimento bacteriano (100% de redução do número de colônias) somente em alta concentração. Já a *E. coli* resistente à ampicilina (**Figura 33C** – colunas laranjas), possui o gene que expressa resistência à esse antibiótico e portanto, nenhuma concentração de ampicilina foi capaz de ocasionar a redução do número de colônias dessa bactéria.

É possível notar que as AgNPs (colunas pretas) são excelentes agentes bactericidas, mesmo em baixas concentrações. Pode-se observar que a redução do número de colônias, na menor concentração de AgNPs, é de cerca de 40% para *S. aureus* (**Figura 33A** – colunas pretas), 90% para *E. coli* (**Figura 33B** – colunas pretas) e cerca de 70% para *E. coli* resistente à ampicilina (**Figura 33C** – colunas pretas). Também é possível notar que a efetividade desse material é aumentada com o aumento da concentração de nanopartículas.

Já as nanopartículas de sílica (colunas vermelhas) apresentaram efeito bactericida bastante semelhante às AgNPs para a *S. aureus*, ocasionando redução do número de colônias de cerca de 50%, em sua menor concentração (**Figura 33A** – colunas vermelhas). No caso da *E. coli*, não foi possível observar efeito bactericida significativo das nanopartículas de SiO₂ (**Figura 33B** – colunas vermelhas), sendo que não houve redução do número de colônias em nenhuma concentração do material frente à essa bactéria. Porém, na presença de *E. coli* resistente à ampicilina (**Figura 33C** – colunas vermelhas), foi verificado um comportamento semelhante ao da *S. aureus*, ocasionando redução do número de colônias de cerca de 50%, em sua menor concentração. Também foi possível notar que há uma diminuição da efetividade do material a concentração de SiO₂ é aumentada. No entanto, de acordo com o teste estatístico (teste-t de Student), verifica-se que não há diferença significativa entre os resultados provenientes das diferentes concentrações de sílica utilizadas. Dessa forma, os resultados de porcentagem de redução de colônias apresentados para as três bactérias são estatisticamente iguais. Uma possível explicação está associada à tendência de agregação das nanopartículas de SiO₂ em presença do meio LB.⁸⁴

No entanto, na presença do sistema *core-shell* (colunas azuis), houve 100% de inibição do crescimento bacteriano (com exceção da solução mais diluída) para todas as bactérias. Essa efetividade do material pode estar relacionada ao efeito de liberação de íons Ag⁺ do núcleo de prata através da camada porosa de sílica, devido ao contato da solução com o núcleo de prata, produzindo e mantendo os excelentes efeitos bactericidas.⁴⁰ Além disso, as nanopartículas de prata (barras pretas da **Figura 33**) e sílica mesoporosa (barras vermelhas da **Figura 33**) também apresentam propriedade bactericidas

quando aplicadas isoladamente. Dessa forma, há um possível sinergismo entre os dois materiais, o que provavelmente contribui para o efeito bactericida do compósito Ag@SiO₂.

Além disso, é possível notar que a funcionalização com ampicilina aumentou as propriedades bactericidas das nanopartículas de sílica e, em altas concentrações, o sistema de prata funcionalizado com ampicilina (Ag@SiO₂-Ampicilina), apresentou resultados semelhantes ao seu respectivo precursor sem funcionalização.

Por exemplo, o material SiO₂-Ampicilina (colunas verdes), apresentou propriedades bactericidas superiores às nanopartículas de SiO₂ (colunas vermelhas) para as três bactérias, causando redução do número de colônias de cerca de 70% em sua menor concentração para as bactérias *S. aureus* (**Figura 33A** – colunas verdes) e *E. coli* resistente à ampicilina (**Figura 33C** – colunas verdes) e de cerca de 50% para a *E. coli* susceptível ao antibiótico (**Figura 33B** – colunas verdes). De acordo com o teste estatístico realizado, não há diferença significativa entre os resultados obtidos utilizando as diferentes concentrações desse material para todas as bactérias. Porém, o melhor efeito bactericida do material SiO₂-Ampicilina pode estar associado ao sinergismo entre o antibiótico presente na superfície do material e a sílica, que também apresenta propriedades antibacterianas.

Já o resultado de inibição de crescimento bacteriano ocasionado pelo material Ag@SiO₂-Ampicilina (colunas rosas) se mostrou bastante semelhante ao obtido pelos ensaios com o sistema *core-shell* (colunas azuis) em suas maiores concentrações, porém ocasionou a redução do número de colônias de cerca de 80% em sua menor concentração para as bactérias *S. aureus* (**Figura 33A** – colunas rosas) e *E. coli* (**Figura 33B** – colunas rosas) e de cerca de

50% para a *E. coli* resistente à ampicilina (**Figura 33C** – colunas rosas). Comparativamente, não era esperada uma diminuição nas propriedades inibitórias do composto Ag@SiO₂-Ampicilina em baixas concentrações, com relação ao sistema Ag@SiO₂. Uma possível explicação para essa redução pode estar relacionada ao fato de que as reações químicas de funcionalização da superfície (apresentadas esquematicamente na **Figura 26**) ocasionaram a obstrução parcial dos poros, impedindo a saída da prata iônica. Essa interpretação é baseada na diminuição da área superficial dos compósitos de 32 m²/g (Ag@SiO₂) para 13 m²/g (Ag@SiO₂-Ampicilina) após a funcionalização, de acordo com os dados obtidos por análise de adsorção/dessorção de nitrogênio. A **Figura 34** apresenta um esquema ilustrativo da obstrução dos poros do material Ag@SiO₂ após a funcionalização.

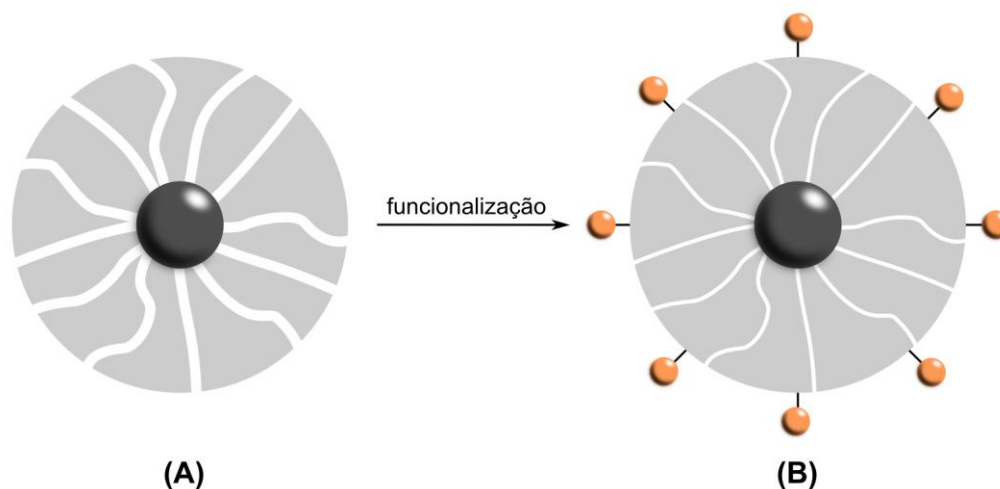


Figura 34: Esquema representativo das nanopartículas Ag@SiO₂ (A) e das Ag@SiO₂-Ampicilina (B). Os poros existentes no sistema Ag@SiO₂, por onde há a liberação de íons Ag⁺, são parcialmente obstruídos com o processo de funcionalização. Esse esquema é meramente ilustrativo e não está na proporção de tamanho real do sistema.

Dessa forma, o efeito bactericida do composto Ag@SiO₂-Ampicilina pode estar associado ao sinergismo entre o sistema Ag@SiO₂ e a ampicilina presente na superfície do material. Mesmo que os poros estejam parcialmente obstruídos, como mostra os dados obtidos por adsorção/dessorção de nitrogênio, ainda há liberação de prata no meio. Com o aumento da concentração do composto Ag@SiO₂-Ampicilina, aumenta também a concentração de prata liberada no sistema, aumentando assim a efetividade do material.

Alternativamente, a redução da eficiência bactericida do compósito contendo ampicilina poderia ser explicada através de uma possível inativação do antibiótico que está quimicamente ligado à superfície da sílica. Kumar *et al.*,⁸⁵ mostraram que o grupo carboxila da ampicilina é um dos responsáveis pelo efeito bactericida do antibiótico. Foi demonstrado por modelagem molecular que as ligações de hidrogênio realizadas entre esse grupamento e os grupos positivamente carregados das porinas da membrana celular bacteriana fazem com que o antibiótico consiga se ancorar na proteína-F da membrana externa da célula bacteriana (OmpF - **Figura 35**) e, com isso, danificar a parede celular.⁸⁵

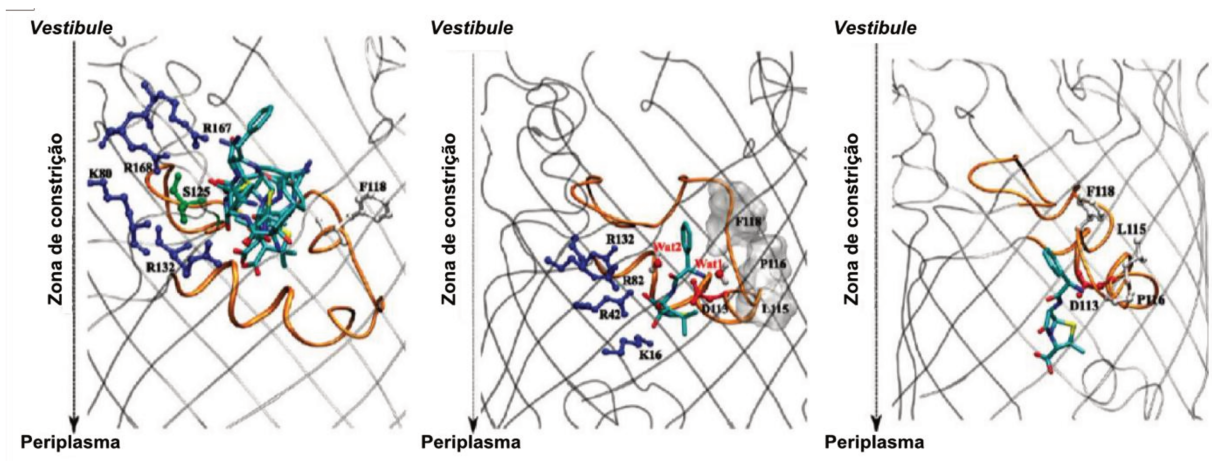


Figura 35: Três etapas representando o mecanismo da translocação da ampicilina através proteína-F da membrana externa (OmpF). A OmpF se dobra, tendo configuração semelhante à um “barril-beta” (conformação beta da proteína), formando uma zona de constrição (CR). Além de tal constrição espacial, esta zona é também caracterizada por resíduos carregados negativamente (representados por D113, E117 e D121) e resíduos carregados positivamente (representados por R42, R82, e R132). Apenas os resíduos envolvidos nas interações de hidrogênio/hidrofóbicas com ampicilina são mostrados nessa figura. Os resíduos do monômero OmpF são representados usando representação bola-bastão (básico: azul, ácido: vermelho, hidrófobo: cinza), e as regiões hidrofóbicas são mostrados na representação “ondas” (cinza). Na etapa A, são mostradas as interações da ampicilina com os resíduos carregados acima da CR. Na etapa B, são apresentadas as diversas interações da ampicilina na região CR. Na etapa C, é evidenciada a interação final entre a OmpF e a ampicilina antes da completa translocação do antibiótico através da OmpF.⁸⁵

Como a funcionalização das nanopartículas sintetizadas nesse trabalho ocorre através da formação da ligação amida entre o grupo -COO^- do antibiótico com o NH_2^+ da superfície da sílica (conforme esquematizado na **Figura 26B-C**), a menor efetividade dos materiais sintetizados poderia ser atribuída ao fato do grupo carboxila estar impedido de fazer as ligações de hidrogênio bem como difundir para dentro da proteína.⁸⁵ Por outro lado, o

grupo de pesquisa do Prof. Dr. Hubert Karl Stassen (IQ-UFRGS), realizou simulações por dinâmica molecular (DM) da ampicilina frente à uma bicamada lipídica hidratada. A bicamada simulada é composta por um lipídeo bastante comum na membrana celular que é a 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC), como mostra a **Figura 36A**. Para tal simulação, assumiu-se a ampicilina na sua forma zwitteriônica, ou seja, com o grupo NH_2 protonado e com a carboxila desprotonada (**Figura 36B**).

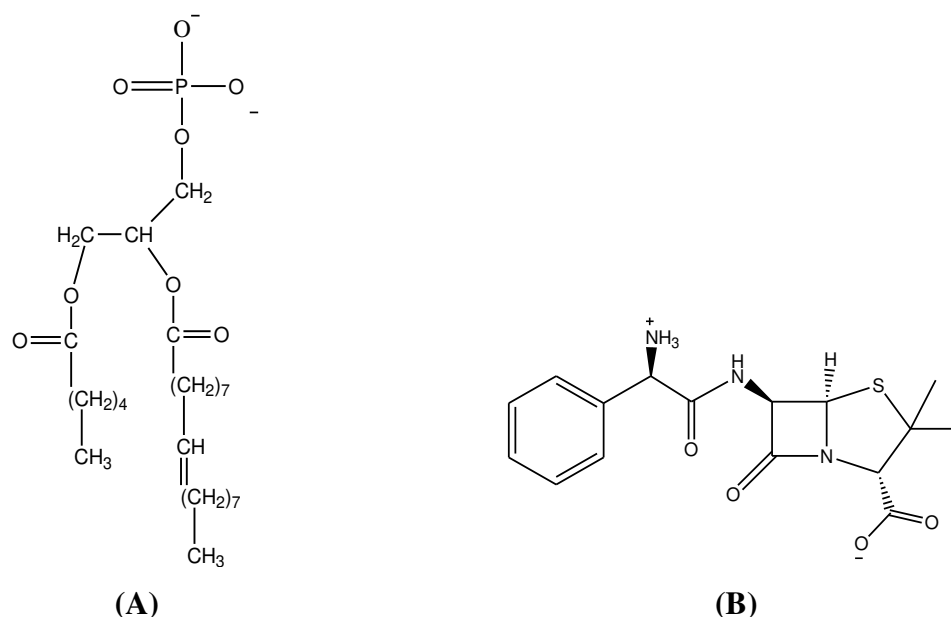


Figura 36: (A) Representação esquemática do fosfolipídeo 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) e (B) representação esquemática da molécula de ampicilina na sua forma zwitteriônica.

Após simulação de 75 ns, foram obtidas configurações apresentando a ampicilina inserida na parte polar da bicamada, expondo o grupo carboxilato ao solvente (água) enquanto que a parte fenólica tendeu a interagir com a região lipofílica da bicamada. O grupo NH_3^+ do antibiótico apresentou interação forte com o grupo fosfato e a unidade glicerol da bicamada (**Figura**

36A). Assim, de acordo com os resultados obtidos pelo Prof. Stassen, acredita-se que o fato da funcionalização das nanopartículas ocorrer através da formação da ligação entre o grupo -COO^- do antibiótico com o NH_2^+ da superfície da sílica (**Figura 26B-C**), diminui a polaridade da parte carboxílica da ampicilina, sugerindo interação mais forte com a bicamada fosfolipídica. Dessa forma, existe a possibilidade que a ampicilina ligada à superfície da sílica facilite a ação antibacteriana das nanopartículas.

Embora o principal objetivo desse trabalho não seja resolver o mecanismo de ação pela qual as nanopartículas atuam sobre as bactérias, a comparação entre os materiais sintetizados nos permite apontar para algumas evidências da ação dos compósitos.

Quanto as AgNPs, o real mecanismo pelo qual essas nanopartículas são capazes de inibir o crescimento bacteriano não foi ainda completamente elucidado discussão e os resultados aqui apresentados não apontam nenhuma novidade frente a literatura. Porém, estudos sugerem que existem quatro possíveis mecanismos de ação das AgNPs: (1) interação com a membrana da célula da bactéria, (2) formação de íons Ag^+ , (3) interação das AgNPs com compostos que contém enxofre ou fósforo, tais como proteínas e DNA, e (4) formação de *pits* na membrana celular.⁴⁵

Por sua vez, os excelentes resultados obtidos para o sistema *core-shell* provavelmente é um indício que dois fenômenos afetam o crescimento bacteriano ao mesmo tempo. Conforme sugerido na literatura,⁴⁰ um dos fenômenos responsáveis pelo efeito bactericida do sistema Ag@SiO_2 deve ser liberação de íons Ag^+ através da camada porosa de sílica (**Figura 34**). Além disso, como a sílica mesoporosa (SiO_2 - barras vermelhas da **Figura 33**) também apresenta propriedade inibitória ao crescimento bacteriano, o

recobrimento das nanopartículas de prata com sílica provavelmente contribui para o efeito bactericida do compósito. Dessa forma, a associação de ambos os efeitos é a provável explicação para a elevada efetividade do compósito Ag@SiO₂.

Em paralelo, pôde-se observar que a funcionalização com ampicilina, na média, aumentou as propriedades bactericidas da sílica e, em altas concentrações, o material Ag@SiO₂-Ampicilina apresentou resultados semelhantes aos do sistema Ag@SiO₂. Por outro lado, o fato do efeito bactericida do compósito Ag@SiO₂-Ampicilina ser menor do que o do Ag@SiO₂, em menores concentrações, pode estar relacionado ao efeito de lixiviação da prata iônica estar sendo parcialmente impedida por oclusão dos poros durante o processo de funcionalização. Essa oclusão parcial dos poros foi verificada através dos resultados de adsorção/dessorção de nitrogênio, onde uma redução de 32 m²/g (Ag@SiO₂) para 13 m²/g (Ag@SiO₂-Ampicilina) na área superficial foi observada. Apesar dos resultados satisfatórios, em altas concentrações, para o sistema Ag@SiO₂-Ampicilina, ainda é preciso investigar uma alternativa que não ocasione a obstrução dos poros da sílica mesoporosa e, dessa forma, não reduza o efeito bactericida da prata.

8. Conclusões

Nesse trabalho, foi realizada a síntese de nanopartículas de prata para posterior recobrimento com sílica, formando um sistema conhecido por *core-shell*, que foi posteriormente funcionalizado com ampicilina. Durante o trabalho, duas sínteses distintas foram adotadas para a obtenção das AgNPs. A

primeira delas se baseou na redução química dos íons Ag^+ por boroidreto de sódio (NaBH_4), utilizando citrato de sódio como agente protetor. Através desse método, não foi possível recobrir as AgNPs com sílica, pois, segundo a literatura, a presença dos íons citrato utilizados como agente protetor pode afetar a estabilidade das AgNPs. No entanto, essa metodologia possibilitou estudar o fenômeno de crescimento e agregação parcial das nanopartículas sintetizadas. Dessa forma, a segunda alternativa para sintetizar as AgNPs foi baseada na redução química dos íons Ag^+ em etileno glicol (EG), na presença de polivinilpirrolidona (PVP). Essa estratégia permitiu o recobrimento das AgNPs com sílica e essas nanopartículas foram então utilizadas para os procedimentos de funcionalização com a ampicilina.

As propriedades bactericidas dos materiais sintetizados foram testadas contra *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* e *Escherichia coli* resistente à ampicilina (Gram-negativas), mostrando que todos os materiais sintetizados apresentam propriedades antibacterianas, que aumentam com o aumento da concentração dos materiais utilizados. Além disso, os resultados obtidos através da análise de TGA, permitiu calcular a quantidade de ampicilina presente nos materiais sintetizados e ensaios biológicos com a ampicilina pura foram realizados. A partir dos ensaios biológicos, foi possível notar que o sistema Ag@SiO_2 possui elevado efeito antimicrobiano, causando 100% de redução do número de colônias para todas bactérias estudadas, exceto em baixas concentrações (0,1 $\mu\text{g/mL}$). A efetividade desse material pode estar relacionada ao efeito de liberação de íons Ag^+ através da camada porosa de sílica, além de um possível sinergismo entre a prata e a sílica, que quando empregados separadamente apresentaram efeitos inferiores ao sistema Ag@SiO_2 .

Além disso, é possível notar que a funcionalização com ampicilina aumentou as propriedades bactericidas das nanopartículas de sílica e, em altas concentrações, o sistema de prata funcionalizado com ampicilina (Ag@SiO₂-Ampicilina), apresentou resultados semelhantes ao seu respectivo precursor sem funcionalização. Comparativamente, não era esperada uma diminuição nas propriedades inibitórias dos compósitos Ag@SiO₂ e Ag@SiO₂-Ampicilina em baixas concentrações. Uma explicação viável para a redução do efeito bactericida do material pode estar relacionado ao efeito de lixiviação da prata iônica estar sendo impedida por oclusão parcial dos poros durante o processo de funcionalização, como mostra os resultados obtidos por adsorção/dessorção de nitrogênio. Além disso, simulações por dinâmica molecular realizadas pelo Prof. Dr. Hubert Stassen, mostraram que o fato da funcionalização das nanopartículas ocorrer através da formação da ligação entre o grupo -COO⁻ do antibiótico com o NH₂⁺ da superfície da sílica, ocasiona a diminuição da polaridade da parte carboxílica da ampicilina, permitindo a interação mais forte com a bicamada lipídica da membrana celular. Assim, existe a possibilidade que a ampicilina facilite a ação antibacteriana das nanopartículas. Apesar dos resultados satisfatórios obtidos para os sistemas sintetizados, ainda é preciso investigar uma alternativa que não ocasione a obstrução dos poros da sílica (o que ocorre com o material Ag@SiO₂-Ampicilina) e, dessa forma não reduza o efeito da prata presente no sistema estudado.

9. Referências Bibliográficas

1. Imming, P.; Klar, B.; Dix, D., Hydrolytic stability versus ring size in lactams: Implications for the development of lactam antibiotics and other serine protease inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, (22), 4328-4331.
2. Hodous, B. L.; Fu, G. C., Enantioselective Staudinger synthesis of beta-lactams catalyzed by a planar-chiral nucleophile. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (8), 1578-1579.
3. Soriano-Correa, C.; Sanchez Ruiz, J. F.; Raya, A.; Esquivel, R. O., Electronic structure and physicochemical properties of selected penicillins. *International Journal of Quantum Chemistry* **2007**, 107, (3), 628-636.
4. Sinnollareddy, M. G.; Roberts, M. S.; Lipman, J.; Roberts, J. A., β -Lactam pharmacokinetics and pharmacodynamics in critically ill patients and strategies for dose optimization: A structured review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2012**, 39, (6), 489-496.
5. Holten, K. B.; Onusko, E. M., Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American Family Physician* **2000**, 62, (3), 611-620.
6. Masadeh, M. M.; Mhaidat, N. M.; Alzoubi, K. H.; Hussein, E.; Al-Trad, E., In vitro determination of the antibiotic susceptibility of biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. *Infection and Drug Resistance* **2013**, 6, (0), 27-32.
7. Hakimelahi, G. H.; Shia, K. S.; Xue, C. H.; Hakimelahi, S.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Saboury, A. A.; Khalafi-Nezhad, A.; Soltani-Rad, M. N.; Osyetrov, V.; Wang, K. P.; Liao, J. H.; Luo, F. T., Design, synthesis, and biological evaluation of a series of beta-lactam-based prodrugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, 10, (11), 3489-3498.
8. Levy, S. B.; Marshall, B., Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* **2004**, 10, (12), S122-S129.
9. Biologia, S. Exemplos de seleção natural. <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Evolucao/evolucao18.php> (28/11/2013),
10. Science Blogs - Ciência, C. e. P. O que não me mata me faz mais forte? – IV: mecanismos de recombinação (parte 2). <http://scienceblogs.com.br/meiodecultura/2011/03/> (28/11/2013),
11. Li, P.; Li, J.; Wu, C. Z.; Wu, Q. S., Synergistic antibacterial effects of beta-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, 16, (9), 1912-1917.
12. Ansari, M. A., Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections. *Biology and Medicine* **2011**, 3, (2), 141-146.
13. Brown, A. N.; Smith, K.; Samuels, T. A.; Lu, J.; Obare, S. O.; Scott, M. E., Nanoparticles Functionalized with Ampicillin Destroy Multiple-Antibiotic-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* **2012**, 78, (8), 2768-2774.
14. Fayaz, A. M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P. T.; Venketesan, R., Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a

study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, 6, (1), 103-109.

15. Fonze, E.; Vanhove, M.; Dive, G.; Sauvage, E.; Frere, J. M.; Charlier, P., Crystal structures of the *Bacillus licheniformis* BS3 class A beta-lactamase and of the acyl-enzyme adduct formed with cefoxitin. *Biochemistry* **2002**, 41, (6), 1877-1885.

16. Buynak, J. D.; Doppalapudi, V. R.; Adam, G., The synthesis and evaluation of 3-substituted-7(alkylidene)cephalosporin sulfones as beta-lactamase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, 10, (9), 853-857.

17. Jones, R. N.; Marshall, S. A.; Varnam, D. J., Activity of a broad-spectrum cephalosporin (Ro 48-8391) alone and in combination with two novel beta-lactamase inhibitors (Ro 48-5545 and Ro 48-8724). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **1998**, 32, (2), 85-94.

18. Durán, N.; Marcato, P. D.; Conti, R. D.; Alves, O. L.; Costa, F. T. M.; Brocchi, M., Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, 21, (6), 949-959.

19. Jankiewicz, B. J.; Jamiola, D.; Choma, J.; Jaroniec, M., Silica-metal core-shell nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science* **2012**, 170, (1-2), 28-47.

20. Sahoo, S. K., Applications of nanomedicine. *Asia Pacific Biotech News* **2005**, 9, (20), 1048-1050.

21. Karkare, M., *Nanotechnology: Fundamentals and Applications*. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd.: New Delhi, 2008; Vol. 1, p 1-2.

22. Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **2009**, 27, (1), 76-83.

23. Zhou, L.; O'Brien, P., Mesocrystals: a new class of solid materials. *Small* **2008**, 4, (10), 1566-1574.

24. Yanhong, L.; Dejun, W.; Qidong, Z.; Min, Y.; Qinglin, Z., A study of quantum confinement properties of photogenerated charges in ZnO nanoparticles by surface photovoltage spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, (10), 3202-3206.

25. Dal Lago, V.; de Oliveira, L. F.; Goncalves, K. A.; Kobarg, J.; Cardoso, M. B., Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, 21, (33), 12267-12273.

26. Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U. O.; Mahmoudi, M., Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, 166, (1), 8-23.

27. Boisseau, P.; Loubaton, B., Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique* **2011**, 12, (7), 620-636.

28. Viet, Q. D.; Sarawade, P. B.; Hilonga, A.; Kim, J. H.; Chai, Y. G.; Kim, S. H.; Ryu, J.; Kim, H. T., Preparation of silver nanoparticle containing silica micro beads and investigation of their antibacterial activity. *Applied Surface Science* **2011**, 257, (15), 6963-6970.

29. Gorup, L. F.; Longo, E.; Leite, E. R.; Camargo, E. R., Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 360, (2), 355-358.

30. Hwang, I.; Hwang, J. H.; Choi, H.; Kim, K.; Lee, D. G., Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *Journal of Medical Microbiology* **2012**, 61, (12), 1719-1726.
31. Lara, H. H.; Garza-Trevino, E. N.; Ixtepan-Turrent, L.; Singh, D., Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology* **2011**, 9, (1), 1-8.
32. Sankar, R.; Karthik, A.; Prabu, A.; Karthik, S.; Shivashangari, K. S.; Ravikumar, V., Origanum vulgare mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, 108, (0), 80-84.
33. Ip, M.; Lui, S. L.; Poon, V. K. M.; Lung, I.; Burd, A., Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *Journal of Medical Microbiology* **2006**, 55, (1), 59-63.
34. García-Barrasa, J.; López-de-Luzuriaga, J.; Monge, M., Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. *Central European Journal of Chemistry* **2011**, 9, (1), 7-19.
35. Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V., A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, 12, (5), 1531-1551.
36. Sondi, I.; Goia, D. V.; Matijevic, E., Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, 260, (1), 75-81.
37. Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolár, M.; Vecerová, R.; Pizúrová, N.; Sharma, V. K.; Nevečná, T. j.; Zboril, R., Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (33), 16248-16253.
38. Satyavani, K.; Gurudeeban, S.; Ramanathan, T.; Balasubramanian, T., Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of Citrullus colocynthis (L.) Schrad. *Journal of Nanobiotechnology* **2011**, 9, (9), 1-8.
39. Jeyaraj, M.; Sathishkumar, G.; Sivanandhan, G.; MubarakAli, D.; Rajesh, M.; Arun, R.; Kapildev, G.; Manickavasagam, M.; Thajuddin, N.; Premkumar, K.; Ganapathi, A., Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, 106, (0), 86-92.
40. Xu, K.; Wang, J.-X.; Kang, X.-L.; Chen, J.-F., Fabrication of antibacterial monodispersed Ag-SiO₂ core-shell nanoparticles with high concentration. *Materials Letters* **2009**, 63, (1), 31-33.
41. Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, 73, (6), 1712-1720.
42. Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L., Completely "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (46), 13940-13941.
43. Vigneshwaran, N.; Nachane, R. P.; Balasubramanya, R. H.; Varadarajan, P. V., A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydrate Research* **2006**, 341, (12), 2012-2018.

44. Regiel, A.; Irusta, S.; Kyziol, A.; Arruebo, M.; Santamaria, J., Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology* **24**, (1), 13.
45. Guzman, M.; Dille, J.; Godet, S., Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2012**, 8, (1), 37-45.
46. Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J.-H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.-Y.; Kim, Y.-K.; Lee, Y.-S.; Jeong, D. H.; Cho, M.-H., Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2007**, 3, (1), 95-101.
47. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, 26, (1), 62-69.
48. Veerapandian, M.; Yun, K., Functionalization of biomolecules on nanoparticles: specialized for antibacterial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2011**, 90, (5), 1655-1667.
49. Ping, L.; Juan, L.; Changzhu, W.; Qingsheng, W.; Jian, L., Synergistic antibacterial effects of beta-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, 16, (9), 1912.
50. Nezhad, M. R. H.; Karimi, M. A.; Shahheydari, F., A sensitive colorimetric detection of ascorbic acid in pharmaceutical products based on formation of anisotropic silver nanoparticles. *Scientia Iranica Transactions F: Nanotechnology* **2010**, 17, (2), 148-153.
51. Graf, C.; Vossen, D. L. J.; Imhof, A.; van Blaaderen, A., A General Method To Coat Colloidal Particles with Silica. *Langmuir* **2003**, 19, (17), 6693-6700.
52. Silvert, P. Y.; HerreraUrbina, R.; Duvauchelle, N.; Vijayakrishnan, V.; Elhsissen, K. T., Preparation of colloidal silver dispersions by the polyol process .1. Synthesis and characterization. *Journal of Materials Chemistry* **1996**, 6, (4), 573-577.
53. 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* **2010**, 364, (1-3), 19-25.
54. Chudasama, B.; Vala, A. K.; Andhariya, N.; Mehta, R. V.; Upadhyay, R. V., Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, 12, (5), 1677-1685.
55. Hyning, D. L. V.; Zukoski, C. F., Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles. *Langmuir* **1998**, 14, (24), 7034-7046.
56. Glatter, O.; Kratky, O., *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press: New York, 1982.
57. Feigin, L. A.; Svergun, D. I., *Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering*. Plenum Press: New York, 1987.
58. Ingham, B.; Lim, T. H.; Dotzler, C. J.; Henning, A.; Toney, M. F.; Tilley, R. D., How Nanoparticles Coalesce: An in Situ Study of Au Nanoparticle Aggregation and Grain Growth. *Chemistry of Materials* **2011**, 23, (14), 3312-3317.
59. Schmitt, J.; Impéror-Clerc, M.; Michaux, F.; Blin, J.-L.; Stébé, M.-J.; Pedersen, J. S.; Meneau, F., Formation of Nanostructured Silica Materials Templated with Nonionic Fluorinated Surfactant Followed by in Situ SAXS. *Langmuir* **2013**, 29, (6), 2007-2023.

60. Beaucage, G., Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering. *Journal of Applied Crystallography* **1995**, 28, (6), 717-728.
61. Beaucage, G., Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension. *Journal of Applied Crystallography* **1996**, 29, (2), 134-146.
62. Steinfeldt, N., In Situ Monitoring of Pt Nanoparticle Formation in Ethylene Glycol Solution by SAXS - Influence of the NaOH to Pt Ratio. *Langmuir* **2012**, 28, (36), 13072-13079.
63. Gondikas, A. P.; Masion, A.; Auffan, M.; Lau, B. L. T.; Hsu-Kim, H., Early-stage precipitation kinetics of zinc sulfide nanoclusters forming in the presence of cysteine. *Chemical Geology* **2012**, 329, (0), 10-17.
64. Polte, J.; Tuae, X.; Wuthschick, 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* **2012**, 6, (7), 5791-5802.
65. Zhang, Z.; Wu, Y., NaBH₄-Induced Assembly of Immobilized Au Nanoparticles into Chainlike Structures on a Chemically Modified Glass Surface. *Langmuir* **2011**, 27, (16), 9834-9842.
66. Prathna, T. C.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A., Studies on aggregation behaviour of silver nanoparticles in aqueous matrices: Effect of surface functionalization and matrix composition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, 390, (1-3), 216-224.
67. Zhang, Z.; Wu, Y., Investigation of the NaBH₄-Induced Aggregation of Au Nanoparticles. *Langmuir* **2010**, 26, (12), 9214-9223.
68. Prathna, T. C.; Chandrasekaran, N.; Raichur, A. M.; Mukherjee, A., Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, 377, (1-3), 212-216.
69. Liu, Y.; Liu, C.-y.; Chen, L.-b.; Zhang, Z.-y., Adsorption of cations onto the surfaces of silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, 257, (2), 188-194.
70. de Oliveira, L. F.; Gonçalves, J. O.; Gonçalves, K. A.; Kobarg, J.; Cardoso, M. B., Sweeter But Deadlier: Decoupling Size, Charge and Capping Effects in Carbohydrate Coated Bactericidal Silver Nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2013**, 9, (11), 1817-1826.
71. Vanderkooy, A.; Brook, M. A., Polyvinylpyrrolidone Molecular Weight Controls Silica Shell Thickness on Au Nanoparticles with Diglycerylsilane as Precursor. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2012**, 4, (8), 3980-3986.
72. Guzmán, M. G.; Dille, J.; Godet, S., Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering* **2009**, 2, (3), 104-111.
73. Slistan-Grijalva, A.; Herrera-Urbina, R.; Rivas-Silva, J. F.; Avalos-Borja, M.; Castillon-Barraza, F. F.; Posada-Amarillas, A., Synthesis of silver nanoparticles in a polyvinylpyrrolidone (PVP) paste, and their optical properties in a film and in ethylene glycol. *Materials Research Bulletin* **2008**, 43, (1), 90-96.
74. Slistan-Grijalva, A.; Herrera-Urbina, R.; Rivas-Silva, J. F.; Avalos-Borja, M.; Castillon-Barraza, F. F.; Posada-Amarillas, A., Assessment of growth of silver

nanoparticles synthesized from an ethylene glycol-silver nitrate-polyvinylpyrrolidone solution. *Physica E-Low-Dimensional Systems & Nanostructures* **2005**, 25, (4), 438-448.

75. Chou, K.-S.; Chen, C.-C., Fabrication and characterization of silver core and porous silica shell nanocomposite particles. *Microporous and Mesoporous Materials* **2007**, 98, (1-3), 208-213.

76. Capeletti, L. B. Efeitos da rota sol-gel no encapsulamento de indicadores colorimétricos e fluorimétricos e em suas performances como sensores de pH e gás amônia. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

77. de Oliveira, L. F.; Gonçalves, K. d. A.; Boreli, F. H.; Kobarg, J.; Cardoso, M. B., Mechanism of interaction between colloids and bacteria as evidenced by tailored silica-lysozyme composites. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22, (43), 22851-22858.

78. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61, (46), 10827-10852.

79. Desai, P.; Dhanya, S.; Srivastava, R., Fabrication and characterization of gold nanostructures for cancer therapy. In *XVIIth International Conference on Bioencapsulation*, Groningen, 2009.

80. Singh, L. P.; Agarwal, S. K.; Bhattacharyya, S. K.; Sharma, U.; Ahalawat, S., Preparation of silica nanoparticles and its beneficial role in cementitious materials. *Nanomaterials and Nanotechnology* **2011**, 1, (1), 44-51.

81. Park, J. T.; Seo, J. A.; Ahn, S. H.; Kim, J. H.; Kang, S. W., Surface modification of silica nanoparticles with hydrophilic polymers. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2010**, 16, (4), 517-522.

82. Lin, O. H.; Akil, H. M.; Ishak, Z. A. M., Surface-activated nanosilica treated with silane coupling agents/polypropylene composites: Mechanical, morphological, and thermal studies. *Polymer Composites* **2011**, 32, (10), 1568-1583.

83. Liu, C.-L.; Wu, S.-M.; Chang, T.-C.; Liu, M.-L.; Chiang, H.-J., Analysis of a mixture containing ampicillin anhydrate and ampicillin trihydrate by thermogravimetry, oven heating, differential scanning calorimetry, and X-ray diffraction techniques. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 517, (1-2), 237-243.

84. Gammoudi, I.; Faye, N. R.; Moroté, F.; Moynet, D.; Grauby-Heywang, C.; Cohen-Bouhacina, T., Characterization of Silica Nanoparticles in Interaction with Escherichia coli Bacteria *World Academy of Science, Engineering and Technology* **2013**, 79, (0), 607-613.

85. Kumar, A.; Hajjar, E.; Ruggerone, P.; Ceccarelli, M., Molecular Simulations Reveal the Mechanism and the Determinants for Ampicillin Translocation through OmpF. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, (29), 9608-9616.

86. Alsharif, R.; Godfrey, W., Bacterial detection and live/dead discrimination by flow cytometry. *Microbial Cytometry Application Note. BD Biosciences, Immunocytometry Systems* **2002**, 1-6.

87. Nuding, S.; Zabel, L. T., Detection, Identification, and Susceptibility Testing of Bacteria by Flow Cytometry. *Journal of Bacteriology & Parasitology* **2013**, 10, (0), 2155-9597.

10. Anexos

10.1. Curva experimental de SAXS usando o parâmetro *cut-off* D = raio da partícula

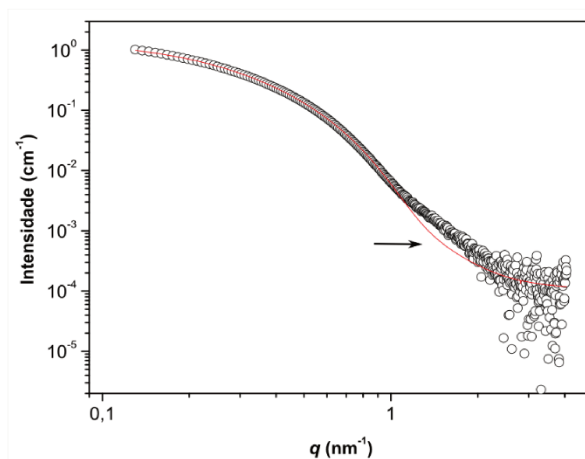


Figura A1: Curva de SAXS para as nanopartículas de prata da amostra A3 usando o parâmetro *cut-off* D = raio da nanopartícula.

10.2. Gráfico de *chi-square* determinado para os diferentes raios durante o procedimento de ajuste da curva experimental de SAXS

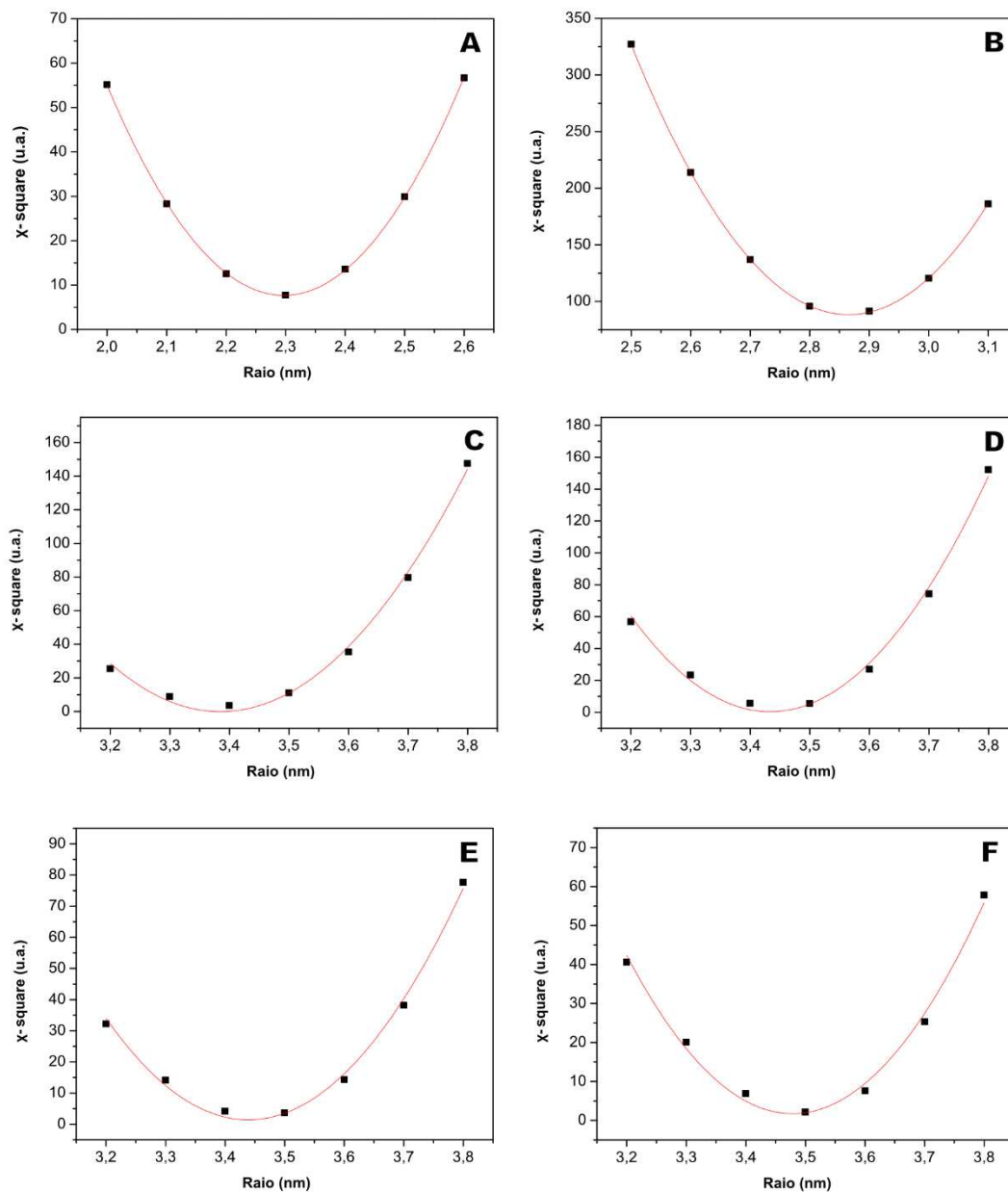


Figura A2: Gráfico de *chi-square* determinado para os diferentes raios durante o procedimento de ajuste da curva experimental de SAXS. (A) A1, (B) A2, (C) A3, (D) A4, (E) A5 e (F) A6.

10.3. Citometria de Fluxo

No exame de qualificação foi discutida a possibilidade de realizar os ensaios biológicos aqui apresentados, utilizando o citômetro de fluxo, de forma a tentarmos eliminar os possíveis erros de amostragem e contagem das células viáveis.

A citometria de fluxo é uma técnica muito utilizada em análise de células eucarióticas e foi adaptada para a análise de viabilidade, do estado metabólico e de marcadores antigênicos de bactérias.⁸⁶ Em particular, a citometria de fluxo pode ser facilmente aplicada para a contagem de bactérias viáveis numa amostra. Além disso, essa técnica permite a análise simultânea de vários parâmetros das células, tornando-se uma poderosa ferramenta para a diferenciação e análise funcional. No entanto, a aplicação da citometria de fluxo em microbiologia clínica ainda é pouco freqüente.⁸⁷

Com a medição multiparamétrica de células individuais a uma taxa de vários milhares por segundo, a citometria de fluxo oferece um método rápido para a análise detalhada dos microorganismos.⁸⁷ Esta técnica proporciona dados quantitativos para o tamanho da célula ou granulosidade através de espalhamento de luz e sinais de fluorescência. Além disso, também fornece informações quantitativas sobre a expressão de antígenos de superfície, ou componentes intracelulares, tais como ácidos nucleicos, proteínas ou lipídios e fluxos iônicos.⁸⁷

10.3.1. Procedimento Experimental

Como descrito na **Seção 5**, inicialmente, foi preparado um pré-inóculo utilizando 5 mL de meio LB (sem ágar bacteriológico) e uma pequena

quantidade de bactéria obtida por repique de placas com cultura das células de *Escherichia coli*, o qual foi colocado em *shaker* a 200 rpm e a 37 °C por cerca de 5 h. Em seguida, foram feitas 2 diluições (em meio LB líquido) do pré-inóculo, na proporção de 50 mL de meio LB para 5 µL do pré-inóculo (diluição 1) enquanto que a segunda diluição foi feita na proporção de 40 mL de meio LB para 10 mL da diluição 1 (diluição 2). Posteriormente, foram incubadas 50 µL de *Escherichia coli* provenientes da diluição 2, com 1 mL de meio LB e 700 µL de solução aquosa de SiO₂, de forma que a concentração final das nanopartículas na solução fosse de 5,43 µg/mL. Outros dois tubos foram preparados, sendo um com 50 µL de *Escherichia coli* provenientes da diluição 2 e 1,7 mL de meio LB (branco *E. coli*) e um outro tubo com 1 mL de meio LB e 750 µL de solução aquosa de SiO₂, de forma que a concentração final das nanopartículas na solução fosse de 5,43 µg/mL (branco SiO₂). Os tubos foram agitados em um shaker a 200 rpm e a 37 °C por cerca de 5 h.

Após as 5h de agitação, 1 mL dessas suspensões foram diluídas em 1 mL de EDTA 1 mM (ácido etilenodiamino tetra-acético). Então, 5 µL de solução de PI 1,9 mM (iodeto de propídeo) e 5 µL de solução de TO 17 µM (laranja de tiazol) foram adicionados à solução, sendo vortexados e mantidos em total ausência de luz por 5 minutos, à temperatura ambiente. A análise de citometria de fluxo foi realizada no equipamento FACSCantoII, que é composto por uma fonte de excitação laser azul (488 nm, refrigerado a ar, de 20 mW de estado sólido) e vermelho (633 nm, 17 mW-HeNe). Cerca de 10.000 eventos de cada amostra foram adquiridos usando o BD FACSDiva software. A análise dos dados foi realizada através do software FCSEXPRESS v3. A população de bactéria foi plotada em um gráfico de pontos FSC-SSC (*side scatter* versus *forward scatter*) que se refere à área superficial celular

(tamanho) e granulosidade da célula, respectivamente, além de serem apresentados histogramas com relação aos dois diferentes corantes utilizados.

10.3.2. Resultados e discussão

As células de bactérias vivas possuem membranas íntegras e são impermeáveis aos corantes, tais como iodeto de propídio (PI), o qual apenas penetra em células com membranas comprometidas. O laranja de tiazol (TO), por sua vez, é um corante que consegue penetrar todas as células, vivas e mortas, em diferentes graus. Por isso, uma combinação destes dois corantes proporciona uma análise rápida e um método confiável para a viabilidade celular de microorganismos.⁸⁶

As **Figuras 1, 2 e 3** mostram os resultados obtidos através da análise de citometria de fluxo da *E. coli*, das nanopartículas de sílica e da *E. coli* na presença de nanopartículas de sílica, respectivamente.

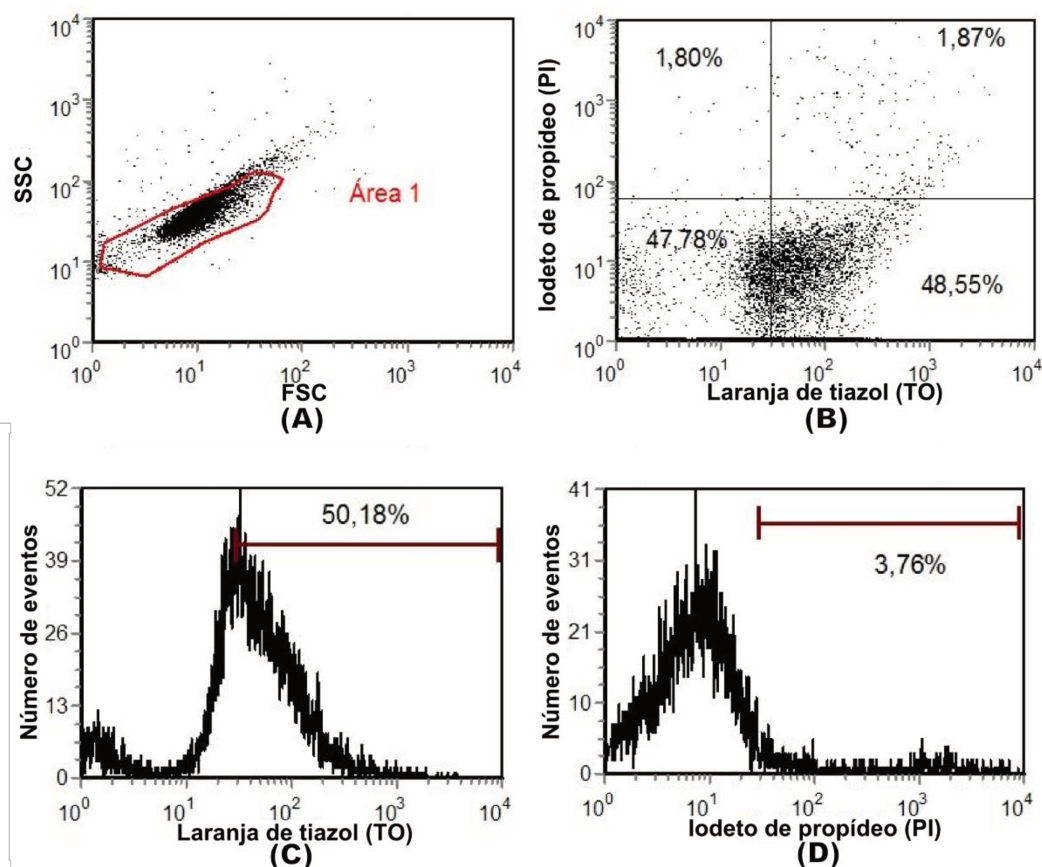


Figura 1: (A) Gráfico de pontos de Granulosidade (SSC – *side scatter*) versus área superficial celular (FSC – *forward scatter*) da *E. coli* marcada com PI e TO, (B) gráfico de pontos do corante PI versus o corante TO. Os quadrantes mostram a porcentagem de bactéria marcada com cada corante. (C) Histograma de *E. coli* na presença de TO e (D) Histograma de *E. coli* na presença de PI.

A **Figura 1A** mostra o gráfico de pontos de granulosidade (SSC – *side scatter*) versus área superficial celular (FSC – *forward scatter*) da *E. coli* marcada com PI e TO. Já a **Figura 1B** mostra o gráfico de pontos do corante PI versus o corante TO. Podemos verificar que, em sentido horário, o primeiro quadrante se refere à porcentagem de *E. coli* marcada com PI (cerca de 1,8%), correspondendo às células mortas ou danificadas. O segundo quadrante mostra a porcentagem de células marcadas com ambos os corantes (cerca de 1,8%). O

terceiro quadrante apresenta a porcentagem de células marcadas com TO (cerca de 48,5%), correspondendo às células vivas ou intactas; e por último o quarto quadrante, mostra a porcentagem de células que não foi marcada por nenhum dos dois corantes (cerca de 47,8%).

Na ausência de qualquer agente bactericida, era esperado uma porcentagem maior de células marcadas com TO. Porém, para organismos gram-negativos, a camada de lipopolissacarídeo interfere na captação desse corante. Por isso, é necessário tratar as células com EDTA, que é responsável pela remoção dessa camada de lipopolissacarídeo. No entanto, mesmo com esse tratamento, observamos que não foi possível marcar todas as células presentes no experimento, o que pode ser confirmado pela **Figura 1C**, que apresenta o histograma das bactérias na presença do corante TO, mostrando que apenas 50% das bactérias foram coradas com TO. Como esperado, há apenas uma pequena porcentagem de bactérias marcadas com PI (responsável por marcar as células mortas ou danificadas), como mostra o histograma mostrado na **Figura 1D**.

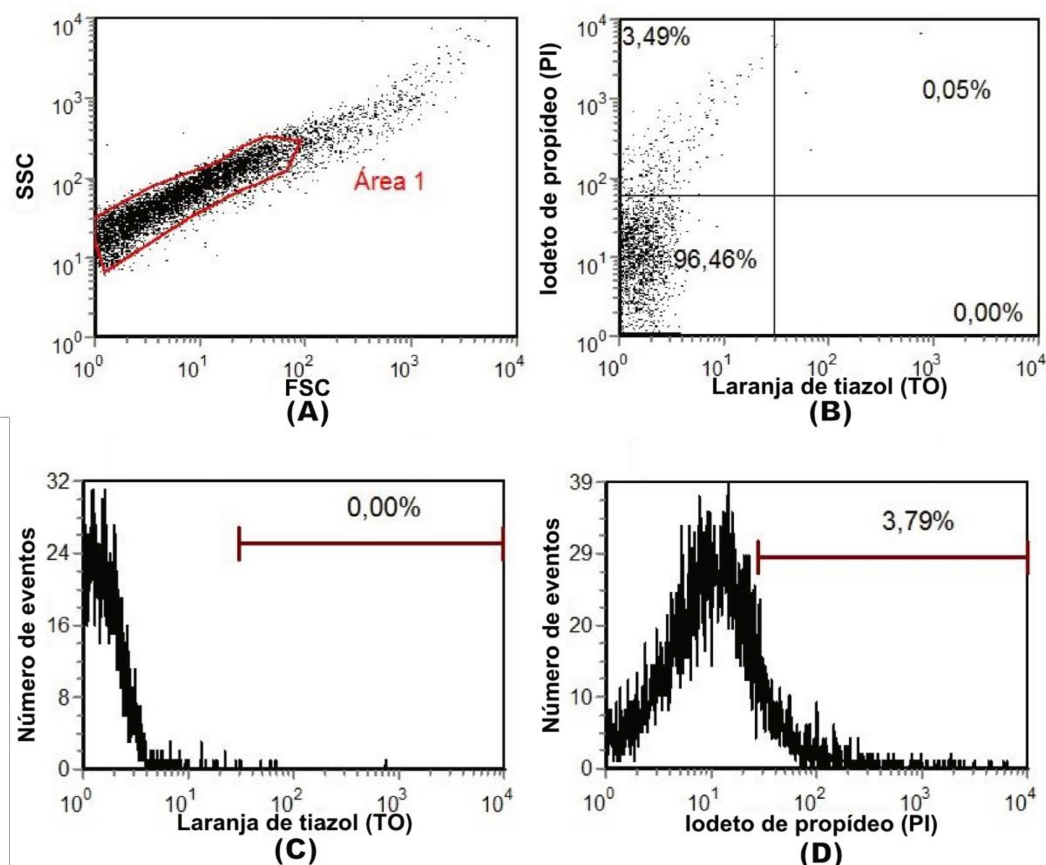


Figura 2: (A) Gráfico de pontos de Granulosidade (SSC – *side scatter*) versus área superficial celular (FSC – *forward scatter*) das nanopartículas de sílica marcadas com PI e TO na presença de, (B) gráfico de pontos do corante PI versus o corante TO. Os quadrantes mostram a porcentagem de sílica marcada com cada corante. (C) Histograma de sílica na presença de TO e (D) Histograma de sílica na presença de PI.

A **Figura 2A** mostra o gráfico de pontos de granulosidade (SSC – *side scatter*) versus área superficial (FSC – *forward scatter*) das nanopartículas de sílica marcada com PI e TO. Podemos notar que as nanopartículas de SiO_2 aparecem praticamente na mesma região que as bactérias. Já a **Figura 2B** mostra o gráfico de pontos do corante PI versus o corante TO. Podemos verificar que, em sentido horário, o primeiro quadrante se refere à porcentagem de nanopartículas de sílica marcada com PI (cerca de 3,5%). O

segundo quadrante mostra a porcentagem de SiO₂ marcadas com ambos os corantes (cerca de 0,05%). O terceiro quadrante apresenta a porcentagem de SiO₂ marcadas com TO (cerca de 0%) e por último o quarto quadrante, mostra a porcentagem de SiO₂ que não foi marcada por nenhum dos dois corantes (cerca de 96,6%). De acordo com o histograma apresentado na **Figura 2C**, podemos notar que as nanopartículas de SiO₂ não são marcadas com TO. Porém, como mostra o histograma mostrado na **Figura 2D**, as nanopartículas de SiO₂ são marcadas com o PI, o que pode interferir na identificação das células mortas.

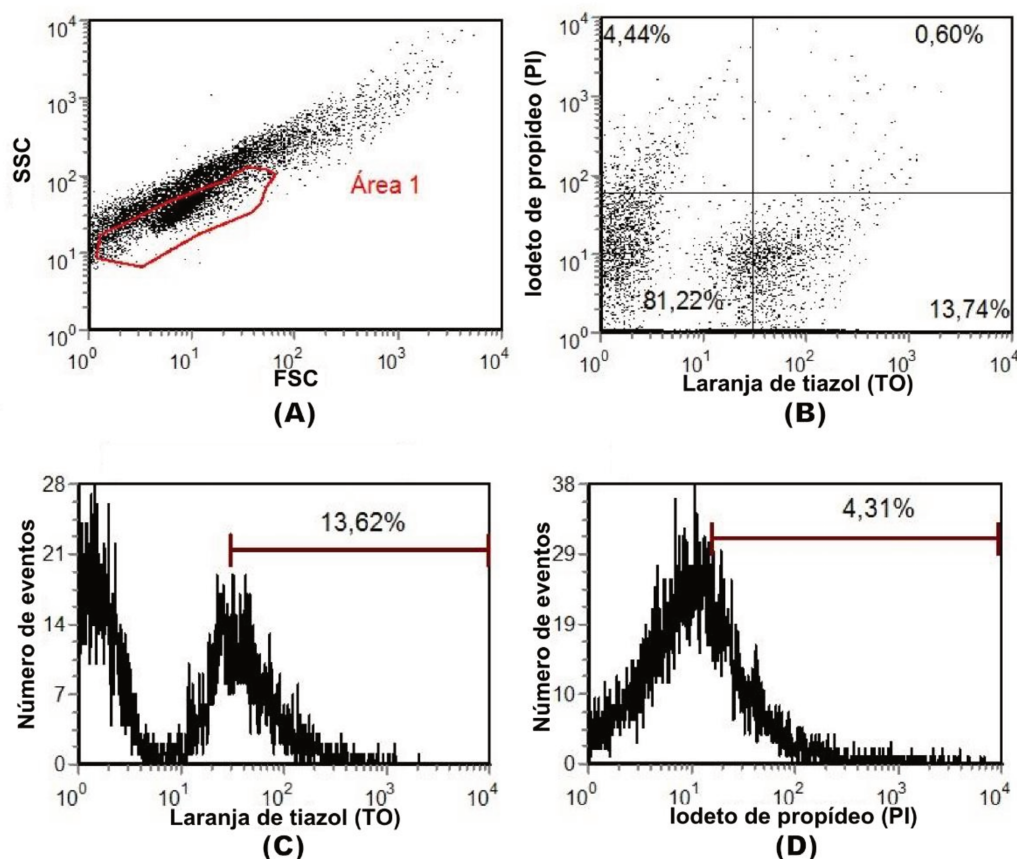


Figura 3: (A) Gráfico de pontos de Granulosidade (SSC – *side scatter*) versus área superficial celular (FSC – *forward scatter*) da *E. coli* marcada com PI e TO na presença de nanopartículas de sílica, (B) gráfico de pontos do corante PI versus o corante TO. Os quadrantes mostram a porcentagem de bactéria marcada com cada corante. (C) Histograma de *E. coli* na presença de nanopartículas de sílica marcadas com TO e (D) Histograma de *E. coli* na presença de nanopartículas de sílica marcadas com PI.

A **Figura 3A** mostra o gráfico de pontos de granulosidade (SSC – *side scatter*) versus área superficial (FSC – *forward scatter*) da *E. coli* em presença de nanopartículas de sílica marcada com PI e TO. É possível notar que há uma pequena sobreposição dos pontos referentes às nanopartículas de SiO_2 e aos referente à *E. coli*. Já na **Figura 3B**, no gráfico de pontos do corante PI versus o corante TO, é possível verificar que, em sentido horário, o primeiro

quadrante se refere à porcentagem de células marcadas com PI (cerca de 4,4%), o segundo quadrante mostra a porcentagem de células marcadas com ambos os corantes (cerca de 0,6%), o terceiro quadrante apresenta a porcentagem de SiO₂ marcadas com TO (cerca de 13,7%) e por último, o quarto quadrante, mostra a porcentagem de células que não foi marcada por nenhum dos dois corantes (cerca de 81,2%). De acordo com a **Figura 3C**, podemos notar que há duas populações presentes no sistema, mostrado pelos dois picos no histograma. Somente 13% das células foram marcadas e se referem às células de *E. coli*, pois as nanopartículas de SiO₂ não são marcadas com TO. Porém, o histograma mostrado na **Figura 3D**, mostra apenas a contribuição de uma população, pois tanto as nanopartículas de SiO₂ quanto as células de *E. coli* são marcadas com o PI, o que interfere na identificação das células mortas.

De acordo com os resultados obtidos através da citometria de fluxo, não foi conclusivo se a técnica poderia ou não ser utilizada para o nosso sistema que consiste de nanopartículas revestidas por sílica. Isso devido ao fato de que as nanopartículas de sílica interagem com o corante iodeto de propídeo (PI), que é utilizado na marcação de células mortas e/ou danificadas.

Além disso, foi observado que as nanopartículas de sílica não interagem com o corante laranja de tiazol (TO). No entanto, as células de *E. coli* também não conseguiram interagir completamente com esse corante. Isso porque, para organismos gram-negativos, a camada de lipopolissacarídeo interfere na captação desse corante. Por isso, foi necessário tratar as células com EDTA, que é responsável pela destruição dessa camada de lipopolissacarídeo. Apesar disso, mesmo com esse tratamento, foi observado que não foi possível marcar todas as células presentes no experimento. Dessa forma, não foi possível

utilizar tal metodologia para tentar eliminar os possíveis erros de amostragem e contagem das células viáveis, em nosso experimento.

***10.4. Artigo submetido (aceito para publicação em 11/12/2013 -
Langmuir)***

**Partial aggregation of silver nanoparticles induced by capping
and reducing agents competition**

Jessica Fernanda Affonso de Oliveira^{1,2}, Mateus Borba Cardoso^{1,2*}

¹ Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192,
Campinas, SP, Brazil,

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970,
Caixa Postal 6154, Campinas, SP, Brazil,

* Corresponding author (M.B.C.)

E-mail: cardosomb@lnls.br;

Fax: +55 19 3512 1004;

Tel: +55 19 3512 1045

Abstract

It is well known that nanomaterials properties and applications are dependent on size, shape and morphology of these structures. Among nanomaterials, silver nanoparticles (AgNPs) have attracted attention since they present considerably versatile properties, such as variable surface area to volume ratio, which is very useful for many biomedical and technological applications. Within this scenario, small nanoparticle aggregates can have their properties reduced due to the increased size and alterations in their shape/morphology. In this work, silver nanoparticles aggregation was studied through the chemical reduction of silver nitrate in presence of sodium borohydride (reducing agent) and sodium citrate (capping agent). By changing the amount of reducing agent along the reaction, unaggregated and partially aggregated samples were obtained and characterized by UV-Vis, zeta-potential and SAXS techniques. pH was measured in every step of the reaction in order to correlate these results with the ones obtained from structural techniques. The addition of the reducing agent first causes the reduction of Ag^+ to silver nanoparticles. For higher concentrations of sodium borohydride, the average AgNPs size is increased and NPs aggregation is observed. It was found that zeta potential and pH values have a strong influence on AgNPs formation, since reducing agent addition can induce the partial removal of citrate weakly associated on the AgNPs surface and increase the ionic strength of the solution, promoting partial aggregation of the particles. This aggregation state was duly identified by coupling SAXS, zeta potential and pH measurements. In addition, SAXS technique showed that the aggregates formed along the process are elongated-like particles due to the exponential decay evidenced through SAXS curves.

Keywords: Silver nanoparticles, chemical reduction, SAXS, zeta potential, pH

1. Introduction

Nanomaterials presenting tailored chemical and physical properties have been the focus of many areas of chemistry, physics and material science as their chemical and physical characteristics strongly differ from their corresponding bulk materials.¹⁻⁵ Among nanomaterials, silver nanoparticles (AgNPs) have attracted attention due to their versatile properties.^{2, 6, 7} For example, AgNPs can be potentially used in emerging areas such as nanomedicine⁸⁻¹⁰ since these nanoparticles are considered a promising alternative to overcome the increase of bacterial resistance to antibiotics.¹¹⁻¹³ Thus, several works have been dedicated to develop AgNPs synthesis and characterization tools in order to better understand silver nanoparticle properties and improve their applications.^{2, 14, 15}

Several techniques have been employed to study and detect aggregates as a product of a chemical reaction.¹⁶ Among them, UV-Vis and electron microscopy (EM) techniques have been considered as the most reliable and used ones.^{5, 17-19} UV-Vis spectra of metal nanoparticles usually present absorption features due to the collective electronic interactions between metal atoms and electrons which are known as surface plasmons (SP).²⁰ SP bands are usually characterized by wavelength maximum and peak intensity, which are commonly related to particle shape, size, concentration and dielectric medium properties.²⁰⁻²³ In general, aggregates can be easily identified when characterized by UV-Vis since their wavelength peak position (λ) is significantly shifted to larger values of λ . In parallel, electron microscopy has been used as a tool for imaging either non-aggregated or aggregated samples. Differently from other spectroscopy techniques, EM directly provides real images of the studied systems.⁵ However, UV-Vis presents sensitivity

problems since it is not reliable to distinguish between a non-aggregated sample and a slightly aggregated system because the resulting shift is very subtle. Similarly, EM is a local technique and the obtained images of a slightly aggregate system are always dubious since it could be a visualization effect of two or more nanoparticles together or an artifact due to the drying process.

On the other hand, small-angle X-ray scattering (SAXS) is a powerful technique for studying nanoparticles in solution since it is noninvasive technique and allows the direct characterization of the colloidal solution without any pretreatment.^{24, 25} Consequently, it avoids any possible experimental aggregation artifact due to the drying process.¹ Different from EM, SAXS experimental results are an ensemble of a high statistical measurement because a very large number of NPs are probed during the experiment.⁸ SAXS is often used to provide information about size, size distribution, polydispersity, etc.¹ However, SAXS provides only structural information about the sample. On the other hand, when SAXS is associated to other physico-chemical characterization techniques, a broader view of the entire system can be obtained. For instance, zeta potential and pH measurements provide stability information that when combined with structural evidences obtained by SAXS provide a broad and clearer view of NPs formation and aggregation.

In this paper, we study the effect of NaBH_4 concentration during the growth and AgNPs partial aggregation obtained in the same reaction batch. Nanoparticles aggregation phenomenon is an important and fundamental subject when related to many applications of NPs, such as in biomedicine and optical-technological fields. Here, we used a combination of SAXS, UV-Vis, zeta potential and pH measurements to investigate AgNPs and their aggregates

formation. The aggregation of AgNPs was attributed to the ionic strength increase caused by NaBH₄ addition that reduces the electrical double layer thickness and induces particle-to-particle interaction increasing the aggregation level.²⁶ An in depth study is presented in order to identify the formation of aggregates in parallel to efforts of obtaining structural information about them.

2. Experimental Procedure

2.1. Materials

Silver nitrate (AgNO₃), trisodium citrate (TSC) and sodium borohydride (NaBH₄) were obtained from Sigma-Aldrich. All chemicals and reagents were used as received without further purification. Water used in all procedures was obtained from a water purification system (Purelab from ELGA) and had a measured resistivity of 18.2 MΩ cm⁻¹.

2.2. Silver nanoparticles synthesis

Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized as previously described by Nezhad and co-workers.²⁷ Briefly, 0.0102 g of AgNO₃ and 0.0141 g of TSC were dissolved in 200 mL of deionized water, under vigorous stirring while the solution was kept in an ice-bath. NaBH₄ aqueous solution (0.1 M) was added at a rate of 10 μL/30 s and we collected a 20 mL sample when 100, 200, 300, 400, 500, 600 μL of NaBH₄ were respectively reached. The obtained samples were named A1, A2, A3, A4, A5 and A6 and stored in total absence of light. As the concentration of NaBH₄ increases from A1 to A6, the [NaBH₄]/[Ag⁺] ratio was determined and presented in Table 1.

Table 1. Ratio of NaBH₄ and Ag⁺ [NaBH₄/Ag⁺] used for preparing the samples, dilution factor (*df*) employed for samples dilution, absorption maximum position (λ), radius of the particles (*R*), radius standard deviation (σ) and forward scattering (*I*₀) obtained from SAXS.

Sample	[NaBH ₄ /Ag ⁺]	<i>df</i>	λ (nm)	<i>R</i> (nm) ^a	σ ^a	<i>I</i> ₀ (cm ⁻¹)
A1	0.17	0.86	391	2.3 ± 0.2	0.47	0.86
A2	0.20	2.40	391	2.9 ± 0.1	0.42	1.10
A3	0.23	4.45	392	3.4 ± 0.1	0.27	1.29
A4	0.27	6.00	392	3.4 ± 0.2	0.28	1.54
A5	0.30	7.07	393	3.5 ± 0.1	0.28	1.70
A6	0.33	7.46	393	3.5 ± 0.1	0.29	1.73

^a Values obtained from SASfit

2.3. Nanoparticles characterization

Surface plasmon resonance of silver nanoparticles was investigated at room temperature with Agilent 8453 equipment using UV-Vis quartz cuvette (10 mm optical length). Deionized water was recorded as reference before recording the absorbance spectrum of the samples. All samples were diluted until the absorption maximum of 1.0 was reached since the optical density of the as-synthesized samples was excessively high for recording the spectrum.

Zeta potential measurements were performed at room temperature using Malvern Zetasizer – Nano ZS90 equipment. An electric field was applied to the AgNPs solution, which caused the particles movement. The velocity associated to this movement is related to zeta potential and was measured using a laser technique called M3-PALS (Phase analysis Light Scattering). It enables electrophoretic mobility calculation and, consequently, the zeta potential of particles. All measurements were made in triplicate.

pH measurements were performed using Orion Analyser pHmeter (Model 410A). First of all, the electrode was calibrated using three-point

calibration with standard buffers at pH of 4, 7 and 10. Then, the electrode was immersed in the AgNPs solution and the pH values were acquired simultaneously as NaBH₄ solution was added.

Small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements were carried out on the D1B-SAXS1 beamline at the LNLS in order to determine the size, shape, polydispersity and aggregation state of silver nanoparticles. The scattered X-ray beam presenting wavelength (λ) of 1.488 Å was detected on a Pilatus 300k detector. The sample-to-detector distance was 944.2 mm, covering a scattering vector q ($q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$) ranging from 0.1 to 2 nm⁻¹, where 2θ = scattering angle.

The measurements were performed at room temperature and silver behenate was measured under the same conditions to calibrate the sample-to-detector distance, the detector tilt and the direct beam position. Transmission, dark current and mica sheet corrections were performed. The normalized scattering image of the samples was then subtracted from the normalized scattering image of pure water and the isotropic result was radially averaged to obtain the $I(q)$ vs q . The absolute calibration was achieved by the use of water as a standard of known differential cross section ($1.65 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$).²⁸

The $I(q)$ vs q scattering profiles of silver nanoparticles were fit by using the form factor of homogeneous spheres

$$I(q) = N V^2 (\Delta\rho)^2 \left(\frac{3[\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3} \right)^2 \quad (\text{Equation 1})$$

where N is the number of particles per unit volume, V is the volume of the particle, R is the radius of the particle and $\Delta\rho$ is the contrast difference between silver nanoparticles and the solvent. The form factor was associated with a log-normal distribution where μ and σ are the mean and standard

deviation of the variable's natural logarithm, respectively. Fitting procedures were carried out using the SASfit software.

3. Results and discussion

All nanoparticles studied along this work were synthesized from the same reaction batch and UV-Vis spectroscopy was the first characterization technique employed to verify the formation of AgNPs. We have arbitrarily decided to dilute the solutions until the absorption maximum had intensity equal to 1.0 since all samples were excessively concentrated to be analyzed in our spectrometer. Table 1 gives the dilution factor values (df) which is defined by $df = \frac{\text{volume of water used for diluting the sistem}}{\text{volume of AgNP solution}}$ and indicates the overall concentration of AgNPs in every sample. In agreement with literature results, it was found that the increase in NaBH_4 amount led to an increase of the absorbance maximum.²⁹ As a consequence, larger df values are related to more concentrated solutions.

Figure 1A presents UV-Vis absorption spectra for all silver nanoparticles after samples dilution.

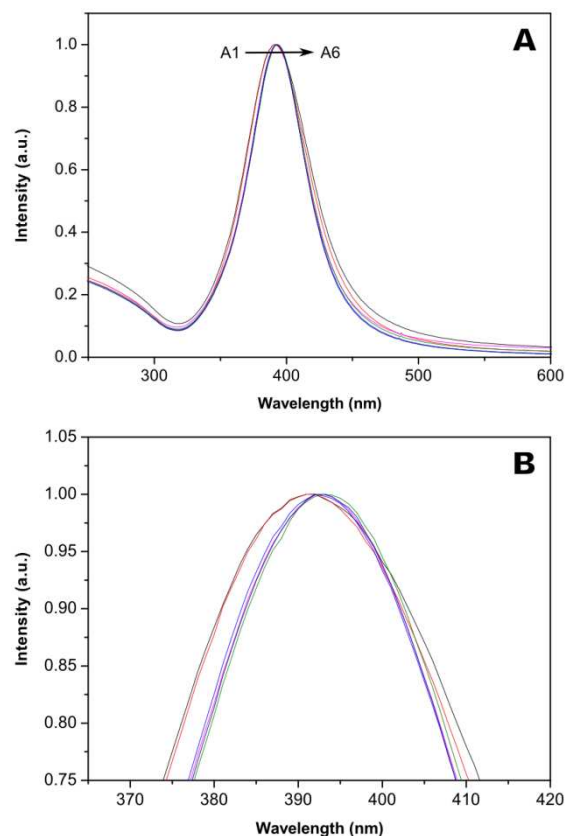


Figure 1. (A) UV-Vis absorption spectra of silver nanoparticles synthesized after sample dilution. Sample A1 to A6 are observed from left to right as indicated by the arrow. (B) Enlargement of the maximum absorption region of all spectra presented in (A).

Figure 1A shows that the wavelength (λ) position for all samples is located at ~ 390 nm which is an indication of AgNPs formation within the range of few nanometers-size.⁸ In addition, it is observed that the spectra of all samples are reasonably symmetric in shape. According to Mie's theory, optical properties of metal nanoparticles are dominated by localized surface plasmon resonances (LSPR) and the profile of LSPR bands depends on the shape of the particle.⁸ Depending on their symmetry, two or more plasmon bands are expected for non-spherical (irregular) particles.^{8, 30} Nevertheless, all NPs presented only a single absorption band (Figure 1A) suggesting that nanoparticles synthesized along this work are likely to present spherical shape.

Due to the significant overlap of the spectra in Figure 1A, the enlargement of the maximum absorption region is presented in Figure 1B. Samples A1 and A2 presented λ located at 391 nm while the other samples are slightly red shifted to 392-393 nm. The λ values are given in Table 1 where we observe a subtle increasing tendency while the $[\text{NaBH}_4]/[\text{Ag}^+]$ ratio is augmented. This shift to longer wavelengths might be related to a particle size increase.

In order to validate the UV-Vis findings related to shape and size, SAXS measurements were performed. Figure 2 shows the experimental SAXS curves for the as-synthesized sample solutions and their corresponding best fittings.

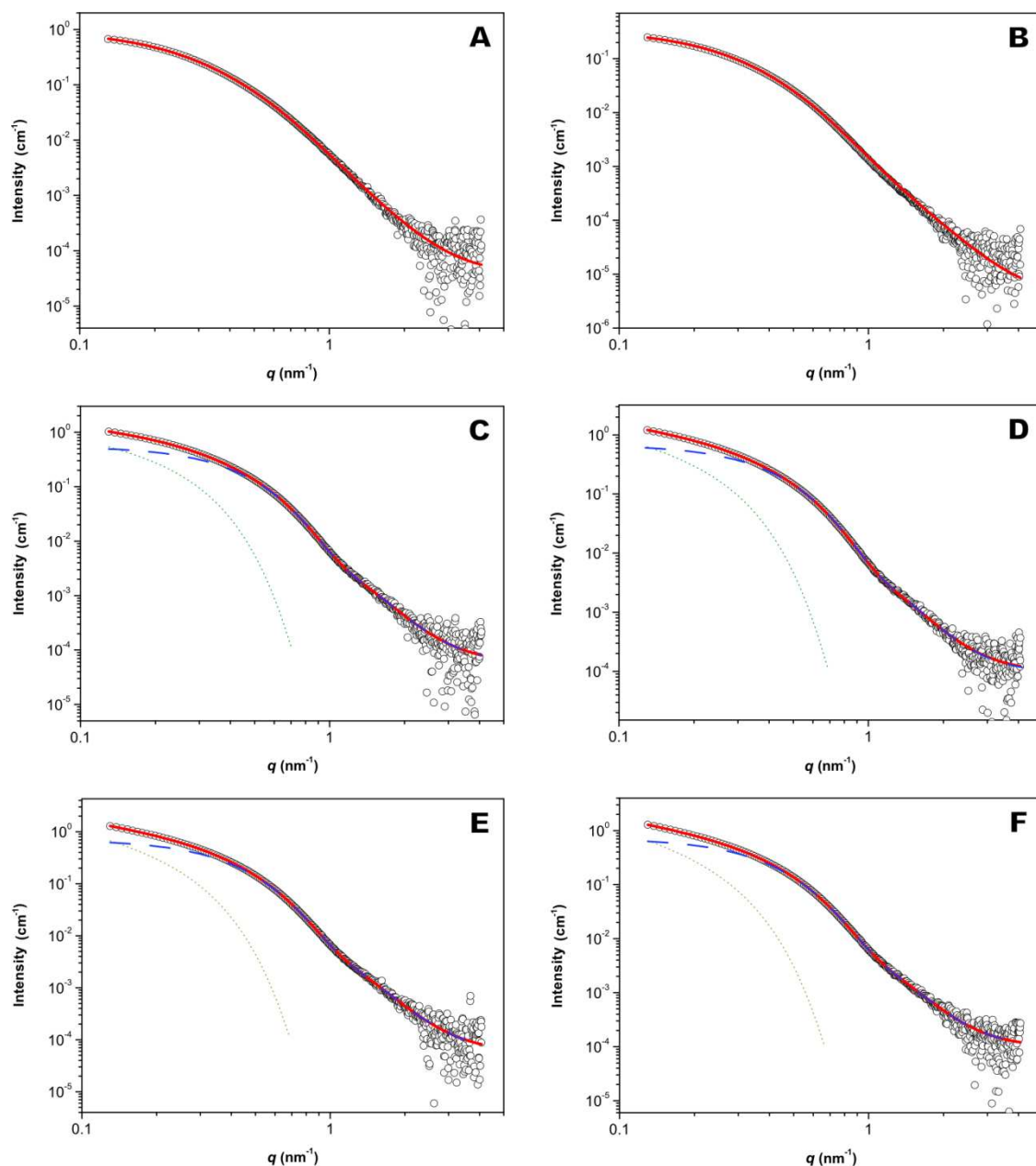


Figure 2. SAXS patterns for silver nanoparticles samples and their corresponding fittings (solid line). (A) A1, (B) A2, (C) A3, (D) A4, (E) A5 and (F) A6. Scattering intensities are provided in absolute units.

Samples A1 and A2 (Figures 2A and 2B, respectively) have scattering profiles described by a polydisperse spherical form factor as described in Equation 1. Both scattering profiles can be divided in three distinct parts

highlighting structural characteristics of the samples.^{31, 32} At low- q region ($q < 0.3 \text{ nm}^{-1}$), a typical shoulder-type Guinier region is seen. This region is important for determining the radius of the particle. At mid- q region ($q \sim 1.0 \text{ nm}^{-1}$), a subtle oscillation is observed and can be also related to the overall size of AgNPs as well as to their degree of polydispersity. Finally, the high- q region ($q > 1.1 \text{ nm}^{-1}$) corresponds to the q^{-4} exponential decay, which is associated to the smooth surface of AgNPs, followed by the background. The mean radius obtained from the fits for samples A1 and A2 are, respectively, 2.3 and 2.9 nm as shown in Table 1.

Although this conventional approach can also be used for samples A3-A6, we found significant deviations at low- q region which have hindered the proper fitting by using exclusively the spherical form factor.^{24, 33} These deviations could be assigned either to the aggregated-like state of the nanoparticles or to the presence of larger structures. The presence of these larger particles is discarded since the fractal concept used to fit the SAXS data (Equation 2) does not agree with the scattering curve of a bimodal distribution. Thus, in order to fit the whole scattering curve, we have introduced Power-law regime (q^P) at low- q region to extract structural information about the aggregates. The cut-off concept described by Beaucage was used due to the correlations between elementary AgNPs and their aggregates.^{34, 35} Finally, the equation used to fit the data is

$$I(q) = N V^2 (\Delta\rho)^2 [B q^P \exp\left(\frac{-q^2 D^2}{3}\right) + \left(\frac{3[\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3}\right)^2] \quad (\text{Equation 2})$$

where B is a scaling factor specific to the type of Power-law regime, P is defined according to the regime in which the exponent Power-law decays and

D is the cut-off dimension. Thus, the scattering curves presented in Figures 2C-F can be divided in two different parts: (a) low- q region where the scattering curves decay following a Power-law regime (dotted line) and (b) mid to high- q region where conventional spherical form factor is used (dashed line).

Taking into account the low- q region, B scaling factor is reduced from 0.16 (sample A3) to 0.08 (sample A6) when the amount of NaBH_4 is increased into the system. It probably indicates that the overall amount of aggregates is kept almost constant along the reaction since the scattering related to the spherical form factor is increased with the addition of reducing agent while the total scattering weight from the aggregates is reduced (B scaling factor reduction) due to the formation and increase of AgNPs. The exponent P is invariable along the reaction process. $P \sim 1$ was observed for samples A3-A6 which suggests that the aggregation process occurs preferentially along an axis of symmetry since $P = 1$ is related to elongated structures. Two cut-off D parameters were tested. Initially, radius of the particles was used as D and fits of low chi-square values were obtained. An example of a fit where $D = \text{radius of the particle}$ is presented in Figure S1 of Supporting Information Material. It is possible to observe that the model is not able to fit the subtle oscillation region at $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$ as indicated by the arrow. Later, the diameter of the particles was used as D and better fits were obtained (Figures 2C-F) when compared to the one presented of Figure S1. By using $D = \text{diameter of the particle}$, it was possible to duly fit the region at $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$ and, consequently, the chi-square was reduced. The mid to high- q region in Figures 2C-F is attributed to the spherical form factor contribution like those already presented in Figures 2A and B. Although a shoulder-type Guinier region is not seen for

samples A3-A6, the oscillation at $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$ allows determining the average size and the polydispersity of AgNPs. Samples A3 and A4 present AgNPs radius of 3.4 nm while, for samples A5 and A6, the average radius is 3.5 nm. The chi-squares determined for different radius are presented in Figure S2 of Supporting Information Material.

Figure 3 presents log-normal radius distributions for all samples obtained from SAXS fittings. It must be pointed out that for samples A3-A6, the Power-law region was not taken into account for obtaining these radius distributions.

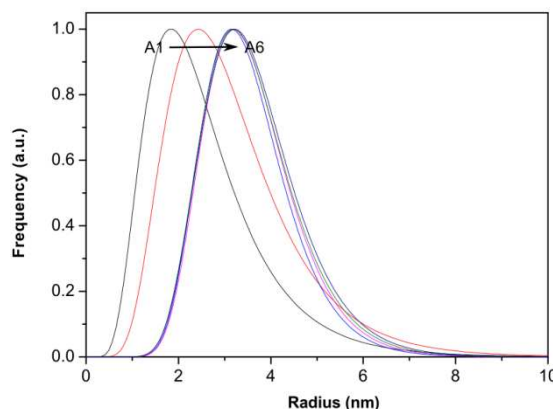


Figure 3. Particle size distribution of all silver nanoparticles samples obtained from SAXS fittings presented in Figure 2.

As expected, sample A1 presents the smaller average size and, consequently, its radius distribution is located in the left region of Figure 3. Once the concentration of NaBH_4 starts to increase, the average AgNP size is shifted to larger values of radius. Thus, sample A2 presents its distribution shifted to larger values of radius if compared to sample A1. On the other hand, samples A3-A6 have shown a reasonable overlap among their radius distributions. The maximum of radius distribution is very similar for samples

A3-A6 and the differences on the average radius are obtained since the distributions widths are slightly different.

In Figure 4, the forward scattering intensity (I_0 ; experimental intensity extrapolated to $q = 0$) from SAXS data and the already defined dilution factor (df) from UV-Vis measurements are plotted against NaBH_4 concentration. It is known that I_0 is related to number of particles in solution (concentration), size and polydispersity of nanoparticles (Equation 1). Also, the absorption maximum intensity is related to concentration of the solution. As a consequence, larger I_0 and df values are related to more concentrated solutions.

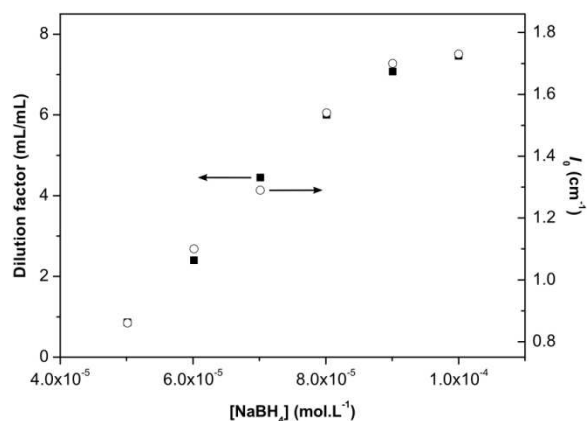


Figure 4. Forward scattering SAXS intensity (I_0) and dilution UV-Vis factor (df) plots as a function of NaBH_4 concentration. Sample A1 corresponds to the leftmost point in the graph, samples A6 is the rightmost point in the figure and samples A2 to A5 are respectively plotted between samples A1 and A6.

It is clear that I_0 and df factors increase almost linearly with the reducing agent concentration for the first four less concentrated NaBH_4 solutions. On the other hand, a subtle deviation of the linearity can be seen from sample A5 ($[\text{NaBH}_4] = 9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) onwards which may indicate that the AgNPs concentration become constant and no more formation of

nanoparticles are noticed. A good agreement between both approaches is observed since a significant overlap between them is observed. Nevertheless, neither the variations in I_0 intensity nor in the dilution factor were able to precisely infer about possible aggregates formation. Although I_0 intensity is quantitatively used in SAXS experiments, probably it is not sensitive enough to point out a partially aggregated sample. Similarly, df values associated to the subtle shift in the maximum position of UV-Vis spectra are not conclusive to confirm aggregates formation. On the other hand, modeling of SAXS data presented in Figure 2 points out meaningful differences when the synthesized samples are compared. Samples A1 and A2 (those obtained using, respectively, $[\text{NaBH}_4] = 5 \times 10^{-5}$ and $6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) are well fitted using only a sphere form factor while a more complex fitting approach is used to adjust samples A3-A6.

Although several works have been dedicated to study the structural evolution of nanoparticles (growth and aggregation),^{1, 24, 36} to the best of our knowledge, there are no reports correlating this structural evolution and the overall charge of the system. It is suggested that the electrostatic stabilization, which is described by DLVO theory (Derjaguin and Landau, Verwey and Overbeek), is strongly correlated with the formation mechanism of NPs.^{37, 38} However, the overall stability of a given system is defined by its surface charge, which is based on the aggregation tendency and in the possible redispersibility of NPs.⁷ Considering that the surface charge density is not directly measured, a relative term, called zeta potential (ζ), can be obtained.²⁶ ζ is defined as the potential at the plane (slipping or shear plane) where the liquid velocity relative to the particle is zero. It is related to the surface charge of the particle and the nature and composition of the surrounding medium

(pH, conductivity). Zeta potential measurements were obtained in order to correlate electric potential information with structural evidences obtained by SAXS. Figure 5 shows the zeta potential for all samples.

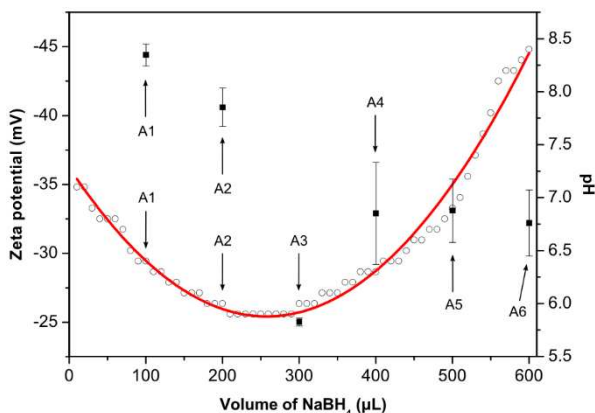


Figure 5. Zeta potential (black squares) and pH variation (white circles) plots as a function of NaBH₄ concentration. Red line indicates parabolic fit for pH values as the NaBH₄ concentration increases. Both zeta potential and pH values for samples A1 to A6 are observed from left to right, indicated by arrows.

Samples A1 and A2 present a zeta potential of -44.4 ± 0.8 and -40.6 ± 1.4 mV, respectively. When the volume of NaBH₄ is increased and sample A3 is obtained, a significant increase in ζ can be observed (-25.1 ± 0.3 mV). Following the addition of the reducing agent, it is possible to observe that zeta potential values are reduced and kept almost constant around -32.5 mV for samples A4, A5 and A6. Similar results were obtained by Zhang et al.³⁹ for zeta potentials of citrate-stabilized AuNP suspensions at pH range of 5-10. To be considered stable, solutions must have zeta potential above +30 mV or below -30 mV.⁴⁰ It suggests that sample A3 is not within the optimal stability range when ζ is taken into account.

Further, the pH value is known to have influence on the zeta potential since it directly affects the ionization and adsorption mentioned above.³⁷ For

the samples prepared in this work, the negative surface charges depend on the degree of ionization of COOH citrate groups (used as capping agent), the adsorption of borate species and the counter ions in the diffuse double layer.^{38,}

⁴¹ The pH variation during the synthesis procedure was simultaneously measured while adding NaBH₄ to the solution. Figure 5 also shows the pH variation as a function of the addition of NaBH₄ during the synthesis process. The pH data presents a parabolic shape where the minimum found through the fit corresponds to 257 μ L of NaBH₄.

Although it is not possible to infer the exact nature related to the changes seen in Figure 5, we speculate that this stability decrease is probably associated to changes on AgNPs surface. In our system, AgNPs present negative charges which are most likely related to the adsorption of citrate and borate ions on NPs surface. It is known that cations can interact and enter into the diffuse ionic layer around AgNPs as counterions, through electrostatic attractive forces.⁴¹ It can clearly change the ionic strength of the solution and result in changes like the ones observed in Figure 5. The ionic strength increase can reduce the electrical double layer thickness which would induce particle-to-particle interaction increasing the aggregation level.²⁶ Thus, we suggest that the increase in NaBH₄ concentration (from sample A1 to A3) induce the partial removal of citrate weakly associated with the AgNPs surface while the ionic strength of the solution is augmented. It would explain the formation of small aggregates seen by SAXS. In parallel, we speculate that the exact point of formation of these large species is located in the minimum of the parabola of Figure 5. Further, this minimum is located between samples A2 and A3 and can be correlated with ζ values. Comparing both samples, sample A2 is within the stable range for zeta potential while sample A3 is

considered as a non-stable solution. It reinforces the SAXS modeling and interpretation where few aggregates can be identified. We further suggest that after this minimum, the pH starts to increase again making it a stable system where no more aggregates are formed during the synthesis process (aggregates amount is kept constant). Zeta potential measurements also support this hypothesis since samples A4-A6 present ζ of about -32.5 mV. We speculate that the decrease and increase in AgNPs instability (before and after parabola minimum) can be related to changes in the $\text{BH}_4^-/\text{B}(\text{OH})_4^-$ ratio associated to pH variations. It is known that NaBH_4 reacts slowly with water and forms strongly basic metaborate ions.³⁹ Thus, we observe that the pH value of the mixture is increased when NaBH_4 is added after the minimum of Figure 5 is reached.

Based on these results, we proposed a schematic representation (Figure 6) where growth and partial aggregation of the samples are emphasized.

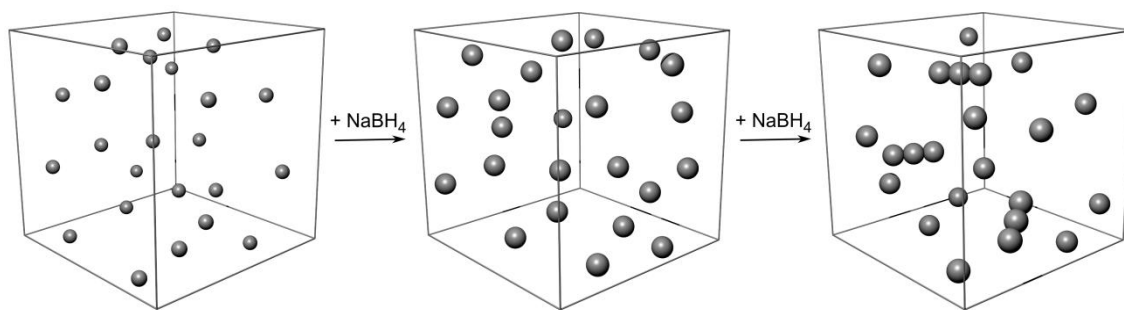


Figure 6. Scheme of AgNPs aggregation as the $[\text{NaBH}_4]/[\text{Ag}^+]$ ratio is augmented. The first box shows the AgNPs formation with the NaBH_4 addition. The transition from leftmost to the central box shows an increase in the NPs size. As the NaBH_4 concentration is increasing, the ionic strength increase and induce the partial removal of citrate weakly associated on the AgNPs surface. Thus, the rightmost box indicates a system where a coexistence of unaggregated and chainlike structures are seen as a result of the aggregation process.

We observed that the addition of NaBH_4 initially causes Ag^+ reduction and consequent formation of AgNPs (leftmost box of Figure 6). When the ionic strength of the solution is augmented, the increase of NaBH_4 concentration (from sample A1 to A3) can induce the partial removal of citrate weakly associated on the AgNPs surface. Thus, the average size of AgNPs is shifted to larger values of radius as presented in Figure 3 (middle box of Figure 6). Further, for higher NaBH_4 concentrations, the ionic strength increases and reduces the electrical double layer thickness. It induces particle-to-particle interaction increasing the aggregation level.²⁶ NPs aggregation is observed when subtle deviations are seen in the scattering patterns and zeta potential values of samples A3 – A6 (rightmost box in Figure 6). These deviations in low- q scattering patterns were assigned to an exponential power-law decay that follows the q^{-1} trend. It suggests that the aggregation process occurs preferentially along an axis of symmetry since q^{-1} decay is related to elongated structures, resulting in AgNPs possibly self-assembled as “chainlike” structures. Also, sample A3 is located within a non-stable zeta potential range, reinforcing the evidences showed by SAXS data of few aggregates formation.

It is also important to mention that after sample A6, if we keep adding reducing agent in our reaction medium, large, multimodal and polydisperse aggregates are formed.²⁵ However, this subject is out the scope of our work since this kind of sample cannot be used in technological processes due to the lack of size control. Finally, we suggest that the approach presented here can be used to identify nanoparticles aggregation and efficiently employed for scientists and industry as a tool to optimize biomedical and technological applications of NPs.

4. Conclusion

In this paper, we describe the partial AgNPs aggregation induced through chemical reduction of silver nitrate by sodium borohydride using sodium citrate as a capping agent. Along the process, it was evidenced that spherical AgNPs were formed and their radius increased by augmenting the amount of the reducing agent. It was found that when a critical amount of the reducing agent is reached, SAXS profiles deviate from the typical patterns of conventional spheres. Simultaneously, zeta potential and pH are deeply changed and these abrupt variations are related to decrease of nanoparticle stability. It is thought that NaBH_4 addition can induce the partial removal of citrate weakly associated on the AgNPs surface, increasing the ionic strength of the solution, and promoting partial aggregation of the particles. By combining these different techniques, it was possible to infer about the partial aggregate state of the AgNPs while SAXS exponential decay results indicated that these aggregates present an elongated-like aspect. Finally, we anticipate that the multi-technique approach described here seems to be very efficient and sensitive to probe nanoparticle aggregates, which is an important phenomenon to be considered when biomedical and technological applications are being envisaged.

5. Acknowledgements

First of all, authors would like to thank Fapesp (project number: 2011/21954-7), CNPq (project number: 476798/2010-8) and LNLS for all financial support along this work. J.F.A.O. thanks Fapesp for the fellowship granted through the project 2011/15937-2. We acknowledge LNLS for SAXS

measurements and the D1B-SAXS1 beamline staff for all support during experiments. We thank Harry Westfahl Jr. for fruitful discussions about SAXS modeling and Ariadne Tuckmantel Bido for her initial AgNPs synthesis guidance.

6. References

1. Steinfeldt, N., In Situ Monitoring of Pt Nanoparticle Formation in Ethylene Glycol Solution by SAXS - Influence of the NaOH to Pt Ratio. *Langmuir* **2012**, 28, (36), 13072-13079.
2. Amany, A.; El-Rab, S. F. G., Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity. *Der Pharm. Chem.* **2012**, 4, (1), 53-65.
3. Mulfinger, L.; Solomon, S. D.; Bahadory, M.; Jeyarajasingam, A. V.; Rutkowsky, S. A.; Boritz, C., Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J. Chem. Educ.* **2007**, 84, (2), 322-325.
4. Pillai, Z. S.; Kamat, P. V., What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? *J. Phys. Chem. B* **2003**, 108, (3), 945-951.
5. Nakamura, K.; Kawabata, T.; Mori, Y., Size distribution analysis of colloidal gold by small angle X-ray scattering and light absorbance. *Powder Technol.* **2003**, 131, (2), 120-128.
6. Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolár, M.; Vecerová, R.; Pizúrová, N.; Sharma, V. K.; Nevečná, T. j.; Zboril, R., Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, (33), 16248-16253.
7. Sondi, I.; Goia, D. V.; Matijevic, E., Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *J. Colloid Interf. Sci.* **2003**, 260, (1), 75-81.
8. 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. *J. Mat. Chem.* **2011**, 21, (33), 12267-12273.
9. Dang Viet, Q.; Sarawade, P. B.; Hilonga, A.; Kim, J.-K.; Chai, Y. G.; Kim, S. H.; Ryu, J.-Y.; Kim, H. T., Preparation of silver nanoparticle containing silica micro beads and investigation of their antibacterial activity. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, 257, (15), 6963-6970.
10. Gorup, L. F.; Longo, E.; Leite, E. R.; Camargo, E. R., Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *J. Colloid Interf. Sci.* **2011**, 360, (2), 355-358.
11. 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* **2005**, 16, (10), 2346-2353.
12. Martinez-Gutierrez, F.; Thi, E. P.; Silverman, J. M.; de Oliveira, C. C.;

- Svensson, S. L.; Hoek, A. V.; Morales Sanchez, E.; Reiner, N. E.; Gaynor, E. C.; Pryzdial, E. L. G.; Conway, E. M.; Orrantia, E.; Ruiz, F.; Av-Gay, Y.; Bach, H., Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomed.-Nanotechnol.* **2012**, 8, (3), 328-336.
13. Fayaz, A. M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P. T.; Venketesan, R., Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed.-Nanotechnol.* **2010**, 6, (1), 103-109.
 14. Kim, D.; Jeong, S.; Moon, J., Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. *Nanotechnology* **2006**, 17, (16), 4019-4024.
 15. Vertelov, G. K.; Krutyakov, Y. A.; Efremenkova, O. V.; Olenin, A. Y.; Lisichkin, G. V., A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2008**, 19, (35), 355707 (7pp).
 16. Gilbert, B.; Ono, R. K.; Ching, K. A.; Kim, C. S., The effects of nanoparticle aggregation processes on aggregate structure and metal uptake. *J. Colloid Interf. Sci.* **2009**, 339, (2), 285-295.
 17. Li, X.; Lenhart, J. J.; Walker, H. W., Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles. *Langmuir* **2012**, 28, (2), 1095-1104.
 18. Thanh, N. T. K.; Rees, J. H.; Rosenzweig, Z., Laser-based double beam absorption detection for aggregation immunoassays using gold nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 374, (7-8), 1174-1178.
 19. Rong, W.; Ding, W.; Madler, L.; Ruoff, R. S.; Friedlander, S. K., Mechanical properties of nanoparticle chain aggregates by combined AFM and SEM: Isolated aggregates and networks. *Nano Lett.* **2006**, 6, (12), 2646-2655.
 20. Link, S.; El-Sayed, M. A., Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, (21), 4212-4217.
 21. Thogersen, A.; Bonsak, J.; Fosli, C. H.; Muntingh, G., Size distributions of chemically synthesized Ag nanocrystals. *J. Appl. Phys.* **2011**, 110, (4), 1-6.
 22. Sileikaite, A.; Puiso, J.; Prosycevas, I.; Tamulevicius, S., Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. *Mat. Sci. (Medzagotyra)* **2009**, 15, (1), 21-27.
 23. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, (3), 668-677.

24. Ingham, B.; Lim, T. H.; Dotzler, C. J.; Henning, A.; Toney, M. F.; Tilley, R. D., How Nanoparticles Coalesce: An in Situ Study of Au Nanoparticle Aggregation and Grain Growth. *Chem. Mater.* **2011**, 23, (14), 3312-3317.
25. de Oliveira, L. F.; de Gonçalves, J. O.; de Gonçalves, K. A.; Kobarg, J.; Cardoso, M. B., Sweeter But Deadlier: Decoupling Size, Charge and Capping Effects in Carbohydrate Coated Bactericidal Silver Nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2013**, 9, (11), 1817-1826.
26. Prathna, T. C.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A., Studies on aggregation behaviour of silver nanoparticles in aqueous matrices: Effect of surface functionalization and matrix composition. *Colloid Surface A* **2011**, 390, (1-3), 216-224.
27. Nezhad, M. R. H.; Karimi, M. A.; Shahheydari, F., A sensitive colorimetric detection of ascorbic acid in pharmaceutical products based on formation of anisotropic silver nanoparticles. *Sci. Iran. Trans. F: Nanotchnol.* **2010**, 17, (2), 148-153.
28. Dreiss, C. A.; Jack, K. S.; Parker, A. P., On the absolute calibration of bench-top small-angle X-ray scattering instruments: a comparison of different standard methods. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, 39, 32-38.
29. 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. *Colloid Surface A* **2010**, 364, (1-3), 19-25.
30. Chudasama, B.; Vala, A. K.; Andhariya, N.; Mehta, R. V.; Upadhyay, R. V., Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities. *J. Nanopart. Res.* **2010**, 12, (5), 1677-1685.
31. Glatter, O.; Kratky, O., *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press: New York, 1982.
32. Feigin, L. A.; Svergun, D. I., *Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering*. Plenum Press: New York, 1987.
33. Schmitt, J.; Impérator-Clerc, M.; Michaux, F.; Blin, J.-L.; Stébé, M.-J.; Pedersen, J. S.; Meneau, F., Formation of Nanostructured Silica Materials Templated with Nonionic Fluorinated Surfactant Followed by in Situ SAXS. *Langmuir* **2013**, 29, (6), 2007-2023.
34. Beaucage, G., Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **1995**, 28, (6), 717-728.
35. Beaucage, G., Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension. *J. Appl. Crystallogr.* **1996**, 29, (2), 134-

146.

36. Gondikas, A. P.; Masion, A.; Auffan, M.; Lau, B. L. T.; Hsu-Kim, H., Early-stage precipitation kinetics of zinc sulfide nanoclusters forming in the presence of cysteine. *Chem. Geol.* **2012**, 329, (0), 10-17.
37. Polte, J.; Tuae, 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* **2012**, 6, (7), 5791-5802.
38. Zhang, Z.; Wu, Y., NaBH₄-Induced Assembly of Immobilized Au Nanoparticles into Chainlike Structures on a Chemically Modified Glass Surface. *Langmuir* **2011**, 27, (16), 9834-9842.
39. Zhang, Z.; Wu, Y., Investigation of the NaBH₄-Induced Aggregation of Au Nanoparticles. *Langmuir* **2010**, 26, (12), 9214-9223.
40. Prathna, T. C.; Chandrasekaran, N.; Raichur, A. M.; Mukherjee, A., Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process. *Colloid Surface A* **2011**, 377, (1-3), 212-216.
41. Liu, Y.; Liu, C.-y.; Chen, L.-b.; Zhang, Z.-y., Adsorption of cations onto the surfaces of silver nanoparticles. *J. Colloid Interf. Sci.* **2003**, 257, (2), 188-194.

Supporting Information

The Early Stage of Silver Nanoparticles Aggregation: An Important Phenomenon for Biological Processes

J F A de Oliveira^{1,2}, M B Cardoso^{1,2*}

¹ Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192,
Campinas, SP, Brazil,

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970,
Caixa Postal 6154, Campinas, SP, Brazil,

* E-mail: cardosomb@lnls.br; Fax: +55 19 3512 1004; Tel: +55 19 3512 1045

Contents

1. Experimental SAXS curve using cut-off parameter D = radius of particle
2. Graph of the chi-square determined for different radii during the fitting process

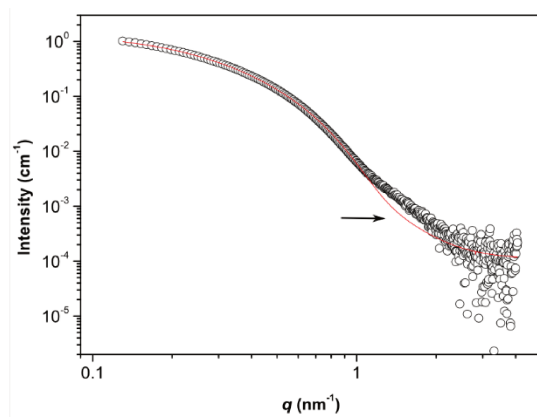


Figure S1. SAXS patterns for silver nanoparticles sample A3 using cut-off parameter $D =$ radius of the nanoparticle.

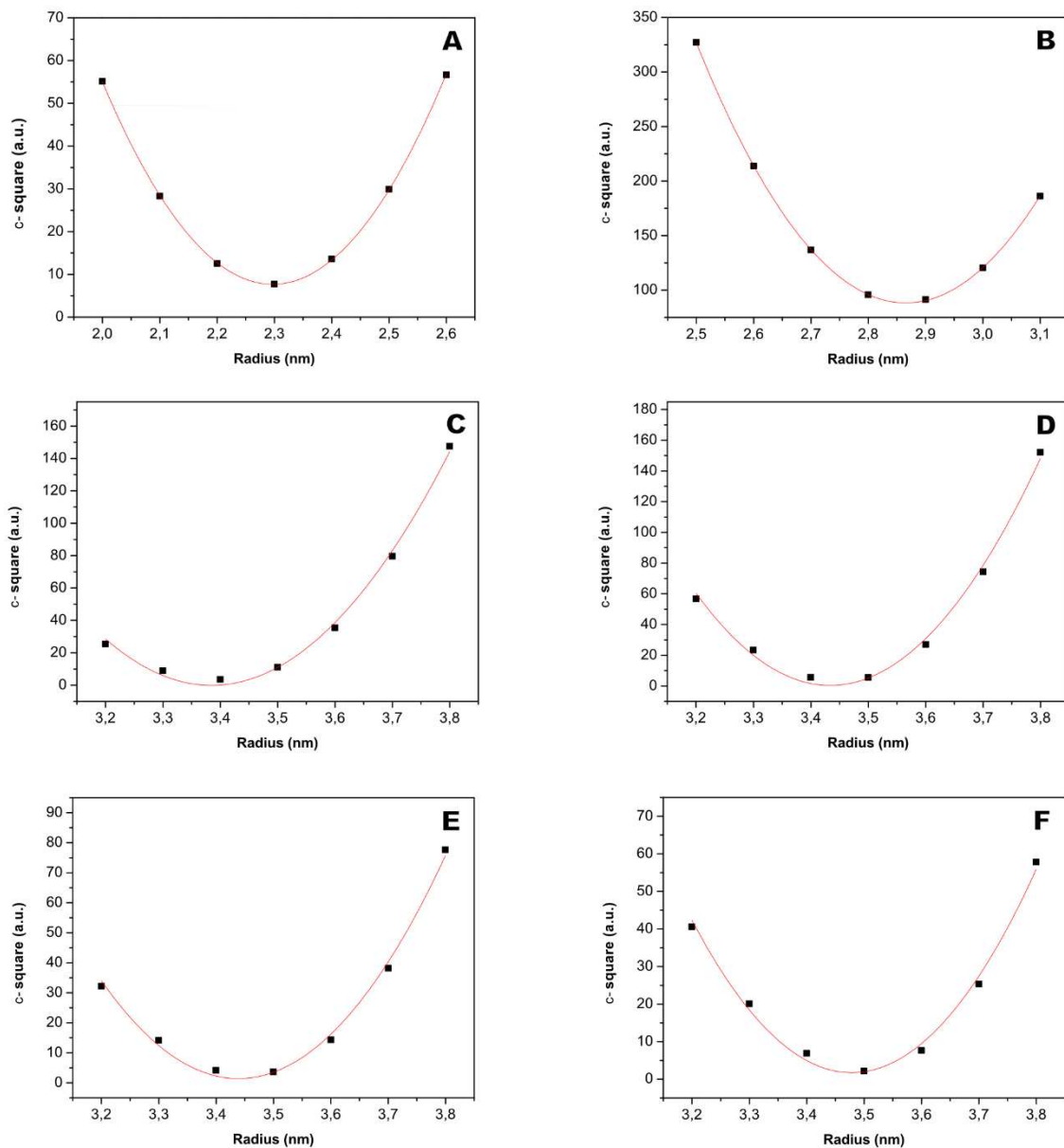


Figure S2. Graph of the chi-square determined for different radii during the fitting process.

10.5. Artigo submetido (aguardando avaliação)

A Point-of-Care for Ascorbic Acid Detection Using Silver Nanoparticles Paper-based Sensor

*Danielle C. Melo Ferreira,^{*a} Gabriela F. Giordano^a, Caio C. P. Soares,^{a†} Jessica F. A. de Oliveira,^{b,c} Maria H. Piazzetta,^a Mateus B. Cardoso,^{*b,c} Angelo L. Gobbi^a*

^aLNNano – Laboratório Nacional de Nanotecnologia. CEP 18083-970. Caixa Postal 6192. Brazil. Fax: +55 19 3512 1004; Tel: +55 19 3512 3566; E-mail: daniellecrsthina@hotmail.com

^bLNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Campinas, Brazil. Fax: +55 19 3512 1004; Tel: +55 19 35121045 E-mail: cardosomb@lnls.br

^cInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Caixa Postal 6154, Campinas, SP, Brazil.

[†]Present address: CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol . CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Campinas, Brazil.

Abstract

Nanotechnology is an interesting field of research that have grown exponentially over the last decades. The potential for nanoparticles in numerous areas is vast, with innovative applications constantly being explored. Thus, in this paper we demonstrate for the first time the use of silver nanoparticles (AgNPs) as synthesized for colorimetric ascorbic acid detection in paper-based sensor. This device is constituted by spot tests modified with AgNPs bordered by hydrophobic barrier which provides quantitative and fast analysis of ascorbic acid, acting as point-of-care monitoring with a unique drop of the sample. AgNPs paper-based sensor changed from light yellow to gray color after the addition of ascorbic acid due to nanoparticle growth and formation of clusters. The color intensities altered as a function of ascorbic acid concentration was measured by scanner and homemade portable transmittance colorimeter. Under the selected measurement conditions, results present 0.3 and 0.2 mmol L⁻¹ limit of detection, respectively. Small-angle X-ray scattering (SAXS) and scanning electron microscopy (SEM) techniques were used towards AgNPs sensor characterization. The platform developed was able to quantify ascorbic acid in remedy samples.

Keywords Paper-based sensor, silver nanoparticles, colorimetric detection, point-of-care, ascorbic acid

Introduction

By the advent of nanotechnology, the projection for using nanomaterials with diameters < 100 nm in industrial applications, medical imaging, disease diagnoses, and other areas have advanced rapidly. It is becoming evident that reduction of size beyond a limit is challenging the classical application of the material because the quantum effects start playing an important greater role [1-2]. It is estimated that the worldwide market for products using nanotechnology can reach US\$ 1 trillion by 2015 [3]. Recent advances with these materials this material have allowed the development of robust, highly sensitive and selective detection methods that are envisaged to surpass some limitations of conventional detection procedures [4]. Thus, gold and silver nanoparticles have emerged as a powerful tool in sensing and imaging applications due to their optical properties [5]. In the last few years, several types of sensors using nanoparticles were developed [6-14].

Silver nanoparticles have been effective labels for sensors due to a variety of analytical techniques that can be used to detect them [33-35]. Thompson et al. used oligonucleotide silver nanoparticle conjugates in a sandwich assay to detect a target oligonucleotide with colorimetric analysis to differentiate a single base mismatch with a lower concentration of a specific DNA sequence [36]. In parallel, a simple but effective method to detect anions (Cl^- , Br^- , I^- , H_2PO_4^- , and SCN^-), in aqueous media, using silver nanoplates, was developed where the sensitivity and selectivity toward inorganic anions are dependent upon the shift in the surface plasmon resonance band [7].

Numerous analyses, at aqueous medium, using metal nanoparticles are based on aggregation process. This process forms the basis of the simple,

highly sensitive and low cost colorimetric assays [37-41]. However, investigations with silver nanoparticles on a solid substrate, as paper, are not well described. Ratnarathorn et al. showed for the first time a modified silver nanoparticles paper-based sensor for Cu^{2+} colorimetric analysis [34]. In this investigation, AgNPs surface was modified by $-\text{COOH}$ and $-\text{NH}_2$ functional groups which have strong affinity to presence of Cu^{2+} . The sensor is based on the aggregation of modified AgNPs and Cu^{2+} , which leads to a shift in the absorption spectrum [34].

Ascorbic acid has been widely used in the pharmaceutical, chemical, cosmetic and food industry as antioxidant [15-16]. Furthermore, it is naturally present in many fruits and vegetables, like orange, lemon, pineapple, cashew, spinach, and tomato [17]. Specially, orange juice is a commodity broadly traded in the world and Brazil and the United States are the largest producers with 57.2 and 31.1 % of world production, respectively [18-20]. It is known that determination of ascorbic acid is necessary for quality control of this product. Numerous techniques have been reported for the determination of ascorbic acid, including chromatographic [21-24], electrochemical [25-26] and spectrophotometric techniques [27-28]. The official method for ascorbic acid determination, titrimetric analysis, is based on a redox reaction with 2,6-dichloroindophenol (DCIP) [29]. However, these analytical methods have the disadvantage of using large volumes of reagents, time-consuming and sample preparation. In this context, colorimetric methods are extremely attractive, in particular, for field detection [30]. They can be easily read out with the naked eye, offering advantages of inverter simplicity and rapidity, along with additional benefits of cost-effectiveness and no requirement of any sophisticated instrumentation [12, 31-32].

In our study, we describe a point-of-care device using noble nanomaterial for colorimetric ascorbic acid determination. This sensor utilizes silver nanoparticles as synthesized like a chromogenic reagent. To the best of our knowledge, there is no report about the use of AgNPs paper-based sensor for ascorbic acid detection. The sensor demonstrates an efficient, compact and low-cost platform for quantitative colorimetric analysis in real medicine sample. Here we take advantage of the color changes resulting from modifications on silver nanoparticles size and aggregation in response to the analyte.

Materials and methods

Materials

All chemicals used in experiment were of analytical grade and solutions were prepared using high pure water (DI) with a resistivity of $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. Silver nitrate (AgNO_3), ethylene glycol, ascorbic acid and polyvinylpyrrolidone (PVP, $\text{MW} = 40\,000 \text{ g mol}^{-1}$) were purchase from Sigma-Aldrich. Trisodium citrate and citric acid were obtained from Merck and J. T. Baker, respectively. All glassware was first rinsed with aqua regia and then thoroughly washed with DI water before use. Paper devices were made with Whatman no. 1 chromatographic paper.

Preparation of the silver nanoparticles

Silver nanoparticles, protected with PVP, were synthesized as previously described in the literature [42]. Briefly, 1.5 g of PVP was dissolved in 75 mL of ethylene glycol at room temperature. AgNO_3 (50 mg) was then

slowly added to this solution and the formed suspension was stirred until complete dissolution of the salt. The system was heated up to 120 °C at a constant rate of 5 °C per minute and the reaction was kept for one hour at this temperature under continuous stirring. The colloidal dispersion was cooled in a water bath until the system reached room temperature. 500 mL of acetone were added to the solution followed by centrifugation at 3300 g for 10 minutes. Then, the supernatant was removed and the precipitate resuspended in ethanol with subsequent centrifugation at 20 500 g for 15 minutes. Silver nanoparticles were obtained by isolating the supernatant from the precipitate containing a concentration of $66.5 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Preparation of Silver Nanoparticles-Paper Based Sensor

Two different devices were prepared, one of them with reservoir of 3 mm diameter (Device 1) and another with 7 mm diameter circles (Device 2). Both devices were printed in Whatman no. 1 chromatography paper. The printer used was a Xerox Phaser 8560 DN, designed to print a hydrophobic wax-based ink. The printed paper was placed on a hot plate set 120 °C for 2 min, and the wax melted and spread through the thickness of the paper as previously described by Carrilho et al. (2009) [43]. Devices 1 and 2 were modified with 0.5 and 2.5 μL , respectively, of a mixture from AgNPs and AgNO₃ solutions and allowed to air-dried for 5 minutes.

Determination of Ascorbic Acid by Silver Nanoparticles Paper-based Sensor

Ascorbic acid solution, prepared in 0.1 mol L⁻¹ citric buffer (pH = 4.3), was spotted to the test zone of AgNPs paper-based sensors and allowed to dry.

After 15 and 20 minutes for devices 1 and 2, respectively, the color change is visualized. Each strip sensor had a reference zone (control zone) where only citric buffer was applied. This procedure eliminates the contribution of the paper and colorimeter reagent in the final result.

Detection Methods

After colorimetric reaction, Devices 1 were digitalized with a desktop scanner. The images were converted to grayscale in Adobe® Photoshop® and we used the arithmetic mean of pixel intensity within each test zone to quantify the colorimetric response. Background-corrected response was obtained subtracting the quantified colorimetric response in the presence of the sample from the one of the blank assay [31].

On the other hand, Devices 2 were analyzed in a different way. A home-made portable transmittance colorimeter was developed for measure the light transmitted through the test regions [44]. The system consists in a photodetector and a RGB tricolor light-emitting diode (LED). The signal is sent to an active filter tuned at 2 kHz and only the signal from the LED is amplified in a photodetector. The RGB LED was previously tested to choose the color that offers the best signal intensity. Then, due to the better efficiency results, the system was set to work with blue LED color. Fig. 1 illustrates each step described for ascorbic acid colorimetric detection: (1) paper-based device configuration; (2) modification of the spot test with AgNPs; (3) Addition of the sample; (4) detection system by scanner and transmittance colorimeter.

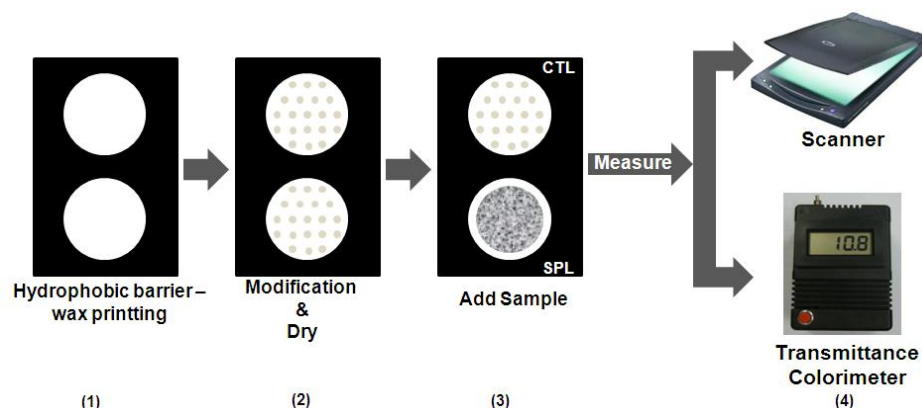


Fig. 1 Schematic representation of each step for colorimetric ascorbic acid determination: (1) design of the paper-based sensor; (2) modification of the spot test; (3) addition of the sample; (4) detection methods by (a) scanner (b) home-made transmittance colorimeter

Real samples: preparation and analysis

In order to evaluate the reliability of the proposed method, vitamin C of colorless samples of medicine Cewin® (500 mg of ascorbic acid) were prepared by taking the amount necessary to obtain 1.50 and 2.00 mmol L⁻¹ solutions. For comparison, the samples were simultaneously analyzed by paper-based sensors and by titrimetric official method employing 2,6-dichloroindophenol [29].

Characterization

Scanning electron microscope images were obtained with a FEG-SEM at the CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais).

The SAXS experiments were performed on the D01A-SAXS1 beamline of LNLS. The scattered beam ($\lambda=0.1488$ nm) was detected in a Pilatus 300k area detector placed in two different distances 1500 and 3000 mm taking into account the sample position in order to increase the scattering vector range (where $2\theta=$ scattering angle). Samples were sandwiched between two kapton

foils placed perpendicular to the X-ray beam. Silver behenate powder was used as standard to calibrate the sample-to-detector distance, the detector tilt and the direct beam position. Transmission, dark current and kapton corrections were performed on the 2D image before further data processing. The isotropic scattering patterns were radially averaged. All measurements were performed at room temperature.

SAXS data analysis was carried out using the Irena evaluation routine implemented in commercially available Igor Pro Software [45]. A multi-level unified fit was used to describe the two or three levels of structural organization evident in the scattering data [46-47]. In this method, the scattering provided by each structural level is the sum of a Guinier exponential-form and a structurally limited Power-law tail. A generalized equation, representing any number of levels, is written as [46-47]:

$$I(q) = \sum_{i=1}^n G_i \exp\left(\frac{-q^2 R_{gi}^2}{3}\right) + B_i \exp\left(\frac{-q^2 R_{gi}^2}{3}\right) \left[\frac{(\text{erf}(q R_{gi} / \sqrt{6}))^3}{q} \right]^{\text{Pi}} \quad (1)$$

where n is the number of structural levels observed, G is the Guinier prefactor, R_g is the radius of gyration and B is a prefactor specific to the Power-law scattering which is specified as the decay of the exponent P .

Results and Discussion

Performance for the Detection of Ascorbic Acid

Nanotechnology has shown an intense impact on a wide range of applications with many potential technological benefits. Thus, here we describe the original concept for colorimetric detection of ascorbic acid on a paper-based sensor modified with an AgNPs/Ag⁺ mixture. First, it was

investigated whether interaction of this mixture with vitamin C in a paper-based sensor was able to induce a color change and if this color change was concentration dependent. AgNPs paper-based sensor presents a light yellow color. A gray color, that was distant from the control experiment, was observed after adding ascorbic acid solution to the AgNPs sensor. The color was homogeneously distributed on entire surface and intensity was linearly dependent upon the concentration of added ascorbic acid. On the other hand, the surface coverage was not uniform when the fiber paper was modified simply with AgNO₃. It was observed a gray and/or brown color.

Colorimetric sensing on paper devices generally uses the colorimetric reagent in a higher concentration than is used in solution phase because of the low visibility of colors on the paper-sensor surface [12, 43, 48-49]. Thus, different concentrations of AgNPs (22.16; 33.25 and 44.33 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and AgNO₃ (10; 50 and 100 mmol L^{-1}) in the mixture were tested for the optimization process. 33.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 50 mmol L^{-1} for AgNPs and AgNO₃, respectively, presented the best results and were chosen for the analytical procedure. Performance for ascorbic acid detection was carried out using two equipments: desktop scanner and homemade portable transmittance colorimeter.

Fig. 2A shows the digitalized image of the Devices 1 after applying ascorbic acid solution. It can be observed a gradient scale of gray color past 20 minutes of reaction. These images were converted to grayscale in Adobe® Photoshop® and the arithmetic mean of pixel intensity of each test zone was used to quantify the colorimetric response. The effect of the ascorbic acid concentration on the reaction was studied. Fig. 2B presents the response of this assay to concentrations ranging from 0 to 5.00 mmol L^{-1} , and its

corresponding linear calibration curve with a linearity range from 1.00 to 4.00 mmol L⁻¹.

In the Fig. 2C, it is showed the quantitative behavior of the paper-based sensor obtained with home-made portable transmittance colorimeter. According to Beer's Law, the acquired transmittance follows a logarithm relation represented by Equation 2:

$$-\log I_{\text{assay}} / I_{\text{control}} = \varepsilon z c \quad (2)$$

where, I_{assay} was the intensity of light transmitted to detector in each assay, I_{control} was the intensity of light transmitted for only the solvent, ε is the molar absorptivity, z is the paper thickness and c corresponds to concentration [44]. Then, this equation was applied to obtain the analytical curves with ascorbic acid concentration ranging from 0 to 4.50 mmol L⁻¹ and a linearity range from 0 to 3.50 mmol L⁻¹, like it is presented in Fig. 2C.

The results provide evidence which quantitative colorimetric detection of ascorbic acid is possible with this sensor in the concentration range from 1.00 to 4.00 mmol L⁻¹ with 0.3 mmol L⁻¹ limit of detection (LOD) and 0 to 3.50 mmol L⁻¹ with 0.2 mmol L⁻¹ limit of detection for scanner and portable transmittance colorimeter monitoring, respectively. Nowadays, rapid test strips for ascorbic acid determination are commercialized in a semi-quantitative visual colorimetric sensor [50]. In contrast to some tests available on the market, based on reflectometric method, the device based on transmittance measure, proposed here, is able to monitor lower concentrations in a quantitative way than ones [51]. It is important to point out that our device can be useful for determining minimum ascorbic acid concentration measured

during the production of fruit's juice, according to some worldwide legislation [52-53].

The selectivity of the ascorbic acid sensor was evaluated by testing the response of the assay to some constituents normally present in fruit juices. According to Moeslinger et al., reducing sugars, like glucose and fructose were interferences from 2,6-dichloroindophenol method, titrimetric official method [54]. Thus, 1.5 mmol L⁻¹ glucose, fructose and Fe²⁺ solutions were tested in the proposed sensor (Fig. 3). Regarding the values obtained, the results showed no interference in this system with reducing sugars. However, iron ions developed a yellow color at AgNPs paper-based sensor as observed in Figure 3.

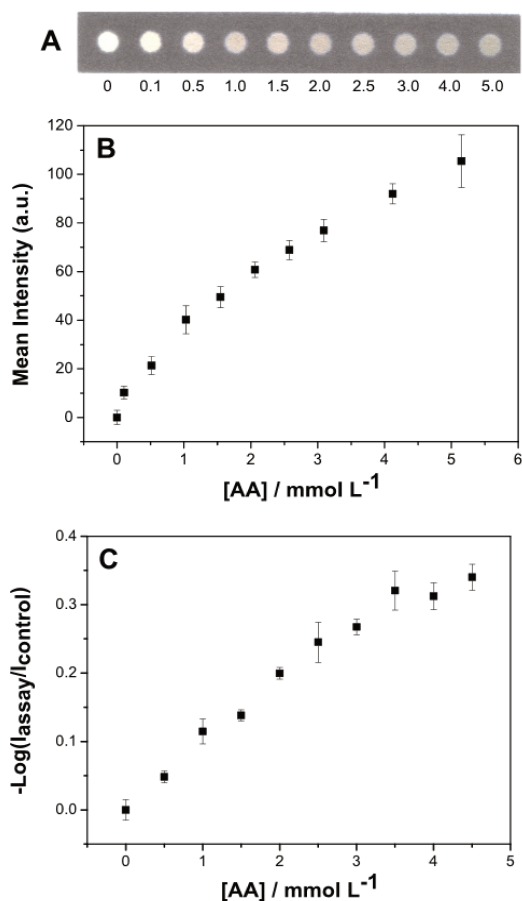


Fig. 2 (A) Colorimetric responses of silver nanoparticles-sensor to concentrations of ascorbic acid ranging from 0 to 5.00 mmol L⁻¹. Linear calibration curves: (B) Scanner (color intensity-grayscale quantified using Adobe® Photoshop®): $Y = 16.48 X + 25.46$ ($R^2 = 0.990$); LOD = 0.30 mmol L⁻¹; (C) Homemade transmittance colorimeter: $Y = 0.0912 X + 0.00551$ ($R^2 = 0.988$); LOD= 0.20 mmol L⁻¹

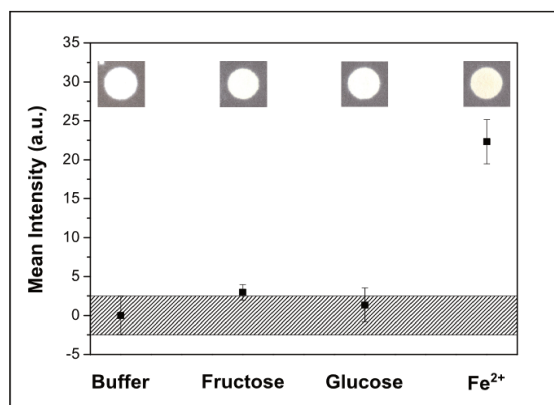


Fig. 3 Images from selectivity test of the AgNPs sensor toward some fruit juices constituents: (A) control – citrate buffer; (B) glucose; (C) fructose; and (D) Fe^{2+}

Paper-based sensors characterization

Different techniques (small-angle X-ray scattering and scanning electron microscopy) were used to characterize the silver nanoparticles paper-based sensors. Specifically, SAXS technique was employed to obtain nanometric information about the systems. This technique offers the possibility of rapid determination of particle size and distribution due to the high statistical averaging of the structure. In our specific case, silver nanoparticles were characterized and the average sizes were sorted out. Fig. 4 shows the experimental SAXS curves for paper-based sensors containing a AgNPs/ Ag^+ mixture (A) before; and (B) after addition of ascorbic acid solution. In Fig. 4A two scattering levels are observed. In the high- q region ($q > 0.8 \text{ nm}^{-1}$ - dashed blue line) of the scattering curve, a should-type Guinier region can be identified. This region allows us to determine a size of 15.6 nm which is related to silver nanoparticles present in the system. In the low- q region ($q < 0.8 \text{ nm}^{-1}$ - dotted green line) of this same figure, an exponential decay is seen and is related to the surface of the paper-based sensor. Differently, in Fig. 4B, three distinct levels are clearly identified. In the high- q part ($q > 0.8 \text{ nm}^{-1}$ - dashed blue line) of the scattering curve, the same information about silver nanoparticles size is seen. The dimension is about the same and a slight decrease in intensity is observed. Similar structural information is also obtained in the low- q part (dotted green line) where the exponential decay seen in Fig. 4A is still present. However, a new level has appeared after the addition of ascorbic acid (dashed-dotted pink line). The characteristic size of this level corresponds to about 24.5 nm. We suggest that

when the reaction happens on the surface of the paper, a fraction of the silver nanoparticles that were initially deposited in the sensor acts as a nucleation point for the redox reaction. Thus, a size increase is expected like the one seen from 15.6 to 24.5 nm. This interpretation also corroborates the intensity reduction from the fraction of 15.6 nm particles (Fig. 4A-B) which suggests that only a fraction of the particles were used as seeds to obtain larger particles (24.5 nm in Fig. 4B) while another fraction kept the same size with no further structural change.

Studies carried out by SEM enabled a thorough examination of AgNPs devices morphology. Fig. 5A and 5D illustrate the digitalized images of the modified AgNPs/Ag⁺ and Ag⁺ paper after applying ascorbic acid solution, respectively. The coloration is about the same, except by a slight decrease in intensity and fail of uniformity with brown regions observed of the modified Ag⁺ paper. Fig. 5B-C show the SEM images from modified AgNPs/Ag⁺ fiber paper before and after ascorbic acid addition, respectively. In Figure 5B we have not observed any particles at the analyzed conditions. However, after reaction with ascorbic acid silver nanoparticles clusters were formed covering the paper fiber (Fig. 5C).

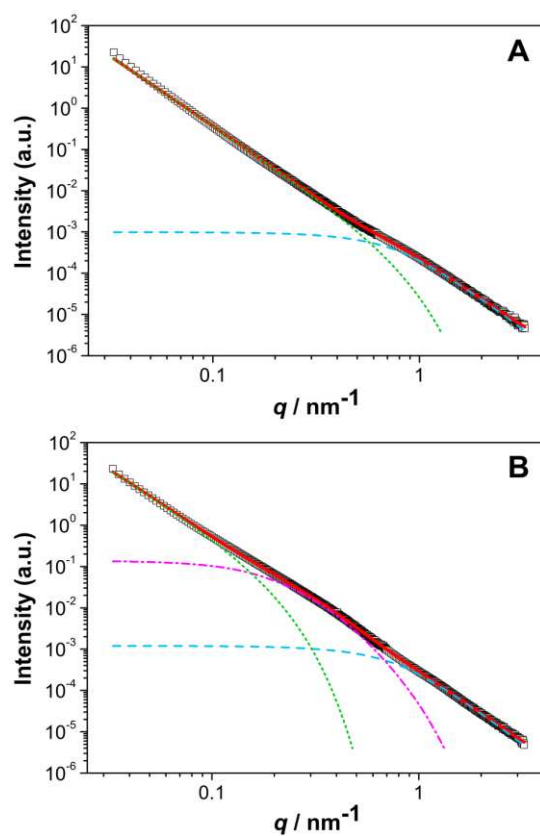


Fig. 4 Small-angle X-ray scattering spectra of the AgNP/Ag⁺ mixture (A) before; and (B) after addition of ascorbic acid. The unified fit is shown as a solid red line and the three fit levels are represented as dotted green dashed-dotted pink and dashed blue lines

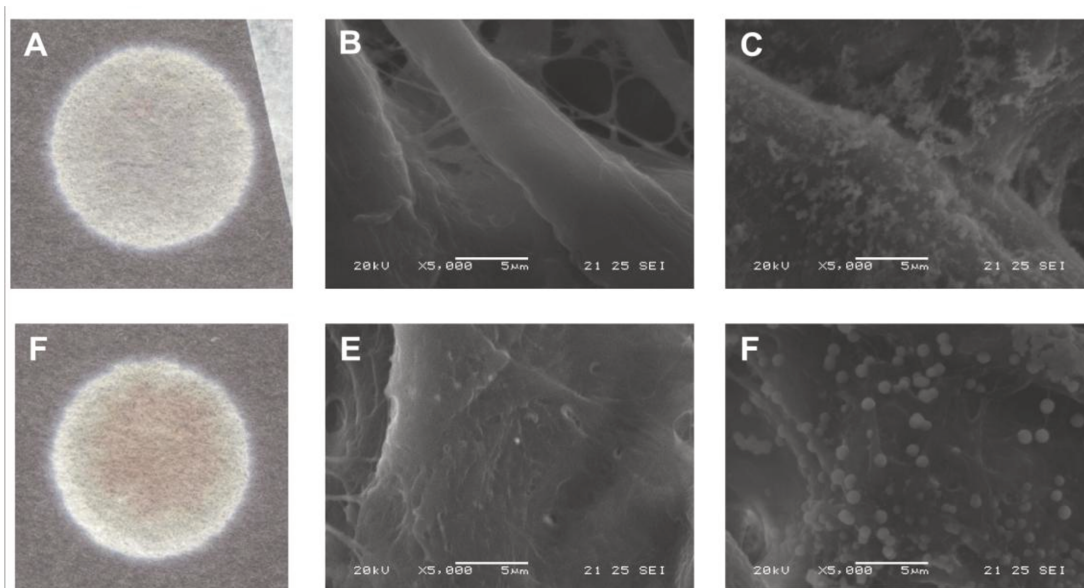


Fig. 5 Scanned image from AgNPs/Ag⁺ paper-based sensor after reaction with ascorbic acid (A); SEM micrographs of the modified AgNPs/Ag⁺ fiber paper: before (B); and after reaction with ascorbic acid (C); Scanned image from modified Ag⁺ paper after reaction with ascorbic acid (D); SEM micrographs of the modified Ag⁺ fiber paper: before (E); and after reaction with ascorbic acid (F)

Silver nanoparticles structure formed at AgNPs/Ag⁺ paper-based sensor after addition of ascorbic acid is in clear contrast with that observed by modified Ag⁺ paper fibers. SEM images show spherical silver particles at micrometer scale after reaction with ascorbic acid (Fig. 5E-F). These results demonstrate that in the AgNPs presence, silver ions are reduced on their surface, increasing their size and forming clusters allowing a uniform distribution on the sensor surface. On the other hand, in the AgNPs absence, larger silver particles are formed on paper fibers not uniformly distributed over whole surface; furthermore there are vacant regions that decrease the ability of the analytical system. These images are agreeing with SAXS results.

Reproducibility and Stability of the Sensors

The reproducibility of the silver nanoparticles paper-based sensors assay was obtained probing 10 identical sensors prepared independently but following the same procedure. Fig. 6A presents the average voltage, using the transmittance colorimeter, after addition of 1.00 mmol L^{-1} ascorbic acid. The average voltage was $0.625 (\pm 0.033)$ for $n = 10$ with a relative standard deviation of 5.2 %.

For practical use, the devices must remain stable for weeks. Therefore, it was studied, during 3 weeks, the stability of the sensors stored at room temperature and in refrigerator, kept out of the light. The responses of the sensors were evaluated by a home-made transmittance colorimeter. Fig. 6B shows the data under the two conditions over a period of 3 weeks. The results demonstrate a variation of 10 % from initial response for the sensors stored in the refrigerator. At room temperature, the intensity decreased about 55 % during this period. Thus, to apply the sensors for on-site, real-time detection and quantification, the sensors must be stored under refrigeration ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) and in the darkness.

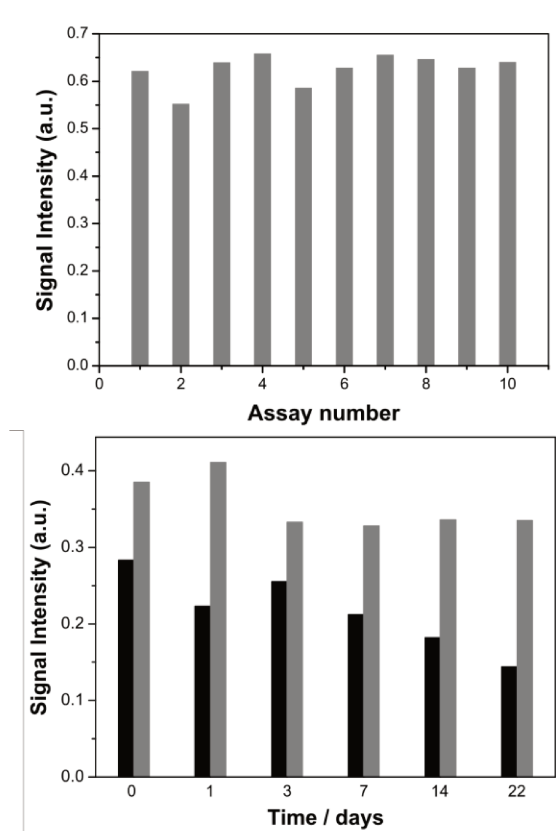


Fig. 6 (A) Reproducibility of the AgNPs/Ag⁺ paper-based sensors. The results correspond to the home-made transmittance colorimeter response of the sensors after addition of 1.00 mmol L⁻¹ ascorbic acid for n = 10 assays. (B) Storage stability of AgNPs/Ag⁺ paper-based sensors during 3 weeks: (black) at room temperature; (gray) in the refrigerator. The signal color intensity corresponds to the response of the sensors to addition of 2.0 mmol L⁻¹ ascorbic acid solution measured by a home-made transmittance colorimeter

Analytical Application: Detection in real samples

To validate the sensing performance of sensors, real samples of ascorbic acid were monitored with Cewin, a commercial medicine. Experiments were performed in triplicate for each concentration. Table 1 presents the levels of ascorbic acid measured by scanner and homemade transmittance colorimeter and evaluated with the titrimetric official method. These values were compared to reference method using *t*-test and they are statistically equal at a

confidence level of 95 % and 98 % for transmittance colorimeter and scanner, respectively.

The results obtained clearly demonstrate that metallic nanoparticles and paper-based analytical devices combination has a huge field to search. Nanoparticles can be modified with functional groups for increase their selectivity, as showed by Ratnarathorn et al. [34] or associated with any other substance/metal as presented by us. This system presents important advantages such as portability, reliability and can be adapted to other analytes. Thus, the configuration of the devices can also be designed to filter samples before colorimetric reaction. As nanotechnology is becoming increasingly accessible to research and clinical laboratories, significant advances in the area of noble metal nanoparticles-based sensors will certainly occur in the near future.

Conclusions

This study demonstrates for the first time the use of AgNPs, as synthesized, for colorimetric sensing of ascorbic acid in paper-based sensors. Proposed method requires reduced sample volumes and reagents, providing quantitative and fast analysis, simple to use and portable devices for point-of-care test. The assay does not require addition of external reagents, because all the sensing components and reagents needed for detection are deposited onto the paper substrate. The principle is based on the silver nanoparticles growth and clusters formation becoming gray, visible to naked eye. These results show that silver nanoparticles paper-based sensors are able to quantify ascorbic acid concentrations in medicine samples. Thus, these devices can be also applied for rapid analysis in quality control of citric industries in routine

monitoring. Other developed methodologies using noble metal nanoparticles can still find great application in research laboratories.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian Nanotechnology National Laboratory.

References

- [1] Devadasu VR, Bhardwaj V, Kumar MNVR (2013) *Chem Rev* 113:1686-1735
- [2] Doria G, Conde J, Veigas B, Giestas L, Almeida C, Assunção M, Rosa J, Baptista PV (2012) *Sensors* 12:1657-1687
- [3] Roco MC (2005) *Environ Sci Technol* 39:106A–112A
- [4] Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR, Pharm J (2010) *Bioallied Sci* 2:282–289
- [5] Gao J, Gu H, Xu B (2009) *Acc Chem Res* 42:1097-107
- [6] Kalluri JR, Arbnesi T, Khan SA, Neely A, Candice P, Varisli B, Washington M, McAfee S, Robinson B, Banerjee S, Singh AK, Senapati D, Ray PC (2009) *Angew Chem Int Ed* 48:9668–9671
- [7] Jiang XC, Yu AB (2008) *Langmuir* 24:4300-4309
- [8] Ko S, Gunasekaran S, Yu J (2010) *Food Control* 21:155–161
- [9] Ding N, Cao Q, Zhao H, Yang Y, Zeng L, He Y, Xiang K, Wang G (2010) *Sensors* 10:11144-11155.
- [10] Ornatska M, Sharpe E, Andreescu D, Andreescu S (2011) *Anal Chem* 83:4273–4280
- [11] Zhao W, Ali MM, Aguirre SD, Brook MA, Li Y (2008) *Anal Chem* 80:8431-8437
- [12] Li L, Li B, Cheng D, Mao L (2010) *Food Chem* 122:895–900
- [13] Sherry LJ, Jin R, Mirkin CA, Schatz GC, Van Duyne RP (2006) *Nano Lett* 6:2060-2065
- [14] Caro C, Lopez-Cartes C, Zaderenko P, Mejías JA (2008) *J Raman Spectrosc* 39:1162–1169
- [15] Elmore AR (2005) *Int J Toxicol* 2:51-111
- [16] Bauernfeind JC (1982) in: Seib PA, Tolbert BM (eds) *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses*. American Chemical Society, Washington D.C

- [17] Martí N, Mena P, Cánovas JA, Micol V, Saura D (2009) *Nat Prod Commun* 4:677-700
- [18] Yilmaz S, Sadikoglu M, Saglikoglu G, Yagmur S, Askin G (2008) *Inter J Electrochem Sci* 3:1534-1542
- [19] http://www.agroanalysis.com.br/especiais_detalhe.php?idEspecial=49. Accessed 01 nov 2013.
- [20] http://www.economiaemdia.com.br/static_files/EconomiaEmDia/Arquivos/infset_suco_de_laranja.pdf. Accessed 01 nov 2013.
- [21] Gazdik Z, Zitka O, Petrlova J, Adam V, Zehnalek J, Horna A, Reznicek V, Beklova M, Kisek R (2008) *Sensors* 7097-7112
- [22] Shaw PE, Wilson III CW, (1982) *J Agric Food Chem* 30:394-396
- [23] Iwase H, Ono I (1993) *J Chromat A* 654:215-220
- [24] Fenoll J, Martínez A, Hellín P, Flores P (2011) *Food Chem* 127:340-344
- [25] Fung Y, Mo S (1992) *Anal Chim Acta* 261:375-380
- [26] O'Connell PJ, Gormally C, Pravda M, Guilbalt GG (2001) *Anal Chim Acta* 431:239-247
- [27] Coichev N, Fornaro A (1998) *Quím Nova* 21:1-14
- [28] Paim APS, Kronka EAM, Reis BF, Korn M (1998) *Quím Nova* 21:47-50
- [29] AOAC Official Methods of Analysis 967.21 Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices – 2,6-Dichloindophenol titrimetric method 2006
- [30] Jungreis E (1997) *Spot Test Analysis: Clinical, Environmental, Forensic, and Geochemical Applications*. John Wiley & Sons, Inc. New York
- [31] Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Sindi H, Whitesides GM (2008) *Anal Chem* 80:3699-3707
- [32] Jokerst JC, Adkins JA, Bisha B, Mentele MM, Goodridge LD, Henry CS (2012) *Anal Chem* 84:2900-2097
- [33] Knecht MR, Sethi M (2009) *Anal Bioanal Chem* 394:33-46
- [34] Ratnarathorn N, Chailapakul O, Henry CS, Dungchai W (2012) *Talanta* 99:552–557
- [35] Mehta VN, Mungara AK, Kailasa SK (2013) *Anal Methods* 5:1818-1822
- [36] Thompson DG, Enright A, Faulds K, Smith WE, Graham D (2008) *Anal Chem* 80:2805–2810
- [37] Ling J, Sang Y, Huang CZ (2008) *J Pharmac Biomed Anal* 47:860-864
- [38] Bosanac L, Aabo T, Bendix PM, Oddershede LB (2008) *Nano Letters* 8:1486-1491
- [39] Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC (2003) *J Phys Chem B* 107:668–677
- [40] Chah S, Hammond MR, Zare RN (2005) *Chem Biol* 12:323–328

- [41] Schofield CL, Haines AH, Field RA, Russell DA (2006) *Langmuir* 22:6707-6711
- [42] Lago VD, Oliveira LF, Gonçalves KA, Kobarg J, Cardoso MB (2011) *J Mater Chem* 21:12267-12273
- [43] Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM (2009) *Anal Chem* 81:7091–7095
- [44] Ellerbee AK, Phillips ST, Siegel AC, Mirica KA, Martinez AW, Striehl P, Jain N, Prentiss M, Whitesides GM (2009) *Anal Chem* 81:8447-8452
- [45] Kline SR (2006) *J Appl Crystallogr* 39:895-900
- [46] Beaucage G (1995) *J Appl Crystallogr* 28:717-728
- [47] Beaucage G (1996) *J Appl Crystallogr* 29:134-146
- [48] Noh H, Phillips ST (2010) *Anal Chem* 82:4181–4187
- [49] Nery EW, Kubota LT (2013) *Anal Bioanal Chem* 405:7573–7595
- [50] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/37203?lang=pt®ion=BR>. Accessed 01 nov 2013
- [51] http://www.emdmillipore.com/chemicals/ascorbic-acid-est/MDA_CHEM-116981/p_626b.s1LvAAAAEWm.IfVhTI?CountryName=United+States+of+America. Accessed 01 nov 2013
- [52] USDA (2012) Commodity Specification: Bottled Fruit Juice. <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5098192>. Accessed 01 nov 2013
- [53] BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 7 de Janeiro de 2000. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de laranja. Diário Oficial da União da República federativa do Brasil, Brasília, 10 de Janeiro de 2000
- [54] Moeslinger T, Brunner M, Volf I, Spieckermann PG (1995) *Clin Chem* 41:1177-118