



DANIELA POTT MARINHO BALLOTTIN

**CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E SUA APLICAÇÃO
NA PRODUÇÃO DE TECIDOS ANTIMICROBIANOS**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

DANIELA POTT MARINHO BALLOTTIN

**CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E SUA APLICAÇÃO
NA PRODUÇÃO DE TECIDOS ANTIMICROBIANOS**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LJUBICA TASIC

COORIENTADORA: PROFA. DRA. PRISCYLA DANIELY MARCATO GASPARI

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM
CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR DANIELA POTT MARINHO BALLOTTIN, E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. LJUBICA TASIC.**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

B214c Ballottin, Daniela Pott Marinho, 1987-
Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos / Daniela Pott Marinho Ballottin. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ljubica Tasic.

Coorientador: Priscyla Daniely Marcato Gaspari.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanopartículas de prata biogênicas. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. Proteínas. 4. Caracterização de proteínas. 5. Atividade antimicrobiana. I. Tasic, Ljubica. II. Gaspari, Priscyla Daniely Marcato. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of silver nanoparticles and their application in the production of antimicrobial fabric

Palavras-chave em inglês:

Biogenic silver nanoparticles

Fusarium oxysporum

Proteins

Proteins characterization

Antimicrobial activity

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ljubica Tasic [Orientador]

Amauri Jardim de Paula

Hamilton Cabral

Oswaldo Luiz Alves

Cátia Cristina Capêlo Ornelas Megiatto

Data de defesa: 08-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

Dedicatória

*Dedico este trabalho à minha família:
meu pai Roberval, minha mãe Miriam e meu marido Lucas.
Obrigada por todo carinho, apoio e amor incondicional.
Sem vocês nada seria possível.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por me amparar nos momentos difíceis, por me dar forças para superar as dificuldades, por sempre estar ao meu lado, me guiando e me protegendo, e por me mostrar o caminho nas horas incertas.

À minha família, pela qual tenho imensa paixão, pelo carinho, paciência e incentivo.

À minha orientadora e exemplo, Profa. Ljubica Tasic, a Buba, por toda a credibilidade durante esses anos, pelos ensinamentos científicos e pessoais.

Aos amigos do grupo, e do LQB I-250, que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Nelson Durán, por todas as dicas e ensinamentos, sempre disposto a me ajudar, meu muito obrigada!

À Pry, por toda ajuda e dedicação na realização deste projeto, obrigada!

Às minhas queridas amigas, Dani e Alê, por tantos momentos de alegria, incentivo, companheirismo e principalmente amizade.

Ao grupo do Prof. Fábio Gozzo, em especial Alexandre e Tati, por sempre estarem prontos pra ajudar e realizar as análises de massas.

A todos os funcionários do IQ-Unicamp.

A FAPESP pela bolsa concedida e aos demais órgãos de fomento (CAPES e CNPq) pelo apoio financeiro utilizado para a manutenção da infraestrutura do laboratório.

Confie.

*As coisas acontecem na hora certa,
exatamente quando devem acontecer.*

Momentos felizes, louve a Deus.

Momentos difíceis, busque Deus.

Momentos silenciosos, adore Deus.

Momentos dolorosos, confie em Deus.

Cada momento, agradeça a Deus.

(autor desconhecido)

Curriculum vitae

Daniela Pott Marinho Ballottin

e-mail: dani_pott@hotmail.com

Formação acadêmica

- 2011-2014** Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Doutorado em Química Orgânica
Título do projeto: Caracterização de Nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos.
Orientadora: Prof^a Dra. Ljubica Tasic
Agência de fomento: FAPESP
- 2009-2011** Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Mestrado em Química Analítica
Título do projeto: Desenvolvimento de um novo método para a determinação de glicerídeos em Biodiesel utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector eletroquímico.
Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto
Agência de fomento: CAPES
- 2005-2008** Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Bacharelado em Química
Título do projeto de Iniciação Científica: Determinação de glicerol em Biodiesel utilizando eletrodo quimicamente modificado com óxi/hidróxi de níquel.
Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto
Agência de fomento: FAPESP

Publicações em periódicos

1. Zampieri, D.; Santos, V. G.; Braga, P. A. C.; Ferreira, C. R.; Ballottin, D.; Tasic, L.; Basso, A. C.; Sanches, B. V.; Pontes, J. H. F.; da Silva, B. P.; Garboggini, F. F.; Eberlin, M N.; Tata, A. (2013). Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the *in vitro* production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Theriogenology* 80, 337-345.
2. Lima, R.; Feitosa, L. O.; Ballottin, D.; Marcato, P. D.; Tasic, L.; Durán, N. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of biogenic silver nanopartiles. *Journal of Physics: Conference Series* 429, 012020-012029.
3. Ballottin, P. M. D.; Paim, L. L.; Stradiotto, N. R. (2013). Determination of glycerol using a nickel(II) oxyhydroxide chemically modified electrode by cyclic voltammetry. *Electroanalysis* 25, 1751-1755.

Artigos submetidos

1. Ballottin, D.; Rodrigues, A. G.; de Souza, A. O.; Marcato, P. D.; Durán, N.; Alves, O. L.; Gomes, A.; Gozzo, F. C.; Tasic, L. (2014). Biogenic nanosilver capping

proteins: *Aspergillus tubingensis* versus *Fusarium oxysporum*. Nanoscale (submetido), DOI: 10.1039.

Apresentação de trabalhos em Congressos

1. Ballottin, D. P. M.; Silva, J. C.; Marcato, P. D.; Durán, N.; Tasic, L. (Pôster) *Cotton fiber loaded with biogenic silver nanoparticles as antimicrobial material*. 2013. *Advanced & Nano Materials Conference – ICANM 2013*, Universidade de Québec, Québec, Canadá.
2. Ballottin, D. P. M.; Marcato, P. D.; de Souza, A. O.; Rodrigues, A. G.; Durán, N.; Tasic, L. (Pôster) *Characterization of ecofriendly silver nanoparticles produced with different fungi*. 2012. *International Conference of Nanoscience and Nanotechnology – ICNT 2012*, Universidade de Sorbonne, Paris, França.
3. Ballottin, D. P. M.; Marcato, P. D.; Tasic, L. (Oral) *Investigation on capping proteins from biogenic silver nanoparticles*. 2012. *V Hands-on Course from Proteomics to Proteins*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Costa da Caparica, Portugal.
4. Ballottin, D. P. M.; Marcato, P. D.; Tasic, L. (Pôster) *Biogenic silver nanoparticles: characterization and antimicrobial activity*. 2011. *8th International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP*, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, São Paulo.
5. Ballottin, D. P. M.; Stradiotto, N. R. (Pôster) *Detecção de glicerídeos em Biodiesel utilizando Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector eletroquímico*. 2011. 34º Reunião Anual da SBQ, Florianópolis, Santa Catarina.
6. Ballottin, D. P. M.; Stradiotto, N. R. (Pôster) *Detecção de acetato de etila utilizando Voltametria de corrente alternada*. 2010. 33ª Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindóia, São Paulo.
7. Ballottin, D. P. M.; Stradiotto, N. R. (Pôster) *Determinação de glicerol em Biodiesel utilizando eletrodo quimicamente modificado com oxi/hidroxi de níquel*. 2009. 15º ENQA – Encontro nacional de Química Analítica, Salvador, Bahia.

Trabalhos Extra-curriculares

Programa Estágio Docente (PED C): QO 427 – Química Orgânica I (Curso: Engenharia de Alimentos), 2º sem 2012. Supervisor: Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues. QO623 – Química Orgânica Experimental (Curso: Farmácia), 1º sem 2013. Supervisão: Prof. Dr. Fernando Coelho. QO622 – Química Orgânica Experimental (Curso: Química), 2º sem 2013. Supervisão: Profa. Dra. Anita Marsaioli. Programa UPA 2013 - Universidade de Portas Abertas, na qualidade de Monitor no IQ-Unicamp, 31/08/2013.

Premiações

Prêmio PIBIC - UNICAMP 2013. Prêmio INOVA de inovação em iniciação com o trabalho em conjunto com a aluna de IC, Flávia Cabrini e Prêmio de mérito científico edição 2013. Trabalho premiado: Estudo e caracterização de proteínas aderidas a nanopartículas de prata produzidas biossinteticamente. Cabrini, F.; Ballottin, D.; Tasic, L.

Co-orientações

Iniciação Científica: 3

Estágio: 1

Resumo

CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE TECIDOS ANTIMICROBIANOS

Esta tese apresenta pela primeira vez a caracterização bioquímica e físico-química de proteínas associadas à nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas biogênica e extracelularmente utilizando o fungo *Fusarium oxysporum*. As partículas obtidas foram caracterizadas por técnicas microscópicas, espectroscópicas e de espalhamento dinâmico de luz, as quais forneceram informações em relação à morfologia, topografia, tamanho, composição elementar, carga superficial e cristalinidade das partículas. A presença de proteínas estabilizadoras ao redor das partículas foi evidenciada por Espectroscopia no UV-Vis e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Estas macromoléculas também foram estudadas e caracterizadas por diferentes técnicas, tais como, fluorescência, dicroísmo circular, Espectroscopia no Infra-vermelho e Espectroscopia Raman. Além disso, foram realizadas análises de eletroforese em gel sendo possível estimar a massa molecular das proteínas que estabilizam as nanopartículas. As proteínas associadas as AgNPs foram identificadas por Espectrometria de Massas, a qual permitiu a obtenção de resultados promissores e inéditos, uma vez que não há na literatura nenhum relato sobre a identificação de proteínas envolvidas na síntese e/ou na estabilização destas partículas. A atividade antimicrobiana destas partículas apresentou resultados inéditos e importantes frente à uma bactéria patogênica, a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), causadora do cancro cítrico, doença com sérias consequências para citricultura brasileira. Além disso, foram estudadas também duas espécies de *Candida* sp. (*C. albicans* e *C. parapsilosis* (isolada pelo nosso grupo de pesquisa)), leveduras causadoras de infecções hospitalares. Nestes estudos foi verificada a alta atividade antimicrobiana das partículas através de uma atividade inibitória mínima (MIC) da ordem de $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cito- e genotoxicidade em diferentes organismos e células também foram investigadas, demonstrando que nas concentrações utilizadas neste trabalho, as AgNPs não apresentam efeito cito- ou genotóxico. São mostrados também resultados da impregnação das AgNPs em tecido de algodão, e a atividade antimicrobiana promissora deste material frente a *Xac*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Abstract

CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATION IN THE PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL FABRICS

This thesis presents for the first time the biochemical and physical-chemical characterization of proteins associated with silver nanoparticles (AgNPs), which were biogenic and extracellularly synthesized using the *Fusarium oxysporum* fungus. The obtained particles were characterized by microscopic, spectroscopic and dynamic light scattering techniques, which provided information regarding the morphology, size, elemental composition, particle surface charge and crystallinity. The presence of surrounding proteins, which stabilize particles was evidenced by UV-Vis Spectroscopy and Transmission Electron Microscopy. These macromolecules have also been studied and characterized by different techniques, such as, fluorescence, circular dichroism, Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy. Moreover, the electrophoresis analysis were performed and it was possible to estimate the molecular weight of proteins. Proteins were identified by Mass Spectrometry, which allowed to obtain novel and promising results since there are no reports on the identification of proteins involved in the synthesis and/or stabilization of AgNPs. The antimicrobial activity of these particles showed unprecedented and important results against a pathogenic bacterium, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) that causes citrus canker, a disease with serious consequences for the Brazilian citrus industry. Moreover, also two species of *Candida* sp were studied. (*C. albicans* and *C. parapsilosis* (isolated by our research group)), yeast that cause nosocomial infections. In these studies, it was observed the high antimicrobial activity of particles through the minimum inhibitory concentration (MIC) values (order of $\mu\text{g mL}^{-1}$). Cyto- and genotoxicity in different organisms and cells have also been investigated, showing that at determined concentrations, AgNPs have no cyto- and genotoxic effects. Results of impregnation of AgNPs in cotton fabrics and its antimicrobial activity against *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *Xac* was also confirmed.

Sumário

Índice de Figuras	xxiii
Índice de Tabelas	xxvii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xxix
Lista de Símbolos	xxxiii
Introdução Geral	1
Capítulo 1. Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Prata.....	5
1.1 Introdução.....	7
1.1.1 Propriedades ópticas das Nanopartículas Metálicas	8
1.1.2 Síntese das nanopartículas metálicas (NPM).....	9
1.1.3 Caracterização das NPM	18
1.2 Procedimento Experimental	19
1.2.1 Cultura do fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	19
1.2.2 Biossíntese das nanopartículas de prata.....	19
1.2.3 Caracterização das nanopartículas de prata	20
1.3 Resultados e Discussão.....	21
1.3.1 Cultura do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> e Biossíntese das AgNPs	21
1.3.2 Caracterização das nanopartículas de prata	25
1.4 Conclusões.....	34
Capítulo 2. Caracterização e Identificação das Proteínas Secretadas pelo <i>Fusarium oxysporum</i> Envolvidas na Síntese e Estabilização das Nanopartículas de Prata.....	37
2.1 Introdução.....	39
2.2 Procedimento Experimental	41
2.2.1 Quantificação das proteínas.....	41
2.2.2 Determinação estimada da massa molecular das proteínas	42
2.2.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	43
2.2.4 Espectroscopia Raman.....	43
2.2.5 Fluorescência	43
2.2.6 Dicroísmo Circular (CD).....	44
2.2.7 Espectrometria de Massas (MS)	44

2.3 Resultados e Discussão.....	45
2.3.1 Quantificação das proteínas.....	45
2.3.2 Determinação estimada da massa molecular das proteínas.....	47
2.3.3 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	49
2.3.4 Espectroscopia Raman.....	52
2.3.5 Fluorescência.....	59
2.3.6 Dicroísmo Circular (CD).....	61
2.3.7 Espectrometria de Massas (MS).....	64
2.4 Conclusões.....	83
Capítulo 3. Atividade Antimicrobiana das Nanopartículas de Prata.....	85
3.1 Introdução.....	87
3.2 Procedimento Experimental.....	92
3.2.1 Cultura dos micro-organismos:.....	92
3.2.1.1 <i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	92
3.2.1.2 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	92
3.2.2 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) e MBC / MFC (Minimum bactericidal concentration / Minimum fungicidal concentration).....	93
3.2.3 Caracterização microscópica dos micro-organismos.....	94
3.2.3.1 Preparação das amostras.....	94
3.2.3.2 Microscopia dos micro-organismos.....	95
3.2.4 Testes de cito- e genotoxicidade (Lima <i>et al.</i> , 2013).....	96
3.3 Resultados e Discussão.....	97
3.3.1 Cultura dos fungos <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>F. oxysporum</i> e da bactéria <i>Xac</i> e leitura do valor de MIC.....	98
3.3.2 Caracterização microscópica dos micro-organismos.....	105
3.3.3 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade.....	110
3.4 Conclusões.....	112
Capítulo 4. Impregnação das Nanopartículas de Prata em.....	115
Tecido de Algodão.....	115
4.1 Introdução.....	117
4.2 Procedimento Experimental.....	120

4.2.1 Impregnação das AgNPs em tecido de algodão	120
4.2.2 Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados	121
4.3 Resultados e Discussão.....	122
4.3.1 Impregnação das AgNPs em tecido de algodão	122
4.3.2 Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados	129
4.4 Conclusões.....	132
Capítulo 5. Conclusões Gerais e Propostas Futuras	133
5.1 Conclusões gerais	135
5.2 Propostas futuras	139
Capítulo 6. Referências.....	141
Apêndices	165
Apêndice I - Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	167
Apêndice II - Determinação estimada da massa molecular por Eletroforese em Gel (SDS-PAGE)	170
Apêndice III - Procedimento Experimental das análises de LC-MS/MS para identificação das proteínas	172
Apêndice IV - Meios de Cultura para o crescimento dos micro-organismos utilizados	175
IV.1 <i>Fusarium oxysporum</i> – meio EMA	175
IV.2 <i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	175
IV.2.1 Meio YPD líquido	175
IV.2.2 Meio YPD sólido.....	175
IV.3 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> – meio Luria Bertani (LB).....	176
IV.3.1 Meio LB sólido.....	176
IV.3.2 Meio LB líquido	176
Apêndice V - Técnicas utilizadas	177
V.1 Técnicas de Caracterização das AgNPs.....	177
V.1.1 Técnicas Espectroscópicas.....	177
V.1.1.1 Espectroscopia UV-Vis	177
V.1.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-x (EDS)	178
V.1.1.3 Espectroscopia de Difração de Raios-X (XRD)	179
V.1.1.4 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raio-X (XPS)	180

V.1.2 Técnicas Microscópicas.....	182
V.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	182
V.1.2.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)	183
V.1.3 Técnicas de Espalhamento de Luz.....	184
V.1.3.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	184
V.1.3.2 Potencial Zeta (ξ –potencial)	186
V.2 Técnicas de Caracterização de Proteínas.....	189
V.2.1 Técnicas Espectroscópicas.....	189
V.2.1.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	189
V.2.1.2 Espectroscopia Raman.....	190
V.2.1.3 Dicroísmo Circular (CD)	191
V.2.2 Fluorescência	193
V.2.3 Espectrometria de Massas (MS)	194
V.3 Avaliação da Atividade antimicrobiana das AgNPs.....	196
V.3.1 Mínima Concentração inibitória (MIC) e Mínima Concentração Bactericida (MBC)/Mínima Concentração Fungicida (MFC).....	196
V.3.2 Toxicidade – Cito- e Genotoxicidade	197
V.4 Impregnação das AgNPs em tecidos de algodão.....	200
V.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	200
V.4.2 Fluorescência de Raios-x (XRF)	201
V.4.3 Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados – método da difusão em ágar	202

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema da oscilação de um <i>plasmon</i> para uma esfera, e o deslocamento da nuvem eletrônica dos elétrons (Kelly e Coronado, 2003).	9
Figura 2. Esquema representativo da formação de nanopartículas de prata (+: íons Ag^+) (adaptado de (Patakfalvi e Dekany, 2005)).	14
Figura 3. (a) Diagrama representando o processo de formação de NPs em função do tempo de reação. (b) crescimento dos <i>clusters</i> devido às colisões provenientes do movimento Browniano. (adaptada da Tese de Doutorado da Dr. Marcela Oliveira (Oliveira, 2005)).....	15
Figura 4. Mecanismo proposto por Durán <i>et al.</i> (2005) para a biossíntese de AgNPs.	18
Figura 5. (a) Imagem da cultura do <i>F. oxysporum</i> (cepa 551) em meio sólido e (b) micrografias (MEV) do fungo. Em destaque (setas brancas): esporos e esporângios.....	22
Figura 6. Figura dos frascos contendo (esquerda) filtrado fúngico e (direita) suspensão de nanopartículas de prata depois de 168h de reação.....	23
Figura 7. Espectro UV-Vis em função do tempo de reação em solução aquosa $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 com o filtrado fúngico.....	23
Figura 8. Intensidade da absorbância da banda <i>plasmon</i> (440 nm) em função do tempo de reação.....	24
Figura 9. Espectro UV-Vis em função do tempo de reação em solução aquosa $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 com o filtrado fúngico, com destaque para a região de baixos comprimentos de onda.	25
Figura 10. (a_1 e a_2) Micrografias TEM das AgNPs $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, depositadas em um porta-amostra de cobre (copper grids-Ted Pella) recoberto com filme de parafilm (80 KeV) e (b) histograma da distribuição de tamanho obtida por TEM para as nanopartículas.....	26
Figura 11. Morfologia das AgNPs biogênicas. (a) topografia AFM (área escaneada $3,00 \times 3,00 \mu\text{m}^2$) e (b) representação 3D da topografia (área escaneada $3,00 \times 3,00 \mu\text{m}^2$).....	27
Figura 12. XPS da amostra de AgNPs (0 a 1300 eV).	28
Figura 13. Espectro XPS C 1s.	29
Figura 14. Espectro XPS O 1s.....	30
Figura 15. Espectro XPS Ag 3d.	31
Figura 16. Espectro XPS N 1s.....	32

Figura 17. Difratoograma XRD das AgNPs sintetizadas.	33
Figura 18. Curva de calibração do Teste de Bradford para quantificação de proteínas em solução. ($A = 0,01524 + 0,022416 C_{amostra}$, $R = 0,998$).....	46
Figura 19. Gel SDS-PAGE 18% para determinação das massas moleculares de proteínas. Da esquerda para direita: 1) marcador de massa molecular – LMW (97-14,4 kDa), 2) e 3) diferentes volumes de FF, 4) AgNPs lavada e 5) sobrenadante da ultracentrifugação.	47
Figura 20. Gráfico log PM <i>versus</i> R _f das proteínas do padrão molecular.	48
Figura 21. Espectro FTIR de: (a) AgNPs sintetizadas em 168 h de reação, (b) sobrenadante e (c) FF.	50
Figura 22. (a) Espectro Raman do FF e (b) espectro SERS das AgNPs após 168 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser verde – 514 nm, de 100 a 2000 cm ⁻¹	53
Figura 23. (a) Espectro Raman do FF e (b) espectro SERS das AgNPs após 168 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser verde – 514 nm, de 100 a 900 cm ⁻¹	54
Figura 24. (a) Espectro Raman do FF e (b) espectro SERS das AgNPs após 168 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser vermelho – 633 nm, de 100 a 2000 cm ⁻¹	55
Figura 25. (a) Espectro Raman do FF e (b) espectro SERS das AgNPs após 168 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser vermelho – 633 nm, de 100 a 900 cm ⁻¹	56
Figura 26. Espectro Raman do FF e espectros SERS das AgNPs a cada 24 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser verde – 514 nm, de 100 a 900 cm ⁻¹	58
Figura 27. Espectro Raman do FF e espectros SERS das AgNPs a cada 24 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser vermelho – 633 nm, de 100 a 900 cm ⁻¹	59
Figura 28. Espectro de emissão de fluorescência do (---) FF e (---) AgNPs. $\lambda_{exc} = 280$ nm	60
Figura 29. Espectro de Dicroísmo Circular do (---) FF 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (---) AgNPs 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	62
Figura 30. (a) Cromatograma (LC-MS) obtido para amostra de filtrado fúngico e (b) e (c) exemplo de espectro de fragmentação do peptídeo VTDLALYDIR identificado em uma proteína desidrogenase nas análises por <i>shotgun</i>	65
Figura 31. (a) Cromatograma (LC-MS) obtido para amostra de filtrado fúngico e (b) e (c) exemplo de espectro de fragmentação do peptídeo YFPTQALNFAFR identificado em uma proteína carreadora mitocondrial nas análises por <i>shotgun</i>	66

Figura 32. Representação em <i>cartoon</i> das proteínas (a) glutamato desidrogenase e (b) malato desidrogenase, identificadas no BLAST, pertencentes à família das oxidoredutases.	80
Figura 33. Representação em <i>cartoon</i> da proteína hipotética LOC100191904, identificada no BLAST como oxidoredutase quinona NADP(H) dependente.	81
Figura 34. Gráfico representativo da classificação das proteínas em categorias funcionais.	82
Figura 35. Esquema representativo do procedimento experimental adotado nos testes de toxicidade e genotoxicidade (adaptado de (Lima <i>et al.</i> , 2013).....	97
Figura 36. Imagem da placa tipo ELISA obtida no ensaio de MIC para a <i>C. albicans</i> . Agente antimicrobiano: AgNPs _{não lavadas} (MIC = 13,1 µg mL ⁻¹). C+: controle positivo, C-: controle negativo; poços 3-12: variação na concentração de AgNPs 104,8 µg mL ⁻¹ – 0,20 µg mL ⁻¹ ; A-G: replicatas.	98
Figura 37. Micrografias das AgNPs obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (a) AgNPs _{não lavadas} e (b) AgNPs _{lavadas}	100
Figura 38. Comparação dos valores de MIC das AgNPs _{não lavadas} e AgNPs _{lavadas} contra <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>Xac</i>	101
Figura 39. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura da <i>C. parapsilosis</i> (a) na ausência de AgNPs _{não lavadas} , (b) na presença de AgNPs _{não lavadas} 13,1 µg mL ⁻¹	107
Figura 40. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura da <i>Xac</i> (a) na ausência de AgNPs _{não lavadas} , (b) na presença de AgNPs _{não lavadas} 6,55 µg mL ⁻¹	108
Figura 41. Imagens da Microscopia eletrônica de varredura do <i>F. oxysporum</i> (a) na ausência de AgNPs _{não lavadas} e (b) na presença de AgNPs _{não lavadas}	109
Figura 42. Representação esquemática da impregnação de AgNPs em tecido de algodão pelo método <i>padding</i>	120
Figura 43. Fotografia dos tecidos de algodão impregnados uma vez com AgNPs e submetidos à 10 lavagens.	123
Figura 44. Comparação das porcentagens de prata lixiviada após cada ciclo de lavagem. (1 ou 2 vezes de impregnação de AgNPs nos tecidos de algodão).....	124
Figura 45. Determinação por XRF da porcentagem de prata impregnada nos tecidos de algodão em função dos ciclos de lavagem.....	125

Figura 46. Espectro de Fluorescência de Raio-X da amostra de tecido impregnado com AgNPs e sem lavagem.....	126
Figura 47. Micrografias das fibras de algodão (amostra controle).....	127
Figura 48. Micrografias das fibras de algodão sem impregnação após 10 ciclos de lavagem.	127
Figura 49. (a) Micrografias das fibras de algodão impregnadas com AgNPs sem lavagem. (b) Espectro EDS do tecido de algodão impregnado.....	129
Figura 50. Atividade antimicrobiana dos tecidos de algodão impregnados e submetidos à ciclos de lavagem contra <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>Xac</i>	131
Figura 51. Mecanismo da ligação do Reagente de Bradford com proteínas (Georgiou, 2008).	169
Figura 52. Ilustração do princípio de funcionamento de um <i>Dinamic light scattering</i> (DLS).	185
Figura 53. Representação esquemática do potencial zeta (http://www.malvern.co.uk). (a) Dupla camada elétrica; (b) Célula capilar equipada com eletrodos, onde as partículas se movimentam influenciadas pelo campo elétrico.	187
Figura 54. Espectros de DC característicos para diferentes conformações da cadeia polipeptídica (a) hélice α ; (b) folha β ; (c) β <i>turn</i> e (d) randômica (Drake, 2001).	192
Figura 55. Diagrama de Jablonski simplificado, representando o fenômeno de luminescência (fluorescência e fosforescência). S_0 : estado singlete fundamental; S_1 : primeiro estado singlete excitado; S_2 : segundo estado singlete excitado; T_1 : primeiro estado tripleto excitado; T_2 : segundo estado tripleto excitado (Valeur, 2001).	193
Figura 56. Redução do MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio) de coloração amarela à formazan (cor púrpura) pela succinato desidrogenase.	198
Figura 57. Princípio do teste de suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão em ágar.	202

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Porcentagem de ocorrência elementar na amostra analisada por XPS.....	28
Tabela 2 - Concentrações obtidas, com seus respectivos erros, para amostras de filtrado fúngico e nanopartículas de prata 10^{-2} mol L ⁻¹ de AgNO ₃	46
Tabela 3 - Atribuições das bandas obtidas pelas análises FTIR das amostras de FF, AgNPs e sobrenadante	51
Tabela 4 - Atribuições das bandas obtidas pelas análises Raman das amostras de nanopartículas de prata	57
Tabela 5 - Porcentagens de estrutura secundária obtidas pelo programa <i>CD Spectra Deconvolution</i> para as amostras de FF e AgNPs.....	63
Tabela 6 - Proteínas identificadas pelas análises de <i>shotgun</i> para o filtrado fúngico e nanopartículas de prata, pI teóricos, massas nominais, <i>score</i> da identificação, peptídeos identificados, % de cobertura na identificação, família de proteínas e espécie com maior homologia. Estruturas das proteínas obtidas pelo programa <i>Phyre2 (Protein Fold Recognition Server)</i>	67
Tabela 7 - Amostras de <i>C. parapsilosis</i> , <i>F. oxysporum</i> e <i>Xac</i> preparadas para MEV.....	96
Tabela 8 - Medidas de tamanho, polidispersividade e potencial zeta das AgNPs _{não lavada} e AgNPs _{lavada} (medidas feitas por TEM)	99
Tabela 9 - Resultados dos ensaios de atividade fungicida e bactericida das AgNPs _{não lavadas} e AgNPs _{lavadas} contra os micro-organismos testados	104
Tabela 10 - Elementos quantificados na amostra de tecido de algodão impregnado e sem lavagem.....	126
Tabela 11 - Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados com AgNPs para cada ciclo de lavagem.....	130
Tabela 12 - Soluções utilizadas para: preparo do gel SDS-PAGE 18%, aplicação das amostras no gel, coloração e descoloração do gel	170
Tabela 13 - Padrões de baixa massa e respectivas massas moleculares para eletroforese em gel de SDS-PAGE.	171
Tabela 14 - Variação dos gradientes das fases móveis A e B utilizados na corrida cromatográfica	173

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFM	Microscopia de Força Atômica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
AgNPs	Nanopartículas de prata
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina de Soro Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CD	Dicroísmo Circular (<i>Circular Dichroism</i>)
CPD	Secador de Ponto Crítico (<i>Critical Point Dryer</i>)
COMET	<i>Single Cell Gel Electrophoresis Assay</i>
D	Coeficiente de difusão translacional
DDA	Aquisição Dependente de Dados (<i>Dependent Data Acquisition</i>)
D_H	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico (<i>Dinamic light scattering</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-x (<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>)
<i>f(ka)</i>	Função de Henry
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
fcc	Cúbico de face centrada (<i>Face Centered Cubic</i>)
FF	Filtrado Fungico
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de <i>Fourier</i> (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
ICP	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry</i>)

kDa	Quilodalton
kHz	Quilohertz
LB	Luria Bertani
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
MBC	Mínima concentração bactericida (<i>Minimum bactericidal concentration</i>)
MFC	Mínima concentração fungicida (<i>Minimum fungicidal concentration</i>)
MIC	Mínima concentração inibitória (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
MS	Espectrometria de Massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MTT	brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetros
NPMs	Nanopartículas metálicas
PCS	Espectroscopia de Correlação de Fótons (<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>)
pI	Ponto isoelétrico
R_f	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribinucleic Acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (<i>sodium dodecyl-sulphate polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SERS	Espalhamento Raman Amplificado por Superfície (<i>Surface Enhanced Raman Scattering</i>)
SPR	Efeito de Ressonância de <i>plasmons</i> de superfície (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)

Trp, W	Triptofano
Tyr, Y	Tirosina
U_E	Mobilidade eletroforética
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
Vis	Visível
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)
XRD	Espectroscopia de difração de raios-x (<i>X-ray diffraction spectroscopy</i>)
XRF	Fluorescência de Raios-x (<i>X-ray fluorescence</i>)
z	Potencial Zeta

Lista de Símbolos

$h\nu$	Energia do fóton
λ	Comprimento de onda; lambda
α	alfa; hélice alfa
β	beta; folha beta
ε	Constante dielétrica
η	Viscosidade
θ	teta; ângulo
ξ	Potencial zeta
$[\theta]$	Elipsidade molar (em $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$)
E_B	Energia de ligação (<i>Bond Energy</i>)
E_C	Energia cinética (<i>Cinetic Energy</i>)
eV	elétron-volt
J	Momento angular orbital total
k	Constante de Boltzman
L	Momento angular orbital
S	Momento angular de spin
T	Temperatura

Introdução Geral

O mecanismo de formação de nanopartículas de prata biogênicas ainda é pouco discutido. Porém, já foi evidenciado que este processo se dá de forma extracelular devido à presença de enzimas redutase e de outras espécies (antraquinonas e naftoquinonas) secretadas pelo micro-organismo utilizado na síntese destas partículas.

A interação entre proteínas e nanopartículas de prata dá origem à AgNPs estáveis com a formação do complexo nanopartícula-proteína, o qual foi estudado por diferentes técnicas. Estas interações bioquímicas e biofísicas podem ocorrer através de ligações covalentes e interações eletrostáticas. As AgNPs podem interagir com grupos tiol (-SH) das cisteínas (em menor proporção) ou -NH₂ e ainda por interações eletrostáticas, as quais possuem menos influência sobre a conformação e função da proteína. Ocorre também que proteínas ligadas às AgNPs atraem outras proteínas dando origem à interações proteína-proteína específicas ou não específicas, as quais possuem papel importante nas multicamadas ao redor das AgNPs.

Assim sendo, a presença de proteínas e peptídeos que envolvem as nanopartículas e proporcionam sua alta estabilidade é evidente, porém estudos de caracterização destas biomoléculas ainda não foram descritos na literatura.

Desta maneira, a principal motivação deste trabalho foi o estudo e a caracterização destas macromoléculas, as quais estão envolvidas não somente na síntese, mas também na estabilização das AgNPs biogênicas, qual o seu papel na atividade antimicrobiana destas partículas, além de caracterizar a interação destas biomoléculas com as nanopartículas de prata.

Motivado também pela grande aplicação das AgNPs como agente antimicrobiano, este trabalho apresenta de forma inédita, o comportamento bactericida das nanopartículas de prata biogênicas frente à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), uma bactéria patogênica causadora do cancro

cítrico, doença que acomete fortemente a citricultura brasileira. Com resultados promissores, as AgNPs surgem então como um potencial agrotóxico frente à esta bactéria. Altamente contagiosa, a *Xac* é de fácil disseminação e um de seus principais vetores é o homem, por meio do trânsito indiscriminado pelos pomares, materiais de colheita e veículos. Como não existe método curativo para a doença, a única forma de eliminar o cancro cítrico é por meio da erradicação do material contaminado. No entanto, a erradicação da árvore contaminada não garante a eliminação da bactéria causadora do cancro e por isso a queima das árvores torna-se necessária. Dessa maneira, a área onde o foco da doença foi encontrado fica temporariamente interditada não sendo permitido o replantio de citros por um período de dois anos somente nas áreas que tiveram plantas erradicadas por causa da doença.

Desta maneira, sendo o homem o principal agente de disseminação desta doença, este trabalho também mostra a impregnação de AgNPs em tecidos de algodão com potencial aplicação na confecção de vestimentas para os citricultores.

Capítulo 1. Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Prata

1.1 Introdução

A nanotecnologia envolve a produção, manipulação e o uso de materiais abaixo de 1 micrômetro até ao nível atômico (Mohanpuria *et al.*, 2008), tendo como objetivo entender, criar e usar materiais com novas propriedades e funções. O rearranjo dos materiais na nanoescala usando interações moleculares fracas, tais como as forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou dipolos eletrostáticos requer pouco consumo de energia e permite a reversibilidade do sistema ou outros rearranjos (Roco, 2003). O uso da química verde para a síntese de nanopartículas metálicas tem, recentemente, se tornado interessante devido à utilização de reagentes não tóxicos e pouco danosos ao ambiente.

O termo nanopartícula não possui uma única definição e por isso são normalmente referidas como sendo partículas com pelo menos uma dimensão na faixa nanométrica (1 - 100 nm). Porém já é conhecido e já faz parte da definição das grandes agências regulatórias, como o FDA (*Food Drug Administration*) (www.fda.gov), por exemplo, que nanopartículas são estruturas que apresentam propriedades (incluindo as físicas ou químicas ou efeitos biológicos) ou fenômenos, que podem ser atribuídos à sua dimensão, mesmo que estas estejam fora da faixa nanométrica (1 – 100 nm), até 1 μm . Desta forma, partículas menores que 1 μm podem ser consideradas nanoestruturas desde que apresentem propriedades completamente novas ou melhoradas baseadas em suas características específicas, como tamanho, distribuição, fase, morfologia (flocos, esferas, formas dendríticas, etc.) (Willems, 2005), cristalinidade, entre outros, quando comparadas com partículas de maiores dimensões provenientes da mesma fonte. Como já mencionado, as nanopartículas metálicas têm grande aplicação em vários

domínios, como na tecnologia de sensores, aparelhos ópticos, catálise, marcadores biológicos e sistemas de transporte de drogas (Daniel e Astruc, 2004).

1.1.1 Propriedades ópticas das Nanopartículas Metálicas

As propriedades ópticas observadas em materiais no estado sólido podem ser classificadas de acordo com os fenômenos ópticos, como a reflexão, propagação e transmissão. Um feixe de luz ao incidir em um meio faz com que essa luz disperse, podendo ocorrer diversos fenômenos. Parte dessa luz é refletida da superfície frontal, enquanto o resto penetra e propaga-se no meio. Neste último caso, três processos podem ocorrer: a refração, a absorção e a dispersão. Na refração a luz propaga-se através do meio, no entanto mais lentamente do que no vácuo. Esta redução de velocidade leva os raios de luz a mudarem de direção nas interfaces. A refração em si não afeta a intensidade da luz à medida que ela se propaga através do meio. A absorção ocorre durante a propagação se a frequência do feixe da luz estiver em ressonância com as frequências de transição quântica dos átomos ou moléculas do meio. Neste caso, o feixe é atenuado à medida que se propaga (Glomm, 2005). Como já mencionado, quando NPM esféricas são irradiadas pela luz ocorre o denominado efeito de ressonância do plasma de superfície (SPR) (Kelly e Coronado, 2003; Sonnichsen *et al.*, 2002), onde há a oscilação coletiva de elétrons livres na superfície da partícula, absorvendo parte da luz visível (Figura 1).

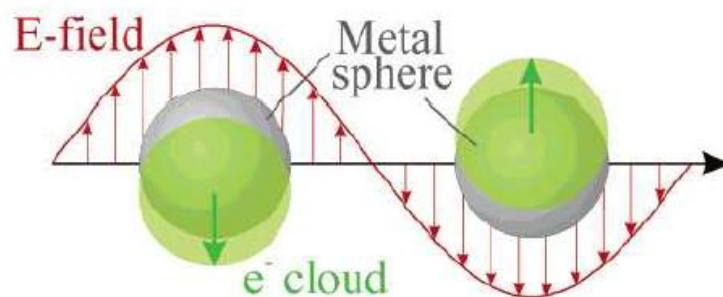


Figura 1. Esquema da oscilação de um *plasmon* para uma esfera, e o deslocamento da nuvem eletrônica dos elétrons (Kelly e Coronado, 2003).

Tendo em vista que as propriedades ópticas das NPM são bastante dependentes do tamanho da partícula, Mie (Mie, 1908) aplicou a teoria geral da extinção de luz em partículas pequenas. Com a variação do tamanho e forma da partícula, o espectro de absorção óptica das nanopartículas apresenta mudanças na banda *plasmon*, tais como variação na intensidade e desvio do seu comprimento de onda máximo (Glomm, 2005). Dos três metais que apresentam ressonância *plasmon* no espectro do visível (Au, Ag e Cu), a prata é o metal que exibe uma maior eficiência na excitação do *plasmon*. Assim, uma AgNPs interage com a luz mais eficientemente do que uma partícula do mesmo tamanho constituída por qualquer outro cromóforo orgânico ou inorgânico (Evanoff e Chumanov, 2005).

1.1.2 Síntese das nanopartículas metálicas (NPM)

Atualmente, a investigação na área da nanotecnologia está focada na síntese controlada de nanopartículas com diferentes tamanhos, formas e composição química, e no controle da sua dispersão de tamanho para

aplicações com benefício ao ser humano. As nanopartículas começaram a ser produzidas por via química e física, com elevada eficiência, obtendo-se partículas puras e com propriedades bem definidas. No entanto, estes métodos de síntese são, geralmente, considerados dispendiosos e potencialmente perigosos ao ambiente.

Desta maneira, a síntese de nanopartículas tem atraído a atenção de pesquisadores em virtude de diferentes características físicas e químicas que possuem, como por exemplo, a alta relação superfície/volume, que não são encontradas em materiais convencionais (escala micro ou macroscópica), e que permitem aplicações atrativas em vários campos como medicina, biotecnologia, catálise, óptica e indústria de alimentos (Gúzman *et al.*, 2009). Desta maneira, não somente o estudo, mas principalmente o uso de materiais na escala nanométrica (10^{-9} m) vem ganhando cada vez mais destaque, entretanto, tais materiais não são tão novos assim. Pesquisas mostram que antigos artefatos já utilizavam nanomateriais, como o cálice de Lycurgus feito pelos romanos (Freestone *et al.*, 2007), esculturas e pinturas maias que continham pigmentos azuis, provenientes de nanopartículas de óxidos e metais (Yacaman *et al.*, 1996) e também inúmeras cerâmicas chinesas que continham nanopartículas de ouro (Camusso e Bortone, 1991).

A nanotecnologia tem se tornado hoje em dia um campo promissor pelo fato da atual capacidade de estudo, caracterização e também manipulação destes materiais, através de técnicas microscópicas, espectroscópicas, de difração de raio-X, entre outras. Efeitos como superfície plasmônica em nanopartículas metálicas (Zhang e Noguez, 2008), possibilidade de liberação controlada de fármacos (Zhang *et al.*, 2006), aumento no poder de catálise (Murugadoss e Chattopadhyay, 2008) e ação bactericida de nanomateriais (Yuan *et al.*, 2007), são compreendidos de uma maneira mais ampla tornando

suas aplicações cada vez mais plausíveis. A descoberta de novas propriedades, ou mesmo a melhora das já existentes, forneceram um vasto campo de aplicações, tanto industriais como tecnológicos e científicas.

Por definição, nanomateriais encontram-se na escala de tamanho de 1 a 100 nm (Durán *et al.*, 2006) podendo variar quanto ao seu tamanho e forma, área superficial e composição química. Como o número de átomos nestes nanomateriais pode estar compreendido no intervalo de 10^2 até 10^6 , há uma contribuição considerável para o aumento dos efeitos de superfície, que, no caso dos materiais *bulk*, tem porcentagem mínima. Devido ao tamanho reduzido, a razão superfície/volume aumenta significativamente em comparação àquela observada nos materiais em escala micro e macroscópica, aumentando assim os efeitos de superfície. Sendo assim, utilizando-se a mesma quantidade de material, as nanoestruturas se mostram mais reativas, motivando, desta maneira, a pesquisa destes materiais em escala nano.

Com isso, motivados pelo aumento da reatividade dos materiais em escala nanométrica e baseado no conhecimento da prata como agente bactericida (Durán *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2005; Morones *et al.*, 2005), inúmeros pesquisadores vêm desenvolvendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas (Yuan *et al.*, 2007; Rhim *et al.*, 2006). Por exemplo, colóides de prata apresentam ação frente à uma variedade de micro-organismos (Durán *et al.*, 2007), como *E. coli* (Baker *et al.*, 2005), *S. aureus* (Rhim *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2007), *V. cholera* (Morones *et al.*, 2005).

Materiais nanométricos podem ser sintetizados por diferentes métodos, por exemplo, o químico e o biológico, os quais se baseiam em reações realizadas em solução que levam a formação de colóides onde as partículas ficam dispersas em um solvente (Oliveira, 2005).

A primeira síntese documentada de nanopartículas metálicas foi realizada por Faraday (Edwards *et al.*, 2007) . Desde então, inúmeras rotas de síntese tem sido sugeridas e efetuadas (Pyatenko *et al.*, 2004; Raveendran *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003), em busca de uma menor dispersão da morfologia, novas estruturas, ou o uso de reagentes e rotas mais brandas ao meio ambiente. Nesta busca, em particular para as AgNPs, foram utilizados inúmeros precursores como iodeto de prata (AgI) (Sun *et al.*, 2003), perclorato de prata (AgClO₄), tetrafluorborato de prata (AgBF₄), hexafluorofosfato de prata (AgPF₆) e nitrato de prata (AgNO₃) (Barsotti *et al.*, 2004), sendo que os precursores AgClO₄, AgBF₄, AgPF₆ tinham uma rápida reação inicial para a formação das nanopartículas. Entretanto, após 10 min, a velocidade da reação sofria considerável diminuição. Por outro lado, o AgNO₃ possuía uma reação lenta e constante, favorecendo um melhor controle da morfologia através dos fenômenos de nucleação e crescimento das partículas (Patakfalvi *at al.*, 2004).

Para nanopartículas metálicas, o método químico utiliza reagentes químicos (agentes redutores) para promover a redução dos íons metálicos ao seu estado de oxidação zero. Neste processo, porém, as nanopartículas são estabilizadas com surfactantes, por exemplo, podendo sofrer alterações em termos de tamanho e de distribuição devido a vários fatores, como por exemplo, a natureza química do surfactante, o potencial de redução do agente redutor, a temperatura, entre outros (Gulrajani *et al.*, 2007). Os métodos químicos permitem produção em larga escala e em curto período de tempo, no entanto, necessitam de muita energia e empregam, em geral, reagentes tóxicos (Durán *et al.*, 2010).

Em decorrência dessas desvantagens, o desenvolvimento de métodos mais simples, seguros e que geram pouco ou nenhum resíduo tóxico tem despertado maior interesse na síntese de nanopartículas inorgânicas, como as

de prata, por exemplo, (Durán *et al.*, 2009). Uma alternativa que tem se mostrado viável é a produção de nanopartículas metálicas pelo método biológico, no qual são utilizados micro-organismos como, fungos (Castro-Longoria *et al.*, 2011; Durán *et al.*, 2007), bactérias (Sintubin *et al.*, 2009; Fayaz *et al.*, 2011; Lengke *et al.*, 2007), leveduras (Kowshik *et al.*, 2003; Agnihotri, 2009), extratos de plantas (Dubeya *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010), entre outros. Este método não utiliza reagentes ou solventes tóxicos, além de ser possível a preparação de partículas com uma faixa estreita de diâmetro, pouco polidispersas e já estabilizadas por proteínas do próprio micro-organismo.

Segundo Gade *et al.* (2008) o uso de micro-organismos assume relevância em tecnologias verdes na síntese de matérias e é uma possibilidade bastante atrativa para uso na nanotecnologia. Neste sentido, muitos pesquisadores têm explorado a síntese bioquímica por micro-organismos e principalmente por fungos (Sastry *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2006; Gericke e Pinches, 2006). Além disso, a aplicação de fungos na produção de partículas metálicas é mais viável em comparação ao uso de bactérias, pois estes apresentam:

- (1) alta tolerância a metais e alta capacidade de ligação à parede, assim como capacitação intracelular de metal;
- (2) facilidade de cultura em larga escala;
- (3) o processo e a manipulação da biomassa podem ser mais simples;
- (4) o processo pode ser estendido para a síntese de nanopartículas de diferentes composições químicas, formas e tamanhos;
- (5) viabilidade econômica e possibilidade de fácil expansão para cobertura de grandes superfícies por adequado crescimento do micélio.

Vários estudos foram efetuados por diversos autores, que apresentam mecanismos para formação de nanopartículas. O processo ocorre em duas fases: nucleação e crescimento, sendo que nenhum destes ainda é completamente elucidado, devido à dificuldade de se isolar cada um durante o processo. Ambos os processos (nucleação e crescimento) são os mecanismos que controlam o tamanho e a distribuição das nanopartículas. A síntese por precipitação é iniciada pelos cristalitos formados na fase de nucleação, onde há a formação de pequenos aglomerados de átomos denominados núcleos ou sementes, devido à presença do agente redutor com conseqüente redução do íon prata ao estado metálico (Patakfalvi e Dekany, 2005). Após esta etapa, ocorre um segundo processo, o crescimento, onde ocorre a agregação de tais cristalitos, a etapa de crescimento, e os núcleos pré-formados crescem por deposição de novos núcleos na superfície dos já existentes (Figura 2). Vale ressaltar que ambas as etapas podem coexistir, entretanto o crescimento só ocorre depois da etapa de nucleação.

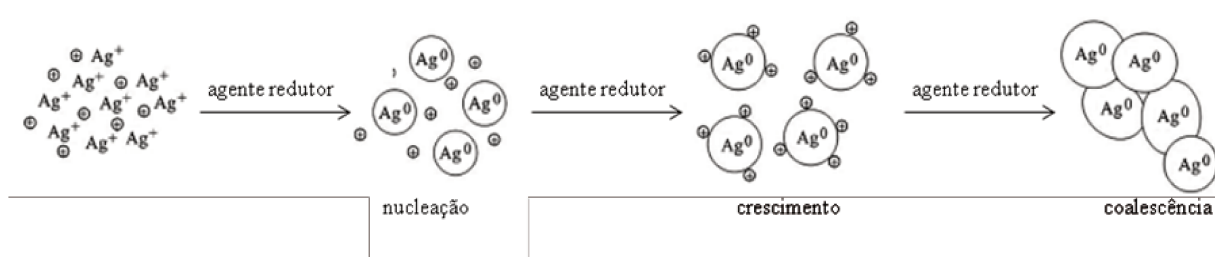


Figura 2. Esquema representativo da formação de nanopartículas de prata (+: íons Ag^+) (adaptado de (Patakfalvi e Dekany, 2005)).

Na formação de nanopartículas em fase líquida (síntese coloidal), os átomos ou partículas, devido ao movimento Browniano, sofrem inúmeras colisões uns com os outros, envolvendo simultaneamente milhares de partículas (Figura 3b). Tais colisões produzem agrupamentos momentâneos

com certo grau de ordenação. Dependendo do raio de tal agrupamento, conhecido como *cluster*, este pode se re-dissolver, ou vir a evoluir em partículas. Esta dependência é determinada por fatores termodinâmicos, como temperatura de fusão e a energia livre de Gibbs. A Figura 3a ilustra os fenômenos de formação das nanopartículas, como nucleação, crescimento, *ripening* de Ostwald e aglomeração em função do tempo de reação. Os *clusters* em escala nanométrica aumentam de tamanho pelo incremento de novas partículas, enquanto a perda das mesmas ocasiona sua dissolução. Tais *clusters* constituem os núcleos, nos quais a estrutura da NP, ou nova fase, irá ser formada.

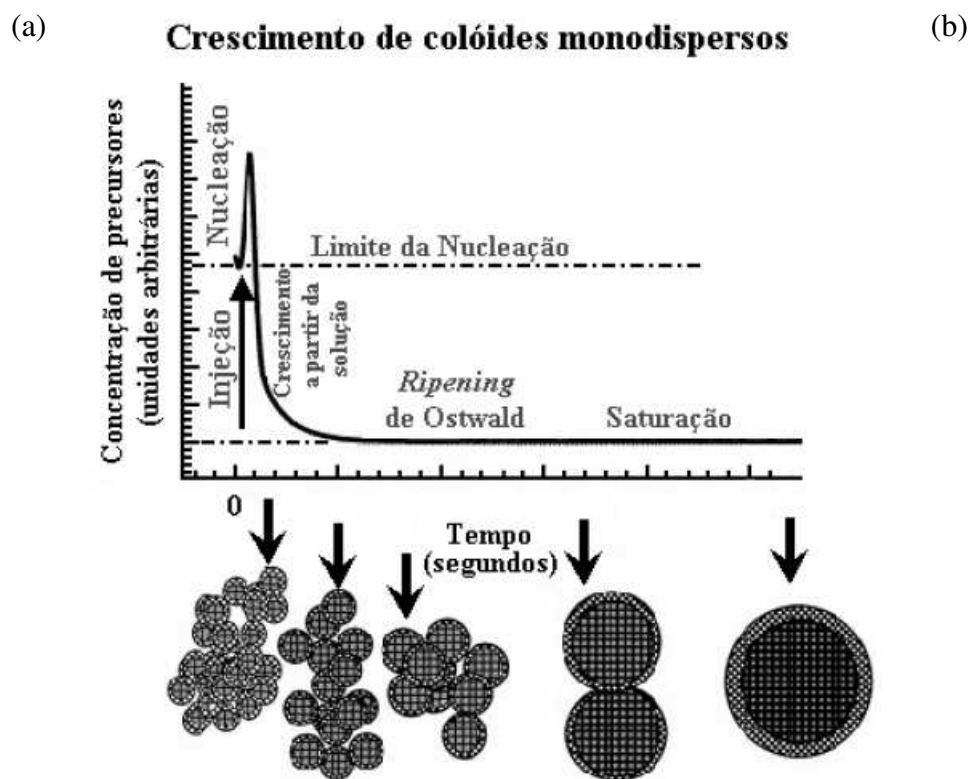


Figura 3. (a) Diagrama representando o processo de formação de NPs em função do tempo de reação. (b) crescimento dos *clusters* devido às colisões provenientes do movimento Browniano. (adaptada da Tese de Doutorado da Dr. Marcela Oliveira (Oliveira, 2005))

Os produtos gerados na síntese coloidal (em meio líquido) são geralmente espécies pouco solúveis, formadas sob condições de supersaturação. O maior controle sobre a solubilidade e supersaturação resulta em um maior número de núcleos, e conseqüentemente nanopartículas menores, com uma menor dispersão de tamanho. Contudo, processos secundários podem se tornar importantes como o *ripening* de Ostwald, onde partículas maiores consomem partículas menores, e/ou ocorre a aglomeração, afetando drasticamente o tamanho final das nanopartículas (Madras e McCoy, 2001). Na grande parte das sínteses coloidais, a condição de supersaturação é atingida por meio de uma reação química, por exemplo, a redução (no caso das NPM). Portanto, variáveis de reação como molaridade entre reagentes, ordem da adição, temperatura e velocidade das reações afetam diretamente a morfologia e o diâmetro das partículas formadas (Pillai e Kamat, 2004; Kim *et al.*, 2006).

O mecanismo de produção biogênica das AgNPs ainda está sob investigação. Porém, alguns trabalhos sugerem mecanismos como a formação destas partículas ocorre, sendo que a síntese intracelular tem sido demonstrada ocorrer, por exemplo, em espécies de *Verticillium* (Murkherjee *et al.*, 2001) e *Neurospora crassa*; enquanto a extracelular tem sido observada para as espécies fungicas *Trichoderma flavus* (Jain *et al.*, 2011), *Aspergillus fumigatus* (Bhainsa e D'Sousa, 2006) e *Fusarium oxysporum* (Durán *et al.*, 2005).

Por exemplo, Ahmad *et al.* (2003) sugeriram que a formação das nanopartículas de prata pelo *F. oxysporum* parece ser iniciada por uma transferência de elétrons de NADH por uma enzima redutase NADH dependente, a qual, acreditam os autores, seria a responsável pela redução dos íons Ag^+ e subsequente formação das AgNPs. Quando o estudo se deu com

outro tipo de fungo, o *Fusarium moniliforme*, não foi observada a formação das nanopartículas. Desta maneira, os autores sugerem que micro-organismos que não possuem estas substâncias não são capazes de reduzir os íons prata. Portanto, redutases NADPH dependentes, nitrato redutases dependentes e quinonas são tidas como iniciantes na síntese biogênica de nanopartículas de prata (Naveen *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2007).

Na mesma linha de pesquisa, Durán *et al.* (2005) demonstraram que este mecanismo ocorre de forma extracelular, como ilustrado na Figura 4, devido à presença das enzimas redutase e de antraquinonas secretadas pelo fungo. Através de análises de UV/Vis, fluorescência e atividade enzimática, foi verificado que enzimas redutase nitrato dependentes e quinonas estão envolvidas na redução dos íons prata à prata metálica. Mais tarde, em 2008, os resultados obtidos por Durán *et al.* foram confirmados por Ingle *et al.* (2008), os quais biossintetizaram AgNPs a partir de *Fusarium acuminatum*.

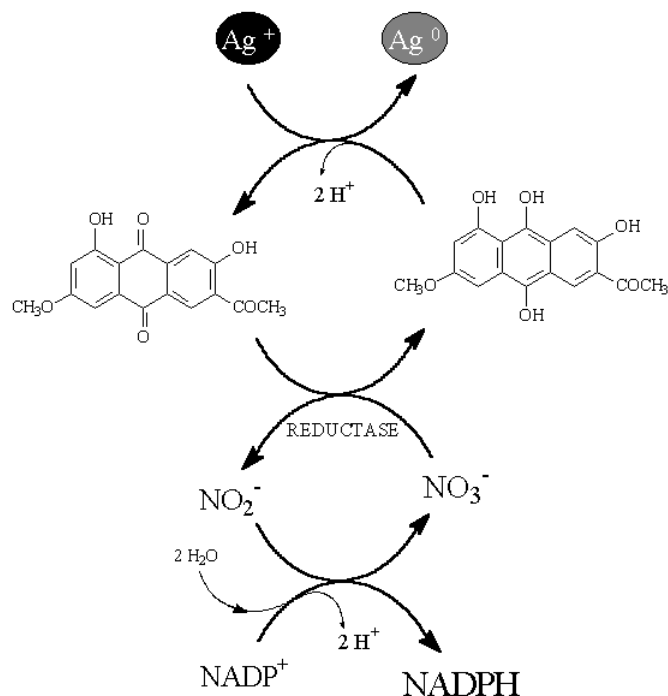


Figura 4. Mecanismo proposto por Durán *et al.* (2005) para a biossíntese de AgNPs.

1.1.3 Caracterização das NPM

A caracterização de NPM tem sido obtida através da utilização de técnicas espectroscópicas, microscópicas e espalhamento dinâmico de luz. Com isto, torna-se possível a determinação do tamanho, da morfologia, da composição, bem como da cristalinidade destas partículas. As técnicas utilizadas neste trabalho para a caracterização das AgNPs são apresentadas no Apêndice V.

1.2 Procedimento Experimental

A parte experimental deste capítulo está dividida em: (1.2.1) Cultura do fungo *Fusarium oxysporum*, (1.2.2) Biossíntese das nanopartículas de prata e (1.2.3) Caracterização das nanopartículas de prata, de acordo com procedimento experimental já bem estabelecido na literatura (Ahmad *et al.*, 2003; Durán *et al.*, 2005; Durán *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007).

1.2.1 Cultura do fungo *Fusarium oxysporum*

O fungo *Fusarium oxysporum*, cepa 551, procedente da coleção de culturas do laboratório de Genética Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba) foi o micro-organismo utilizado neste trabalho. O fungo foi cultivado em placas de petri e em meio de cultura sólido (0,5 % extrato de levedura (Neogen), 2 % de extrato de malte (Neogen), 2% ágar (Neogen) e água destilada) mantidos a 28°C por 7 dias em Shaker TECNAL.

1.2.2 Biossíntese das nanopartículas de prata

Após o crescimento do fungo, à biomassa produzida foi adicionada água destilada autoclavada (0,1 g mL⁻¹ massa de fungo/volume de água) sob agitação (150 rpm em um Shaker TECNAL) por 72 horas. Após filtração a vácuo (papel de filtro Qualy 9,0 cm diâmetro, 80 g m⁻² gramatura, 205 µm espessura, 14 µm maioria dos poros) foi adicionado ao sobrenadante (Filtrado Fungico - FF) AgNO₃ (Nuclear) 10⁻² mol L⁻¹ mantido a 28°C sob proteção da

luz por tempo indeterminado. A formação das AgNPs foi acompanhada por UV-Vis (GULRAJANI *et al.*, 2007), em um espectrofotômetro Varian/Agilent (Cary 50 Probe), em um intervalo de 220 a 800 nm.

1.2.3 Caracterização das nanopartículas de prata

A morfologia das AgNPs foi observada por TEM e AFM. As imagens TEM foram adquiridas em um microscópio eletrônico de transmissão da Carl Zeiss CEM-902 de 80 KeV, com as amostras ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) depositadas em um porta-amostra de cobre (copper grids-Ted Pella) recoberto com filme de parlódio. O histograma com a distribuição de tamanhos foi obtido através de medição manual pelo programa ImageJ, onde foram analisadas 5 imagens TEM, com medição de aproximadamente 110 partículas. Para as análises por AFM, a dispersão de nanopartículas foi diluída 10 vezes em água destilada e 10 μL foram colocados em mica fixada sob um porta-amostra de latão e secas à temperatura ambiente por 24 h. As imagens foram obtidas em um microscópio de AFM (SPM 9600, Shimadzu) utilizando o modo dinâmico (modo intermitente). Foi utilizado cantilever comercial de silício e a frequência de ressonância da ponta foi de 210-230 kHz.

O diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersividade foi determinado por DLS em um equipamento Zetasizer nano-series (Malvern Instruments). As medidas de potencial zeta (carga superficial) foram feitas no mesmo equipamento após diluição da dispersão das nanopartículas (1:10) em uma solução de KCl (USB) a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

As análises de XPS foram feitas em um espectrômetro UNI-SPECS UHV com pressão de 10^{-6} Pa no laboratório do Prof^o Dr. Peter Hammer

(Instituto de Química – UNESP, Araraquara). Para as análises, a amostra sólida (liofilizada) foi colocada em ultra-vácuo e exposta a radiação de 1,2 KeV.

A técnica de XRD foi usada para a determinação e confirmação da estrutura cristalina das AgNPs, através da deposição da amostra sólida (liofilizada) em um porta amostras de vidro em um Difratorômetro de Raios-X XDR 7000 (Shimadzu).

1.3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos estão divididos nos seguintes itens:

(1.3.1) Cultura do fungo *Fusarium oxysporum* e Biossíntese das AgNPs e

(1.3.2) Caracterização das AgNPs.

1.3.1 Cultura do fungo *Fusarium oxysporum* e Biossíntese das AgNPs

A produção das nanopartículas de prata foi realizada pelo método biossintético, previamente descrito na seção 1.2.2, utilizando o *Fusarium oxysporum*, um fungo filamentosos que, quando submetido à crescimento em placas de petri em meio sólido possui aspecto esponjoso e cotonoso. É formado por filamentos macroscópicos e ramificados, as hifas, que em conjunto dão origem ao micélio. Esporos e esporângios (em destaque na Figura 5b) também são encontrados e estão envolvidos na reprodução sexuada e assexuada deste fungo. É um patógeno mais vegetal do que animal,

responsável pela *Fusarium wilt*, doença que causa o murchamento, a necrose, a queda prematura das folhas, entre outros sintomas. A Figura 5a mostra a imagem de uma cultura do *Fusarium oxysporum* em placa de petri produzida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Química da Unicamp.

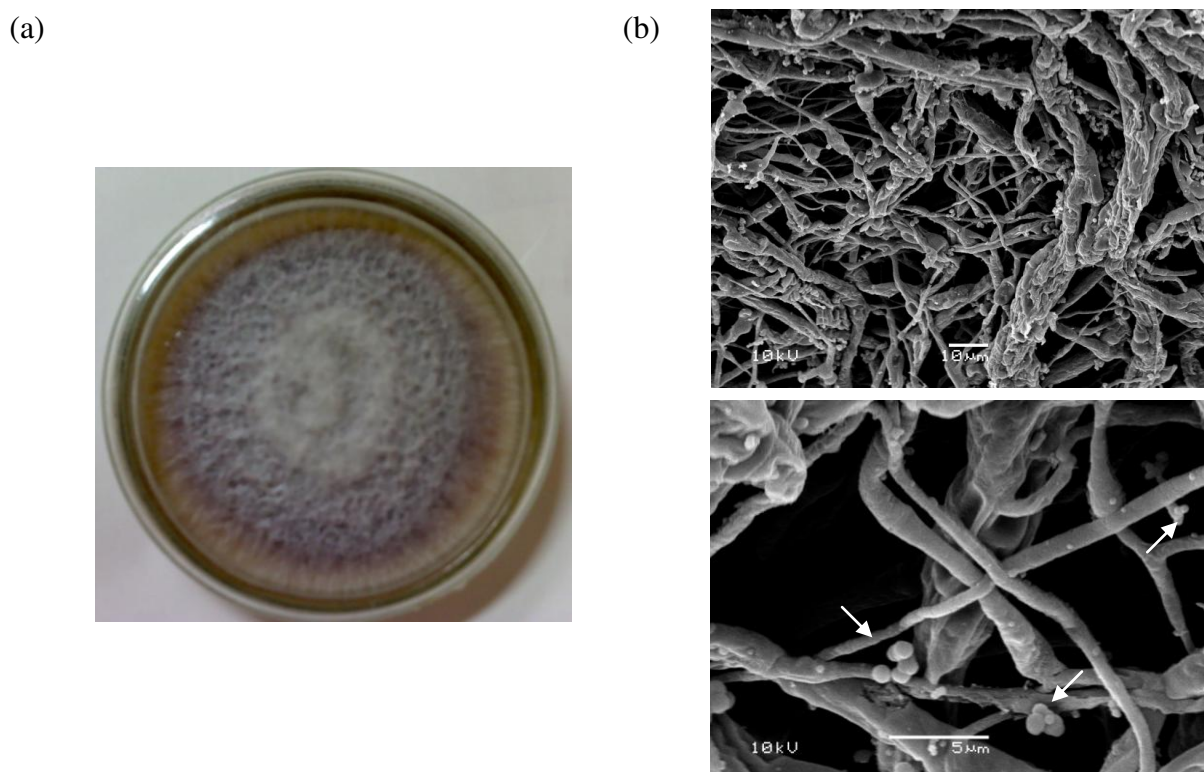


Figura 5. (a) Imagem da cultura do *F. oxysporum* (cepa 551) em meio sólido e (b) micrografias (MEV) do fungo. Em destaque (setas brancas): esporos e esporângios.

Na Figura 6 estão tubos de ensaio contendo o (a) filtrado fúngico (FF) e de (b) suspensão de AgNPs. Nota-se que o filtrado fúngico apresenta coloração amarelada enquanto que, após a adição dos íons Ag^+ a solução muda para marrom conforme o curso da reação (início da mudança de cor em 24 horas).

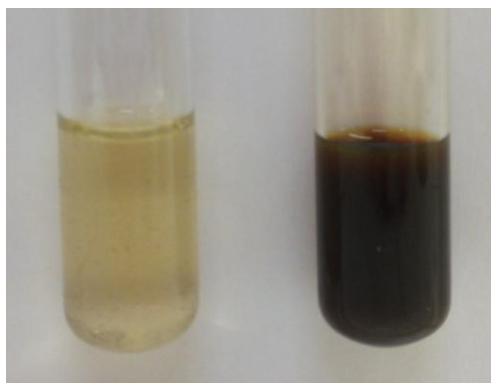


Figura 6. Figura dos frascos contendo (esquerda) filtrado fúngico e (direita) suspensão de nanopartículas de prata depois de 168h de reação.

A mudança na coloração da solução é a primeira evidência da formação das AgNPs, que se confirma através da espectroscopia UV-Vis, como ilustrado nas Figuras 7 e 8 (descontada a absorvância de 0h), que mostram a dependência da intensidade da banda *plasmon*, em 440 nm (Gurunathan *et al.*, 2009; Sintubin *et al.*, 2009) com o tempo de reação, até sua estabilização em 168 horas de reação. A partir deste período todas as análises foram realizadas.

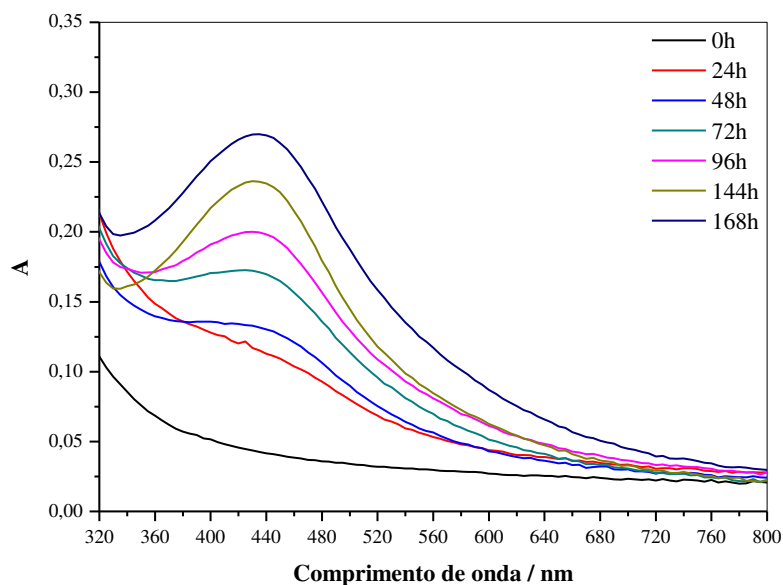


Figura 7. Espectro UV-Vis em função do tempo de reação em solução aquosa 10^{-2} mol L⁻¹ de AgNO₃ com o filtrado fúngico.

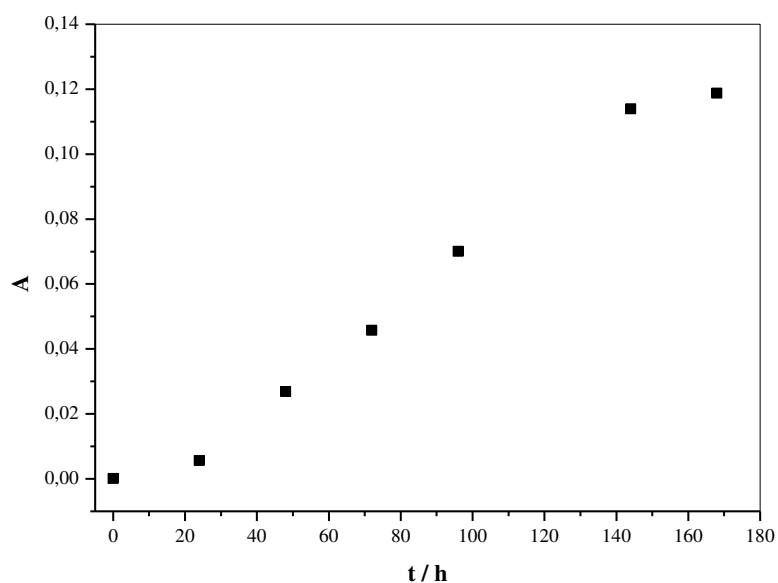


Figura 8. Intensidade da absorvância da banda *plasmon* (440 nm) em função do tempo de reação.

A Figura 9 mostra o espectro UV-Vis com destaque na região de baixos comprimentos de onda. Um ombro em aproximadamente 260 nm é visualizado, podendo estar associado a excitações eletrônicas nos resíduos de aminoácidos aromáticos das proteínas presentes (Ahmad *et al.*, 2003) (triptofano (Trp, W) e tirosina (Tyr, Y) (Eftink e Ghiron, 2005)). Esta observação indica a possível liberação de proteínas em solução pelo *F. oxysporum* e sugere um mecanismo provável para a redução dos íons metálicos presentes na solução (Durán *et al.*, 2005).

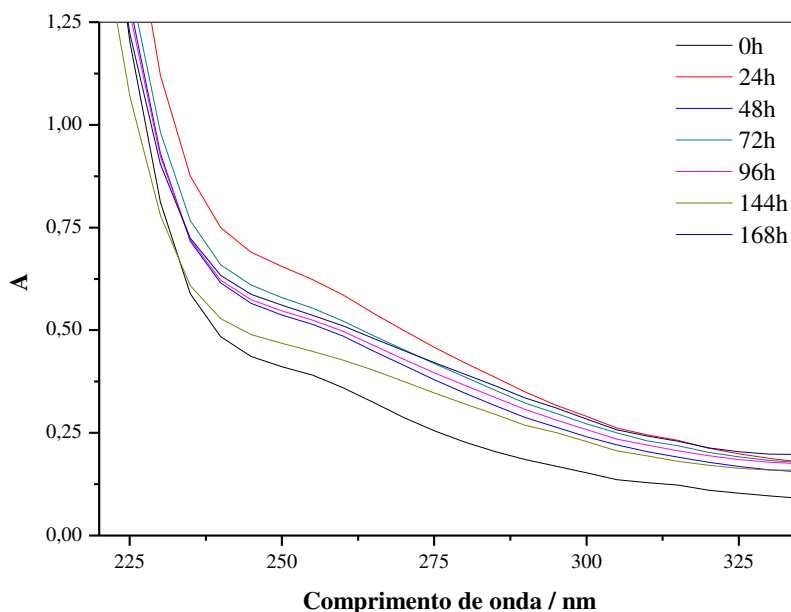


Figura 9. Espectro UV-Vis em função do tempo de reação em solução aquosa $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 com o filtrado fúngico, com destaque para a região de baixos comprimentos de onda.

1.3.2 Caracterização das nanopartículas de prata

O diâmetro das nanopartículas, medido por TEM, foi igual a $28,0 \pm 13,1$ nm. As Figuras 10a₁ e 10a₂ mostram imagens obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão, bem como a distribuição de tamanho representada pelo histograma obtido por esta técnica (Figura 10b). Observam-se partículas esféricas, relativamente homogêneas e praticamente monodispersas (índice de polidispersividade igual a 0,27, medido por DLS), além de uma “massa” esbranquiçada (diferença de contraste) ao redor das partículas, a qual acredita-se que sejam proteínas secretadas pelo fungo e que estabilizam estas partículas, em concordância com as medidas de espectroscopia UV-Vis (características de AgNPs bem dispersas e absorção na região de baixos

comprimentos de onda). Considerando o tamanho das partículas e as imagens obtidas por TEM, pode-se inferir que a capa proteica possui ao redor de 1/3 do tamanho da partícula metálica.

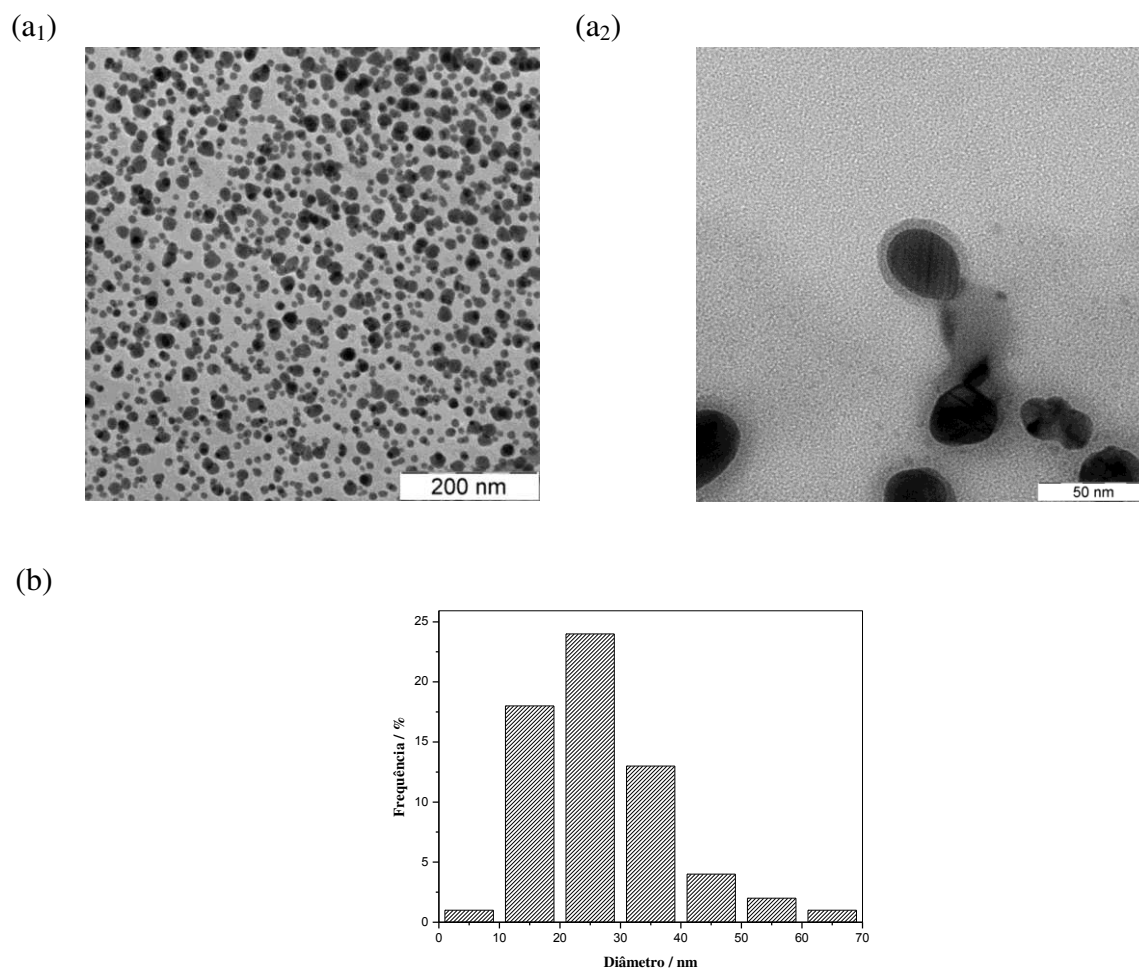


Figura 10. (a₁ e a₂) Micrografias TEM das AgNPs 0,5 mg mL⁻¹, depositadas em um porta-amostra de cobre (copper grids-Ted Pella) recoberto com filme de parlódio (80 KeV) e (b) histograma da distribuição de tamanho obtida por TEM para as nanopartículas.

A microscopia de força atômica também foi utilizada para caracterizar a morfologia (Sadhsivam *et al.*, 2010) das AgNPs sintetizadas, como mostra a Figura 11.

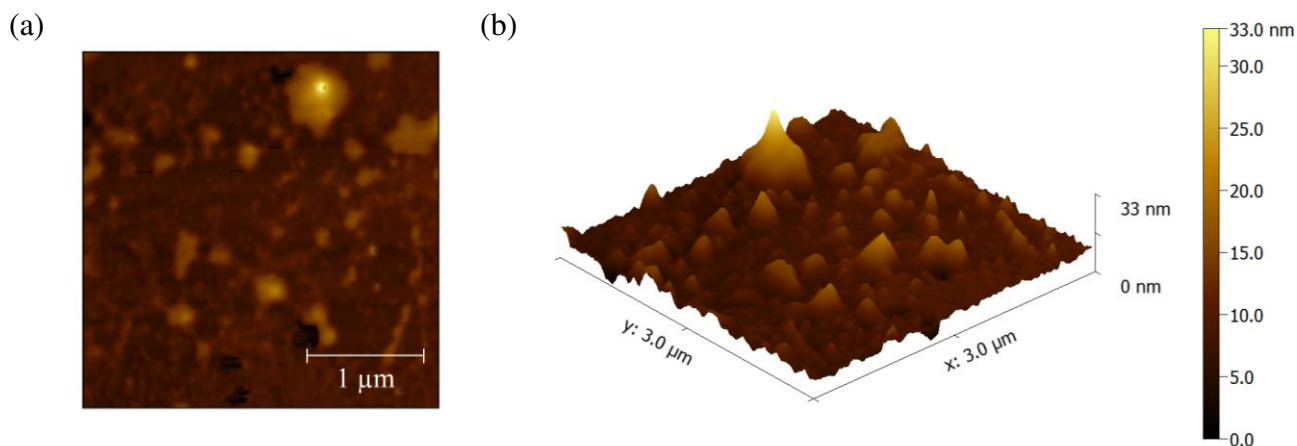


Figura 11. Morfologia das AgNPs biogênicas. (a) topografia AFM (área escaneada $3,00 \times 3,00 \mu\text{m}^2$) e (b) representação 3D da topografia (área escaneada $3,00 \times 3,00 \mu\text{m}^2$)

Por AFM, em concordância com os resultados obtidos por TEM, foram verificadas partículas esféricas e relativamente homogêneas.

A carga superficial das nanopartículas também foi avaliada, sendo obtido um valor de potencial zeta negativo ($-31,7 \pm 2,8 \text{ mV}$). A presença de carga na superfície da partícula, juntamente com a presença de proteínas ao redor das mesmas, confere a estas uma alta estabilidade (cerca de 4 meses; período em que foi analisada) sem qualquer evidência de ocorrência de aglomeração.

A composição superficial das AgNPs foi avaliada por XPS. As análises dos espectros, mostrados na Figura 12, revelam a presença de elementos como C, O, Ag e N, em maiores quantidades e P, Cl e S em menores quantidades (Tabela 1).

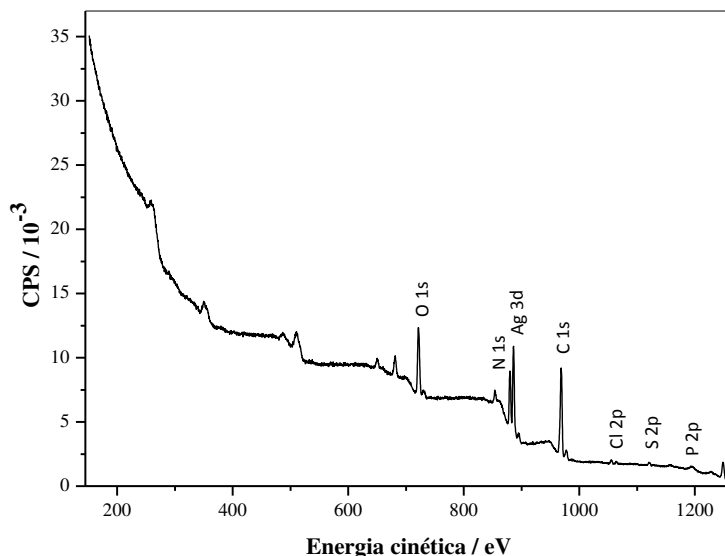


Tabela 1 -
Porcentagem de
ocorrência elementar
na amostra analisada
por XPS

Elemento	% de ocorrência na amostra
C 1s	67,6
O 1s	19,8
Ag 3d	5,36
N 1s	4,18
P 2p	1,70
Cl 2p	1,08
S 2p	0,30

Figura 12. XPS da amostra de AgNPs (0 a 1300 eV).

Como esperado, Ag (proveniente das nanopartículas), C, O, N, S e P (associados às proteínas) foram encontrados na amostra, sendo que P e Cl podem estar relacionados com modificações pós-traducionais nas proteínas, como por exemplo, fosforilação (adição de um grupo fosfato a um aminoácido da cadeia proteica) ou provenientes do meio de cultura utilizado no crescimento do *F. oxysporum*.

Os espectros de alta resolução de XPS encontram-se ilustrados nas Figuras 13 a 16. A deconvolução de cada um dos espectros apresentados foi realizada por aplicação de funções de Gaussianas.

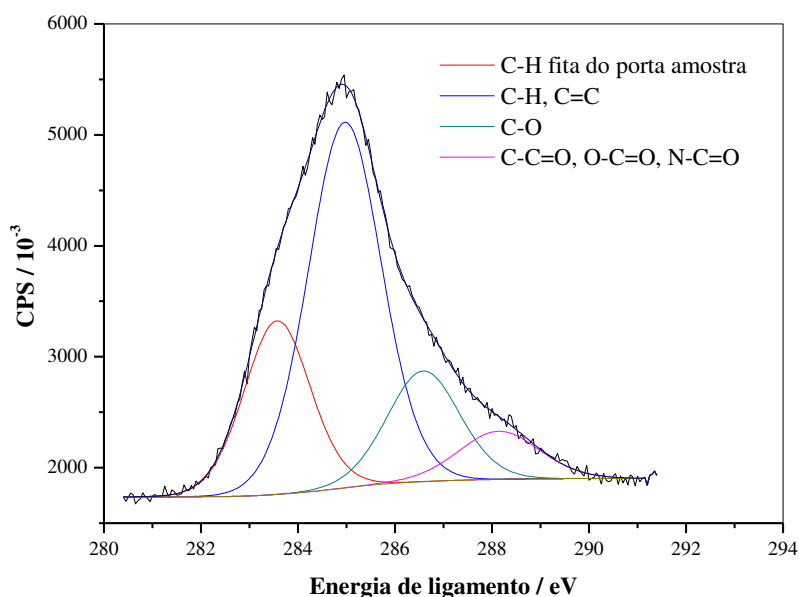


Figura 13. Espectro XPS C 1s.

A deconvolução do sinal para o carbono resultou no aparecimento de quatro componentes: 283,57, 286,6 e 284,96 eV atribuídos à ligação C-H, C-C e C=C, atribuídos aos anéis aromáticos dos resíduos de aminoácidos da tirosina, fenilalanina e triptofano e a banda em 288,1 eV atribuída à emissão dos elétrons dos átomos de carbono dos grupos carbonila (N-C=O / O-C=O / C-C=O), como também observado por Rani e Rajasekharreddy (2011), que caracterizaram nanopartículas de prata (17 a 28 nm de tamanho) utilizando extratos de folhas de *Piper betle*, uma espécie de pimenta.

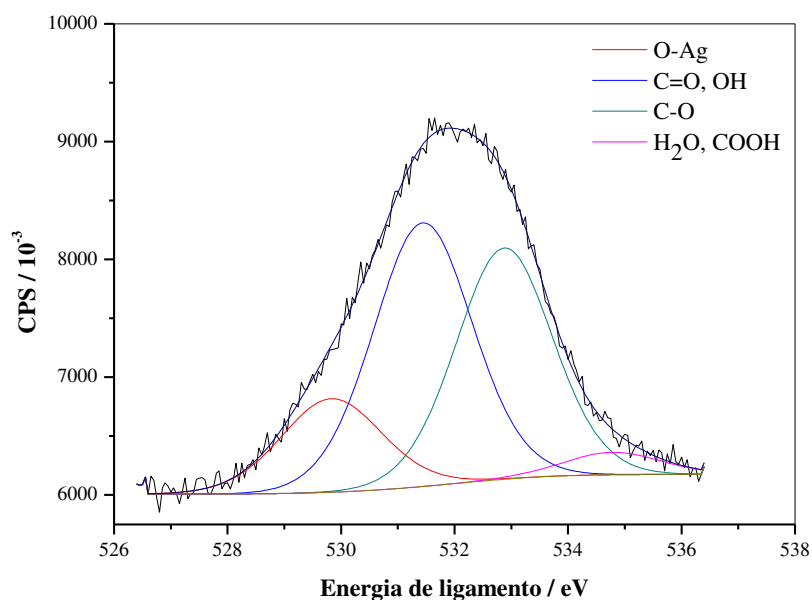


Figura 14. Espectro XPS O 1s.

O sinal do oxigênio foi decomposto em quatro componentes a 529,8, 531,4, 532,8 e 534,8 eV, atribuídos à O-Ag (formação de pequena quantidade de óxido de prata na superfície das nanopartículas de prata); C=O, C-O / COOH (devido à presença de proteínas ao redor das nanopartículas de prata), respectivamente, como reportado por Ullah *et al.* (2006), na síntese de prata coloidal através da redução de AgNO₃ com glicerol na presença de 1,3-diaminobenzeno.

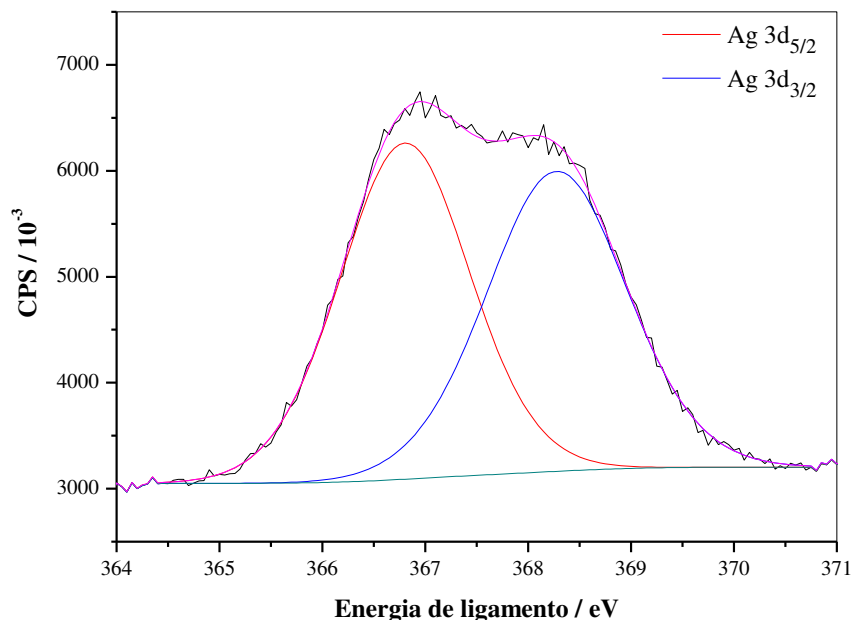


Figura 15. Espectro XPS Ag 3d.

A deconvolução do sinal da prata resultou no aparecimento de duas componentes a 366,8 e 368,3 eV correspondentes ao movimento spin-órbita das componentes Ag 3d_{5/2} e Ag 3d_{3/2}, respectivamente, os quais são característicos de Ag como número de oxidação zero (prata metálica), de acordo com o reportado na literatura por Huang *et al.* (2006), os quais prepararam nanopartículas de prata e ouro com diferentes morfologias estabilizadas com glicina. Além de estabilizadora, a glicina, segundo os autores, possui papel importante no controle do pH e na formação de complexos com os íons metálicos (Ag⁺ e Au⁺).

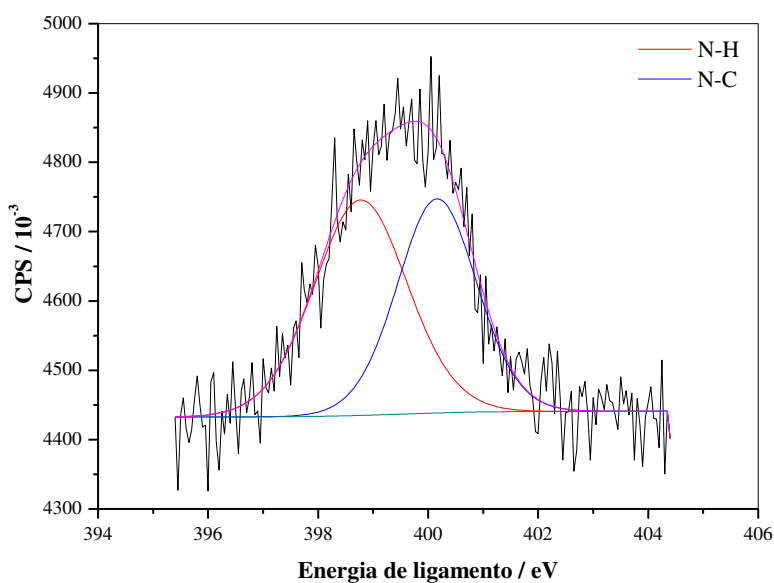


Figura 16. Espectro XPS N 1s.

O sinal do nitrogênio pôde ser decomposto em dois picos. Um em 398,7 e outro em 400,2 eV, ambos atribuídos às ligações N-H e N-C, associadas às proteínas existentes, como também verificado por Li *et al.* (2007), os quais sintetizaram e caracterizaram nanopartículas de prata, de tamanho igual a 10 nm, aproximadamente, através de extratos de *Capsicum annuum*, uma espécie de pimenta.

A estrutura cristalina das AgNPs foi analisada por XRD. O difratograma obtido está mostrado na Figura 17.

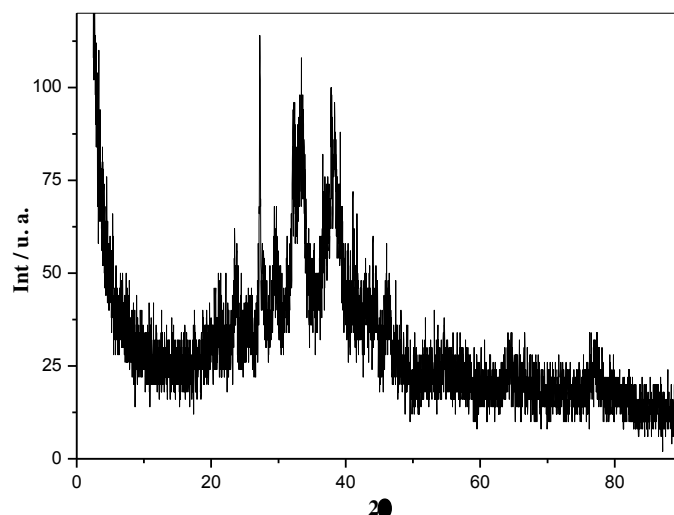


Figura 17. Difratoograma XRD das AgNPs sintetizadas.

As reflexões de Bragg em $2\Theta = 39,18, 44,81, 65,40$ e $77,59^\circ$ podem ser indexadas como planos de reflexão (111), (200), (220) e (311), respectivamente, confirmando a presença de AgNPs com estrutura cristalina cúbica de face centrada (Gopinath *et al.*, 2013), como também observado por Khalil (2013), os quais sintetizaram nanopartículas de prata (20 a 140 nm de tamanho) utilizando quatro espécies de fungo *Aspergillus*, sendo o *Aspergillus terreus*, segundo os autores, o fungo mais promissor e por isso as AgNPs produzidas por esta espécie foram caracterizadas. Vigneshwaran *et al.* (2007b), também caracterizaram por XRD AgNPs biogênicas com 30,5 nm de tamanho, porém a partir de substratos de cogumelos, sendo observado o mesmo padrão de difração obtido para fungos. Os autores ainda afirmam que o intenso sinal *background* se deve à presença de proteínas ao redor das nanopartículas.

Ainda, no caso deste trabalho, as AgNPs produzidas pelo *Fusarium oxysporum*, mostraram uma reflexão em $2\Theta = 33,11$. Segundo Liang-Hong *et*

al. (2010), esta reflexão se refere ao plano (111) de Ag_2O . Desta maneira, acredita-se que a presença de óxido na amostra de nanopartícula de prata pode ser, aparentemente, devido ao fato de que as partículas foram sintetizadas ao ar livre e não sob atmosfera inerte, podendo ter ocorrido a oxidação parcial da prata metálica para íons prata formando espécies deste tipo na superfície.

1.4 Conclusões

Nanopartículas de prata foram biossinteticamente produzidas com a utilização do fungo *F. oxysporum*. Partículas esféricas e relativamente homogêneas, como observado por TEM e AFM, com tamanho ao redor de 28 nm medidos por TEM, e superfície negativamente carregada (potencial - ζ de -31,7 mV) foram obtidas. O método mostrou-se reproduzível com formação de partículas em 168 h de reação, sendo estas estáveis por aproximadamente 4 meses (período em que foram acompanhadas) devido à capa proteica circundante, como verificado por UV-Vis e TEM, e também pela presença de carga superficial.

As análises por XPS forneceram informações a respeito da composição superficial das AgNPs. Os espectros, com as deconvoluções apropriadas resultaram no aparecimento de componentes referentes à presença de proteínas (no caso de C, O, N e S) e componentes relacionadas à prata (espectro Ag 3d) em seu estado de oxidação zero (prata metálica), comprovando a formação das AgNPs. Pequena quantidade de óxido de prata também foi observada, o que era esperado, uma vez que as nanopartículas não foram sintetizadas sob atmosfera inerte. Apesar dos resultados obtidos por XPS, não foi possível chegar a uma conclusão a respeito de quais grupos funcionais das proteínas

estão envolvidos na estabilização das AgNPs. Sendo assim, mais estudos são necessários para compreender os tipos de ligação proteína-AgNPs.

A cristalinidade das AgNPs sintetizadas foi estudada por XRD. Nanopartículas com estrutura cúbica de face centrada foram obtidas, em concordância com trabalhos encontrados na literatura. Além disso, por XRD, em concordância com XPS, foi observada a presença de óxido de prata nas AgNPs indicando que cuidados na síntese devem ser tomados, por exemplo, ao realizar a biossíntese sob atmosfera inerte, para que assim, somente prata metálica seja obtida.

Capítulo 2. Caracterização e Identificação das Proteínas Secretadas pelo *Fusarium oxysporum* Envolvidas na Síntese e Estabilização das Nanopartículas de Prata

2.1 Introdução

Existem muitos relatos sobre a aplicação de sistemas biológicos para a síntese de nanopartículas, mas poucos discutem o mecanismo de sua formação. Durán *et al.* (2005) demonstraram que a formação extracelular das nanopartículas de prata se deve à presença de enzimas redutase e de antraquinonas que são secretadas pelo fungo utilizado em sua síntese. Em micro-organismos, para citar alguns exemplos, antraquinonas já foram isoladas da cultura do fungo endofítico *Phoma sorghina*, associado a *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) (Borges e Pupo, 2006), *Penicillium janthinellum* (Marinho *et al.*, 2005) e *Pleospora sp.* (Ge *et al.*, 2005). Os micro-organismos que não possuem estas substâncias não conseguem realizar a redução dos íons prata. Além disso, ao redor das partículas foi verificada a presença de proteínas secretadas pelo fungo e que são responsáveis pela alta estabilidade destas partículas (Durán *et al.*, 2007; Gade *et al.*, 2008; Parikh *et al.*, 2008).

Deste modo, as proteínas secretadas pelo micro-organismo utilizado na síntese das nanopartículas possuem várias funções: redução dos íons Ag^+ , controle da forma e estabilização da nanopartícula. Grupos carbonila nos resíduos de glutamina e/ou aspartato e grupos hidroxila nos resíduos de tirosina, por exemplo, são sugeridos por Xie *et al.* (2007), como sendo os responsáveis pela redução dos íons Ag^+ . Si e Mandal (2007) reportaram o envolvimento de resíduos de triptofano de oligopeptídeos sintéticos como agentes redutores na síntese de AgNPs. Kumar *et al.* (2007) também verificaram este mesmo mecanismo quando produziram nanopartículas de prata (10-25 nm) *in vitro* estabilizadas por uma capa de peptídeos utilizando a enzima nitrato redutase purificada de *F. oxysporum* na presença de um cofator (NADPH).

Além de enzimas extracelulares, naftoquinonas (Durán *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2003) e antraquinonas (Baker e Tatum, 1998) produzidas por *F. oxysporum* e que apresentam excelente propriedade redox poderiam atuar como transportadoras de elétrons na redução de metais (Newman e Kolter, 2000).

Em 2009, em trabalho realizado por Kathiresan *et al.* (2009), o fungo *Penicillium fellutanum* isolado de *Rhizophora annamalayana* Kathir em manguezal da Índia foi utilizado na produção de nanopartículas de prata. Neste estudo, nanopartículas com diâmetro de 5-25 nm foram obtidas e, pela análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), verificou-se a presença de proteínas de 70 kDa. Este estudo demonstrou a possibilidade da rápida obtenção (em minutos) de nanopartículas de prata utilizando fungos de manguezais.

A interação entre proteínas e nanopartículas de prata dá origem à AgNPs estáveis com a formação do complexo nanopartícula-proteína (Sutherland *et al.*, 1983; Christakopoulos *et al.*, 1995; Christakopoulos *et al.*, 1996), o qual pode ser monitorado por diferentes técnicas. Estas interações biofísicas e bioquímicas ocorrem através de ligações covalentes e interações eletrostáticas (Durán *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2013). AgNPs podem se complexar com grupos tiol (-SH) das cisteínas ou -NH₂ (Chung *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009; Chaloupka *et al.*, 2010) e ainda por interações eletrostáticas (Aymonier *et al.*, 2002), as quais possuem menos influência sobre a conformação e função da proteína. Algumas vezes, proteínas ligadas às AgNPs atraem outras proteínas formando interações proteína-proteína específicas ou não específicas, as quais têm papel importante nas multicamadas ao redor das AgNPs.

Assim sendo, a presença de proteínas e peptídeos que envolvem as

nanopartículas inorgânicas e proporcionam sua alta estabilidade é evidente, porém estudos de caracterização destas biomoléculas que estão envolvidas não somente na síntese, mas também na estabilização destas partículas e qual o seu papel na atividade antimicrobiana ainda não foram descritos na literatura.

Deste modo, este capítulo tem por objetivo apresentar e discutir os resultados obtidos quanto às proteínas que estão envolvidas na biossíntese das AgNPs, de que forma estas biomoléculas interagem com estas partículas, e como estabilizam sua estrutura.

2.2 Procedimento Experimental

Após a síntese e a caracterização das AgNPs, seguiu-se com o estudo e a caracterização das proteínas envolvidas não somente na síntese, mas também na estabilização destas partículas. Para isto, os estudos foram iniciados pela quantificação das proteínas pelo teste clássico de Bradford (Apêndice I).

2.2.1 Quantificação das proteínas

Inicialmente fez-se uma curva de calibração utilizando como padrão a proteína BSA (Sigma-Aldrich), em um intervalo de concentração de 1,0 a 12 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (a partir de uma solução inicial de concentração igual a 1 mg mL^{-1}). Adicionou-se então 200 μL do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) à 800 μL da solução de BSA diluída, misturou-se, esperou-se 5 minutos e efetuou-se a leitura da absorbância em 595 nm, em um espectrofotômetro FEMTO (Cirrus 80 MB), utilizando cubetas de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico.

2.2.2 Determinação estimada da massa molecular das proteínas

A seguir, a análise qualitativa das proteínas foi feita utilizando a eletroforese em gel de acrilamida. As proteínas, juntamente com a solução A (tampão de amostra), foram submetidas à ebulição em banho-maria por 10 minutos, para desnaturação e então analisadas em um gel de eletroforese de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE – 18%) para a determinação da massa molecular aproximada das proteínas. A eletroforese foi conduzida utilizando o aparato Mini VE Vertical Electrophoresis System (Amershan Bioscience), aplicando-se 180 V de diferença de potencial e 100 mA durante aproximadamente 150 minutos, no equipamento Electrophoresis Power Support EPS 301 (GE Healthcare), sendo que o gel ficou imerso em solução C (tampão de corrida). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com uma solução corante por aproximadamente 20 minutos, sob agitação em mesa agitadora pendular (TECNAL TE 241). Em seguida, foi lavado e deixado imerso em uma solução descorante, também sob agitação, sendo esta trocada até a completa descoloração do gel. Todas as corridas eletroforéticas foram feitas aplicando-se um padrão de proteínas de massas molares conhecidas de 14,4 a 97 kDa (Low Molecular Weight – GE Healthcare, LMW), diluídos em tampão para padrão (solução B). Todas as soluções utilizadas no procedimento de eletroforese estão na Tabela II.1 (Apêndice II). Como a expressão das proteínas foi relativamente baixa, conforme observado em testes preliminares (não mostrados), foi feita a aplicação de uma quantidade maior de amostra nos porta-amostra do gel (ao redor de 40 μL e concentração final de proteínas de 20 $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$).

2.2.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As medidas de Espectroscopia FTIR, feitas em pastilhas de KBr, foram realizadas em um equipamento ABB Bomem (MB series), com resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$, em um intervalo de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ e 16 *scans*.

2.2.4 Espectroscopia Raman

As amostras, depositadas em lâminas de vidro e secas à temperatura ambiente, foram analisadas por Espectroscopia Raman em um equipamento Horiba (T64000), com laser 633 nm (vermelho) e 514 nm (verde), com 5 acumulações de 1 segundo cada, no modo average, para a obtenção dos espectros em região mais ampla ($100\text{ a }2000\text{ cm}^{-1}$), e 5 acumulações de 60 segundos cada para a obtenção dos espectros em região de menores números de onda ($100\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$). A potencia do laser foi de 0,1 mW. As análises foram realizadas no Laboratório multiusuário de espectroscopia óptica avançada – LMOA, no Instituto de Química da Unicamp.

2.2.5 Fluorescência

As medidas de Fluorescência foram obtidas em um espectrofluorímetro Perkin Elmer (LS-55), utilizando uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. A excitação das amostras (diluídas 1:1) foi feita em 280 nm,

com fendas de excitação e emissão de 5,0 e 10 mm e aquisição de espectros no intervalo de 300 a 510 nm.

2.2.6 Dicroísmo Circular (CD)

O Dicroísmo Circular foi utilizado para a identificação das estruturas secundárias das proteínas (amostras diluídas 1:10). As medidas foram feitas em equipamento JASCO (J-720, Japão), com intervalo espectral de 185 a 260 nm. Foi utilizada cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm. O programa *CD Spectra Deconvolution Verion 2.1 (CDNN 2.1)* foi utilizado para o cálculo do conteúdo percentual de cada estrutura.

2.2.7 Espectrometria de Massas (MS)

As análises por espectrometria de massas foram realizadas com auxílio do grupo do Prof. Dr. Fábio C. Gozzo (IQ-UNICAMP), utilizando um cromatógrafo nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro Synapt HDMS (Waters), com geometria QTOF, equipado com fonte de nanoESI operando no modo de aquisição dependente de dados (DDA). As proteínas foram analisadas por LC-MS após realização de metodologia baseada em desnaturação seguida de digestão trípica utilizando a enzima tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega), dessalinização e concentração (www.promega.com). Os espectros obtidos foram processados por um software apropriado e analisados por busca no banco de dados NCBIInr

empregando-se o sistema MASCOT v.2.2. (Matrix Science Ltd) (www.matrixscience.com). Como parâmetros da busca foram selecionados:

- digestão: enzima tripsina, com até 1 sítio de clivagem ignorado;
- modificação variável: oxidação em resíduos de metionina (Met, M);
- tolerância de massa de peptídeos e fragmentos: $\pm 0,1$ Da.

O procedimento experimental mais detalhado encontra-se no Apêndice III.

2.3 Resultados e Discussão

Os resultados deste Capítulo estão divididos nos seguintes itens:

(2.3.1) Quantificação das proteínas, (2.3.2) Determinação estimada do peso molar das proteínas, (2.3.3) Espectroscopia no infravermelho (FTIR), (2.3.4) Espectroscopia Raman, (2.3.5) Fluorescência, (2.3.6) Dicroísmo Circular (CD) e (2.3.7) Espectrometria de Massas (MS).

2.3.1 Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas, tanto na amostra do filtrado fúngico quanto na das AgNPs foi feita pelo método Bradford (Bradford, 1976). Para tanto, contruiu-se uma curva de calibração utilizando a BSA como proteína padrão (Figura 18).

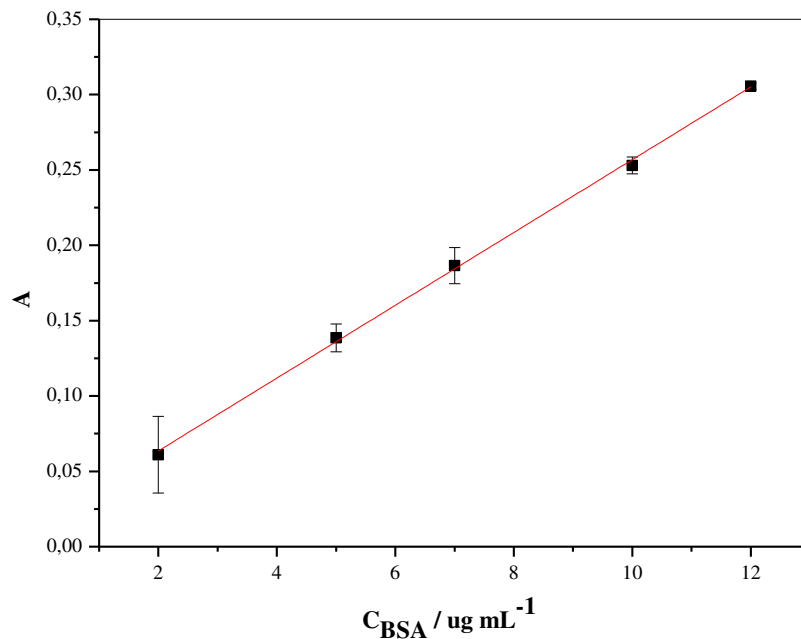


Figura 18. Curva de calibração do Teste de Bradford para quantificação de proteínas em solução. ($A = 0,01524 + 0,022416 C_{amostra}$, $R = 0,998$)

Plotando-se a absorbância em 595 nm das proteínas presentes no FF e na suspensão de AgNPs, foi possível a determinação das concentrações, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações obtidas, com seus respectivos erros, para amostras de filtrado fúngico e nanopartículas de prata $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3

	$C_{amostra}^*$
FF	$1,91 \pm 0,09 \text{ mg mL}^{-1}$
AgNPs	$0,14 \pm 0,08 \text{ mg mL}^{-1}$

*concentrações obtidas já considerando as diluições

Observando-se os dados, tem-se que a quantidade de proteínas presentes na amostra de AgNPs é cerca de 14 vezes menor que a quantidade encontrada no FF, indicando assim que, possivelmente, nem todas as proteínas secretadas

pelo *F. oxysporum* estão envolvidas na síntese ou na estabilização das AgNPs produzidas.

2.3.2 Determinação estimada da massa molecular das proteínas

Após a quantificação, estimou-se a massa molecular das proteínas pela eletroforese em gel, como mostrado na Figura 19. É importante citar que os géis obtidos foram de caráter qualitativo, não sendo tomado cuidado em se aplicar sempre a mesma quantidade de amostra de cada poço do gel.

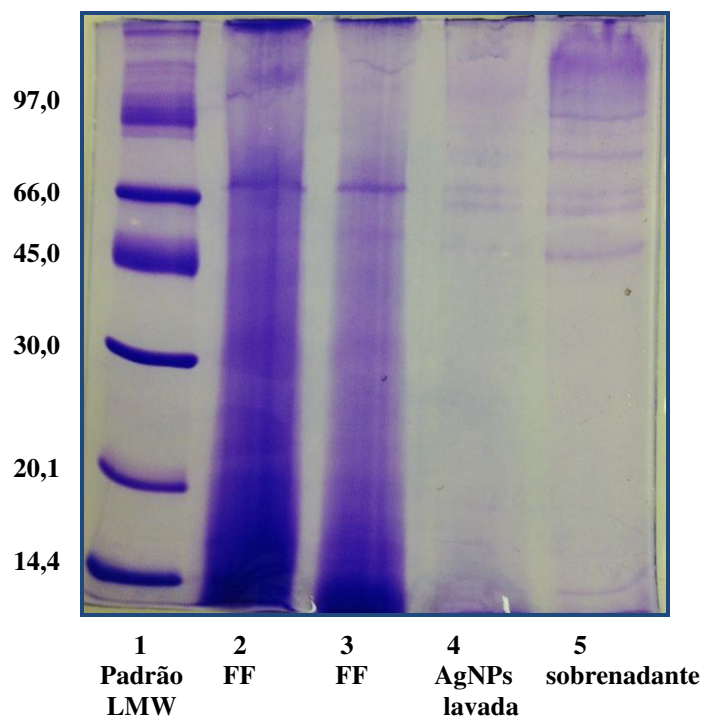


Figura 19. Gel SDS-PAGE 18% para determinação das massas moleculares de proteínas. Da esquerda para direita: 1) marcador de massa molecular – LMW (97-14,4 kDa), 2) e 3) diferentes volumes de FF, 4) AgNPs lavada e 5) sobrenadante da ultracentrifugação.

Os resultados obtidos pela eletroforese também podem ser considerados, ao menos teoricamente, como um primeiro resultado da estimativa da massa molecular das proteínas estudadas.

Para tanto, construiu-se uma curva (Figura 20) do fator de retenção (R_f) das proteínas padrão no gel *versus* o logaritmo da massa molar das proteínas padrão para o gel SDS-PAGE 18% obtido (Figura 19). Plotando-se os valores de R_f das proteínas de interesse nesta curva foram obtidos as massas moleculares estimadas das proteínas secretadas pelo *F. oxysporum*.

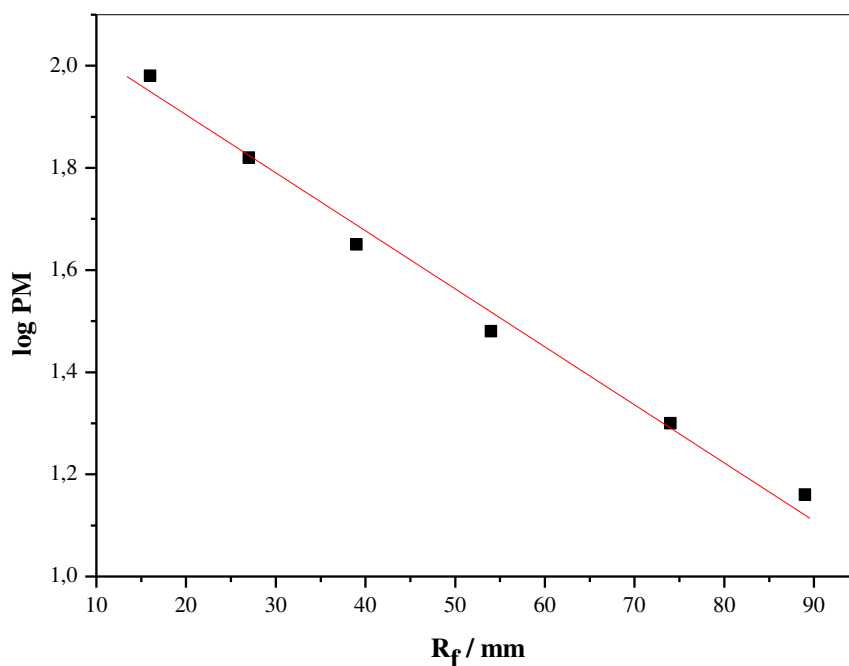


Figura 20. Gráfico log PM *versus* R_f das proteínas do padrão molecular.
 $\text{Log PM} = 4,9896 - 0,0127R_f$ ($R = 0,962$)

Torna-se necessário mencionar que, no gel mostrado na Figura 19 foram analisadas três amostras:

- 2) e 3) FF – Filtrado Fúngico, onde todas as proteínas secretadas pelo *F. oxysporum* estavam presentes;

- 4) AgNPs – suspensão de nanopartículas de prata, onde são encontradas as proteínas que efetivamente se ligaram à superfície das partículas e aquelas que não se ligaram, ou seja, estão presentes em solução;
- 5) Sobrenadante – onde estão presentes as proteínas que não se ligaram às nanopartículas.

A partir dos dados obtidos, foram encontradas proteínas de massa molecular estimada na faixa de 14,0 a 103,3 kDa. Entretanto, algumas proteínas, por exemplo, as de massa molecular estimada igual a 103,3, 96,9, 86,3, 79,8, 69,3, 54,2 e 19,3 kDa foram encontradas somente nas amostras de FF e AgNPs, mas não no sobrenadante, estando possivelmente envolvidas na estabilização das partículas.

2.3.3 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A principal utilidade da espectroscopia FTIR na caracterização de nanopartículas metálicas é a detecção de espécies que interagem com a superfície das partículas (Baker *et al.*, 2004).

Os espectros obtidos estão mostrados na figura abaixo, e as sugestões de atribuição das bandas estão na Tabela 3 (Silverstein *et al.*, 2005; Barth, 2007).

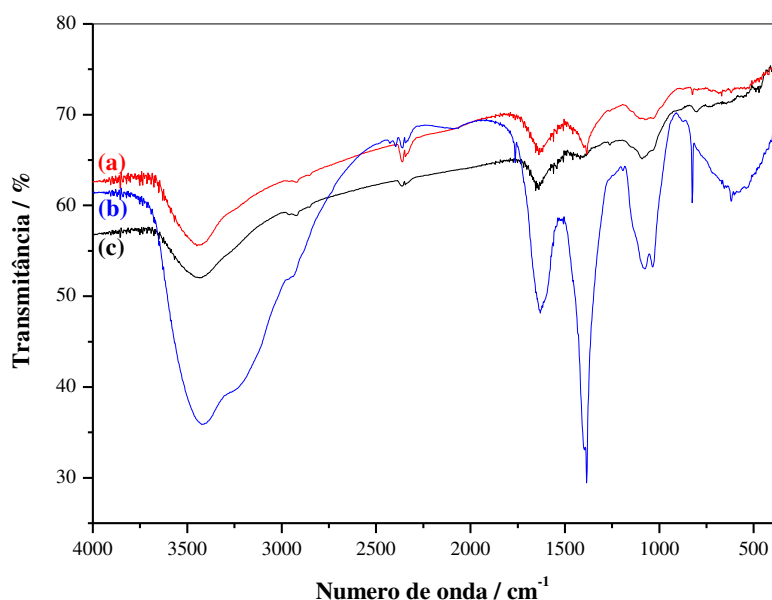


Figura 21. Espectro FTIR de: (a) AgNPs sintetizadas em 168 h de reação, (b) sobrenadante e (c) FF.

A Figura 21 mostra os espectros FTIR do FF, das AgNPs, bem como do sobrenadante. Observam-se bandas de absorção características localizadas na região de $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, referentes às vibrações N-H de amins e amidas e O-H. As bandas $2920\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas às vibrações simétricas e assimétricas dos grupos C-H, de $1620\text{ a }1650\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas aos anéis aromáticos e C(O)NH e $1380\text{ e }1030\text{ cm}^{-1}$ são associadas às vibrações C-N. A posição das bandas está próxima àquelas reportadas para proteínas em suas formas nativas (Eftink e Ghiron, 1981; Rani e Rajasekharreddy, 2011; Keating *et al.*, 1998; Gole *et al.*, 2001), em concordância com as análises por fluorescência de emissão, as quais serão mostradas mais adiante.

Tabela 3 - Atribuições das bandas obtidas pelas análises FTIR das amostras de FF, AgNPs e sobrenadante

Número de onda / cm^{-1}	Atribuição
400-500	γ S-S
620	γ C-S
750	δ H ₂ C-S-H
825	ω N-H (amina I e II)
1034	γ -C-O-C-
1074	γ C-N (amina I, II e III)
1230	
1259	ω e τ C-H
1306	
1384	γ C-N (amidas I)
1403	
1458	δ_s C-H
1641	δ C=O (amida II)
1760	R-COO ⁻ (α aminoácidos)
2363	δ_{as} e τ_{as} N-H (aminas)
2393	
2426	γ_s e τ_{as} C-H
2920	
3432	γ_s e τ_{as} N-H (amidas e aminas I e II)

* δ vibrações tipo *bending*; γ estiramentos; ω vibrações tipo *wagging*; τ vibrações tipo *twisting*

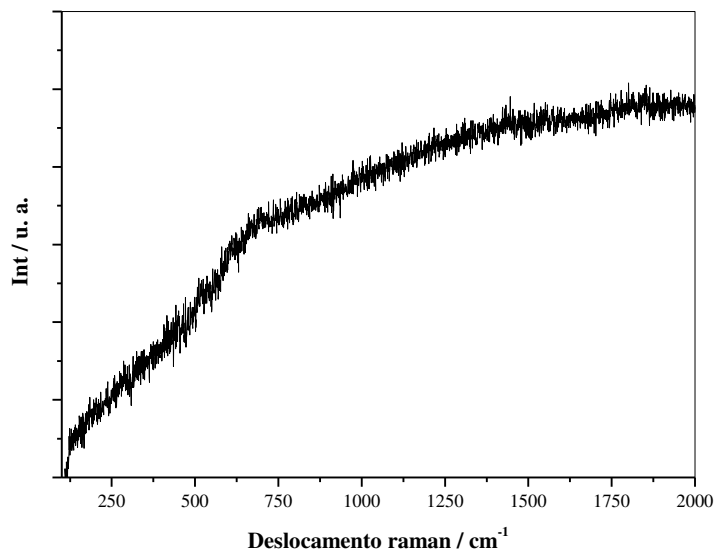
Mudanças sutis na banda em 3400-3500 cm^{-1} podem ser explicadas da seguinte maneira: no filtrado fúngico, as ligações de hidrogênio podiam ocorrer entre as amidas. Com a adsorção das proteínas à superfície das nanopartículas, os grupos amida tendem a se ligar aos átomos de Ag, quebrando assim a maioria das ligações de hidrogênio entre os grupos N-H (Silverstein *et al.*, 2005). Os resultados de FTIR corroboram com os obtidos por diferentes grupos de pesquisa (Gole *et al.*, 2001; Mandal *et al.*, 2005), que

reportam a possibilidade das proteínas se ligarem às nanopartículas tanto através dos grupos amino livres, quanto pelos resíduos de cisteína das proteínas, ou ainda pela interação eletrostática de grupos carboxilatos carregados negativamente (Ingle *et al.*, 2009). Além disso, o leve deslocamento das bandas H₂C-S-H e C-N confirmam estas possibilidades.

2.3.4 Espectroscopia Raman

Os espectros obtidos por Raman, registrados de 100 à 2000 cm⁻¹ (região do espectro a qual contem informações fundamentais vibracionais sobre proteínas e peptídeos (Thomas, 1999)), são mostrados nas Figuras 22 a 25. Dentre os vários substratos nanoestruturados válidos para medidas SERS, encontra-se a prata, pois, além de possuir intensa ressonância *plasmon*, é estável e de fácil preparação (Sanchez-Cortes *et al.*, 1994, Sanchez-Cortes *et al.*, 1995).

(a)



(b)

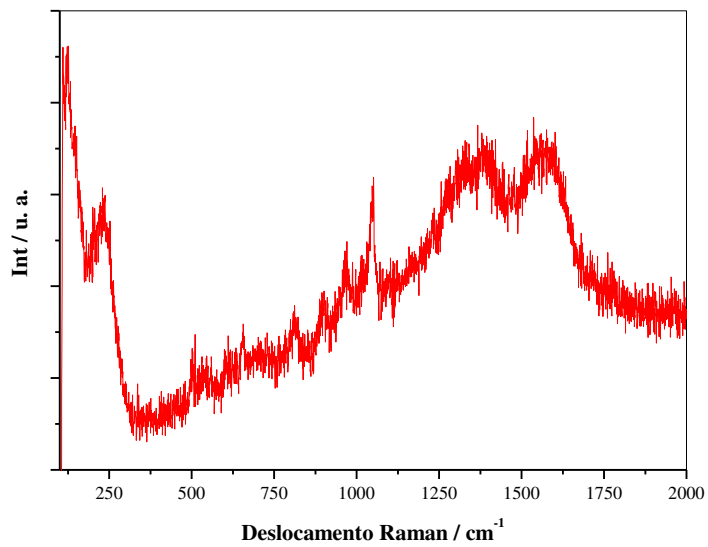
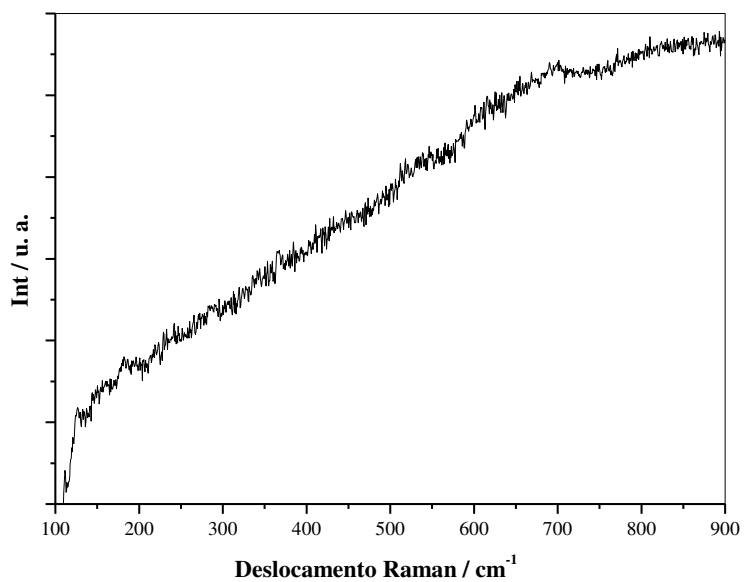


Figura 22. (a) Espectro Raman do FF e (b) espectro SERS das AgNPs após 168 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser verde – 514 nm, de 100 a 2000 cm⁻¹.

(a)



(b)

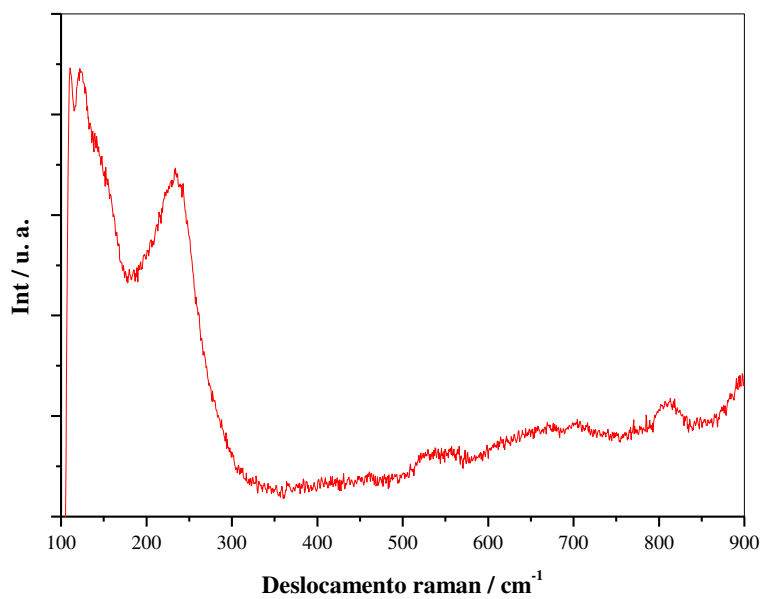
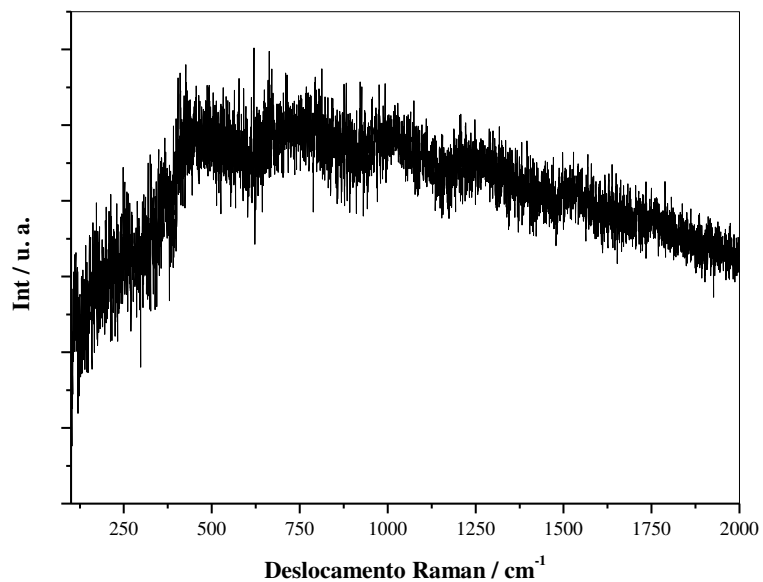


Figura 23. (a) Espectro Raman do FF e (b) espectro SERS das AgNPs após 168 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser verde – 514 nm, de 100 a 900 cm⁻¹.

(a)



(b)

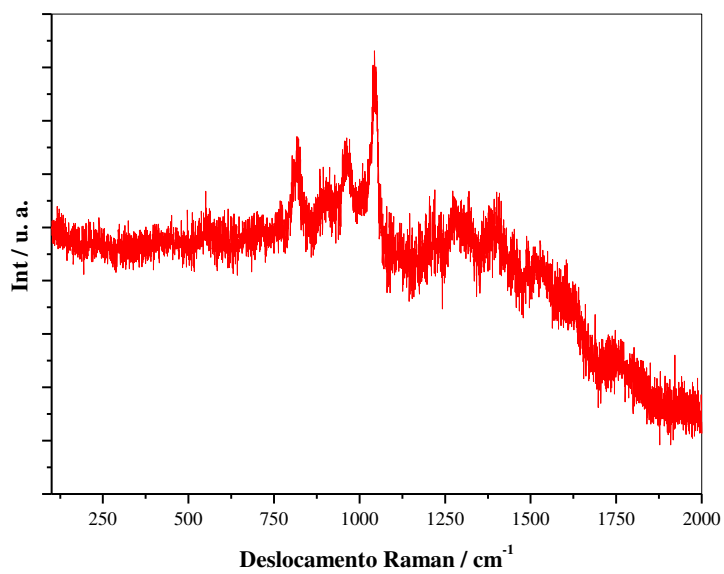
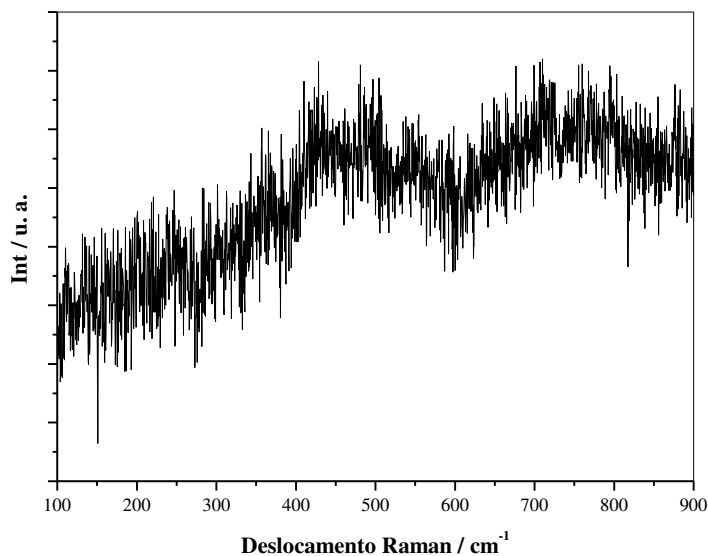


Figura 24. (a) Espectro Raman do FF e (b) espectro SERS das AgNPs após 168 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser vermelho – 633 nm, de 100 a 2000 cm⁻¹.

(a)



(b)

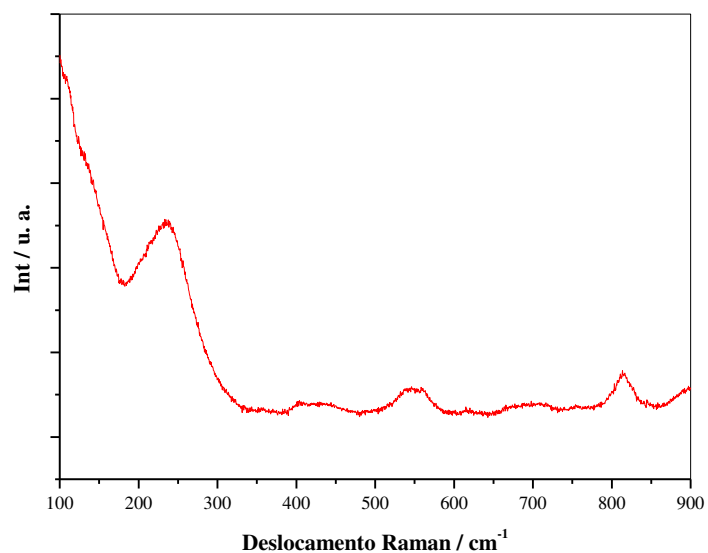


Figura 25. (a) Espectro Raman do FF e (b) espectro SERS das AgNPs após 168 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser vermelho – 633 nm, de 100 a 900 cm^{-1} .

De 200 à 1800 cm^{-1} são encontrados sinais correspondentes as amidas e as vibrações de cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos. As sugestões de atribuições para as frequências observadas estão na Tabela 4 (Dollish *et al.*, 1974; Huang *et al.*, 2009).

Tabela 4 - Atribuições das bandas obtidas pelas análises Raman das amostras de nanopartículas de prata

Número de onda / cm^{-1}	Atribuição
231 - 236	Vibrações Ag-S
243	vibrações Ag-N
438	expansão de regiões hidrocarbônicas
468	
512	deformação do esqueleto S-S
559	
540	deformação N-C-C
667	vibrações C-S (cisteínas)
761	anel indólico (triptofano)
828	dubleto de tirosina
850	
880	anel indólico (triptofano)
1003	fenilalanina (respiração do anel)
1049	γ C-N
1118	γ N-C e C-C
1231	Amida
1336	anel indólico (triptofano)
1420	CH_2 , CH_3
1553	anéis aromáticos (triptofano e fenilalanina)
2508	
2587	γ S-H
2680	

* γ estiramentos

A Figura 26 mostra os espectros SERS, com laser verde, obtidos para o acompanhamento da formação das AgNPs, registrados a cada 24 h. É interessante notar o aumento na intensidade da banda centrada em 233 cm^{-1} ,

devido às vibrações Ag-S (Joo *et al.*, 1987), sugerindo o envolvimento de resíduos de cisteína na formação das AgNPs.

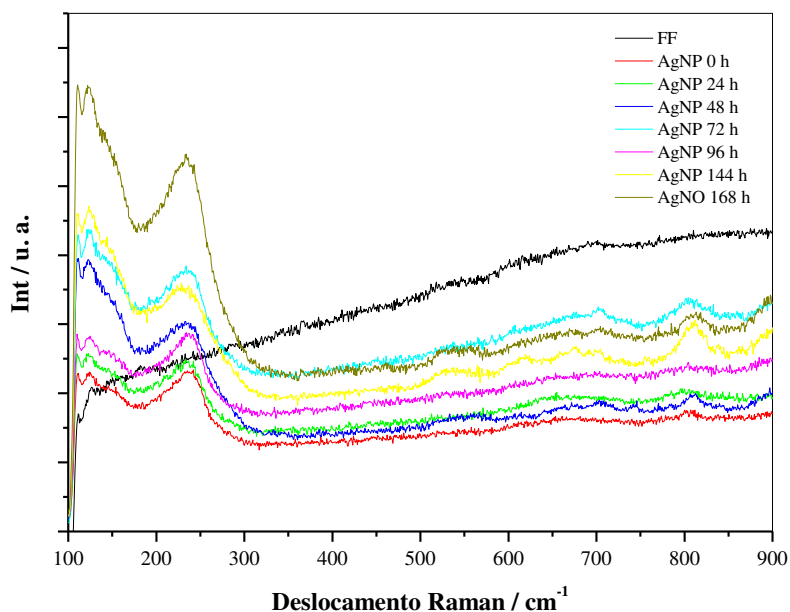


Figura 26. Espectro Raman do FF e espectros SERS das AgNPs a cada 24 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser verde – 514 nm, de 100 a 900 cm⁻¹.

Da mesma maneira, os espectros foram obtidos com o laser vermelho (Figura 27). Porém, observa-se o aumento na intensidade da banda SERS em 240 cm⁻¹, referente às vibrações Ag-N (Chowdhury e Ghosh, 2004), sugerindo então o envolvimento das aminas livres ou amidas com a superfície das nanopartículas de prata.

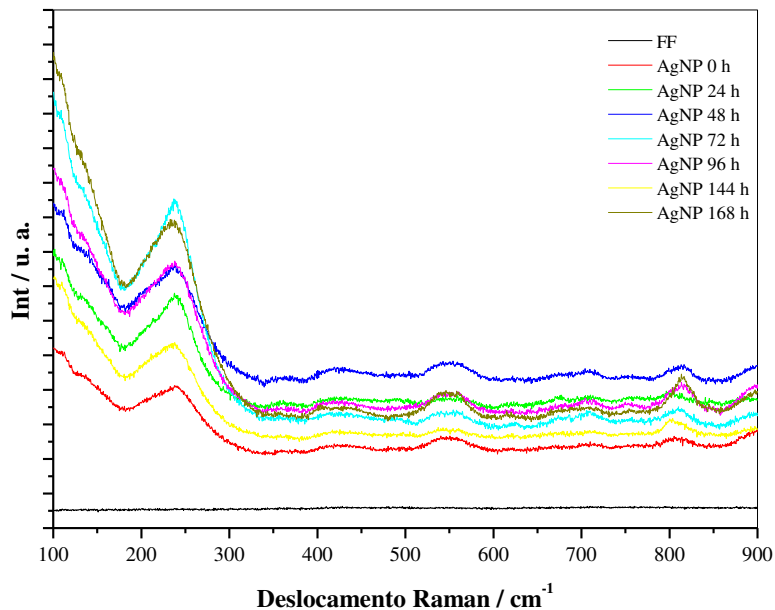


Figura 27. Espectro Raman do FF e espectros SERS das AgNPs a cada 24 h de reação; amostras secas a vácuo. Laser vermelho – 633 nm, de 100 a 900 cm^{-1} .

É importante citar que para as atribuições sugeridas, foram considerados os dois lasers disponíveis para trabalho, o laser verde, em 514 nm, e o laser vermelho, em 633 nm. Em concordância com os resultados do FTIR, os espectros Raman também forneceram informações sobre a possibilidade de ligação das proteínas à superfície das nanopartículas ou pelos grupos amino livres, ou pelos resíduos de cisteína das proteínas (Ingle *et al.*, 2009).

2.3.5 Fluorescência

Nas análises por fluorescência, os espectros de emissão obtidos para o filtrado fúngico e para as nanopartículas de prata, respectivamente, estão na Figura 28. Com comprimento de onda de excitação igual a 280 nm, a amostra

de filtrado fúngico apresentou um máximo de emissão em 370 nm, que aparece como resultado da emissão dos resíduos de aminoácidos aromáticos das proteínas (triptofano, tirosina e fenilalanina), sendo que a fluorescência do triptofano (W) é sensível ao ambiente, sugerindo que, neste caso, estes estão expostos ao solvente. Além disso, a natureza destas bandas indica que as proteínas ligadas à superfície das nanopartículas e àquelas existentes em solução estão em suas formas nativas (McDonald e Smith, 1996; Ahmad *et al.*, 2003).

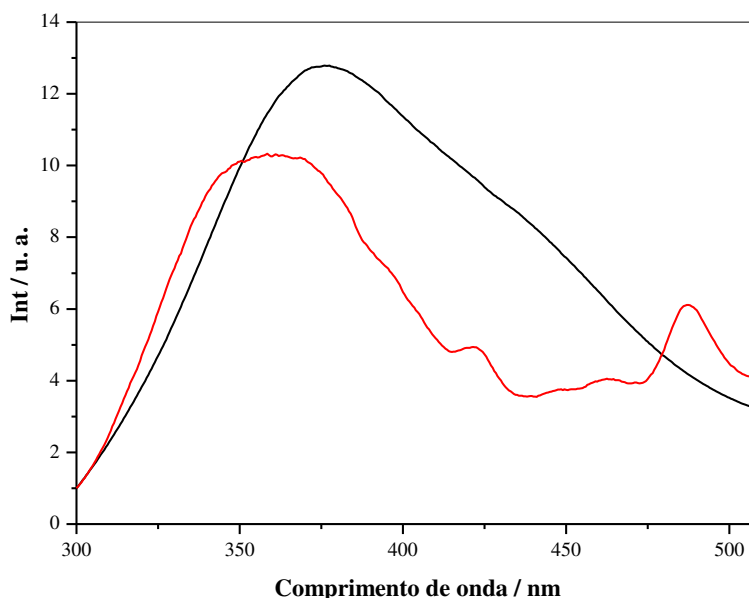


Figura 28. Espectro de emissão de fluorescência do (---) FF e (---) AgNPs. $\lambda_{exc} = 280$ nm

Já a suspensão das nanopartículas de prata apresentou um máximo de emissão em 361 nm, ligeiramente deslocado quando na amostra de filtrado fúngico, e dois outros picos em 422 e em 489 nm. Este deslocamento, de 9 nm, pode indicar que os resíduos dos aminoácidos aromáticos estão em uma região mais hidrofóbica, provavelmente envolvidos em interações

supramoleculares com outras proteínas (Lacowicz, 2006). Adicionalmente, observa-se uma diminuição na intensidade da fluorescência (*quenching*) dos resíduos de aminoácidos (banda ao redor de 350 nm), de 12,77 (filtrado fúngico) para 10,27 (AgNPs). Este fenômeno pode ocorrer como consequências de variadas interações moleculares, incluindo reações de estado-excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexos e ainda *quenching* colisional (Ahmad *et al.*, 2003), sendo então que, no caso deste trabalho, este fenômeno possa estar provavelmente relacionado à interação das proteínas com a superfície das nanopartículas. A fluorescência das nanopartículas de prata está relacionada com a presença de pequenos *clusters* envolvendo alguns átomos de prata, que se adsorvem na superfície das nanopartículas (Maali *et al.*, 2003). Além disso, a formação de óxido de prata também contribui para a emissão de fluorescência, a qual não é observada para sistemas livres de oxigênio. Sendo assim, como as nanopartículas foram preparadas ao ar livre (e não sob atmosfera inerte), pode ter ocorrido a oxidação parcial da prata metálica para íons prata, formando estas espécies carregadas na superfície, dando origem à emissão em ~420 e ~490 nm (Angelescu *et al.*, 2010; Maali *et al.*, 2003). Além disso, pode ocorrer a formação de *clusters* de óxido do metal, os quais também podem contribuir para a fluorescência (Payser *et al.*, 2001).

2.3.6 Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de CD é frequentemente realizada no ultravioleta longínquo (185 a 260 nm) para caracterizar a estrutura secundária de proteínas em solução e também, como no caso deste trabalho, permitiu avaliar as

alterações conformacionais que ocorreram nas proteínas quando ligadas à superfície das nanopartículas, comparativamente com as proteínas em solução.

A Figura 29 ilustra os espectros de CD das proteínas do filtrado fúngico e daquelas na presença das AgNPs. Na amostra de AgNPs são verificadas alterações na estrutura secundária das proteínas, comparativamente às proteínas no filtrado fúngico. O espectro de CD do FF mostra um mínimo em 208 nm ($[\Theta] = -4,62 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) e um máximo em 190 nm ($[\Theta] = 0,30 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), característico de cadeias polipeptídicas compostas por uma combinação de estruturas em hélice- α e em folhas β . Já o espectro das AgNPs apresenta um mínimo em 204 nm ($[\Theta] = -3,00 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$).

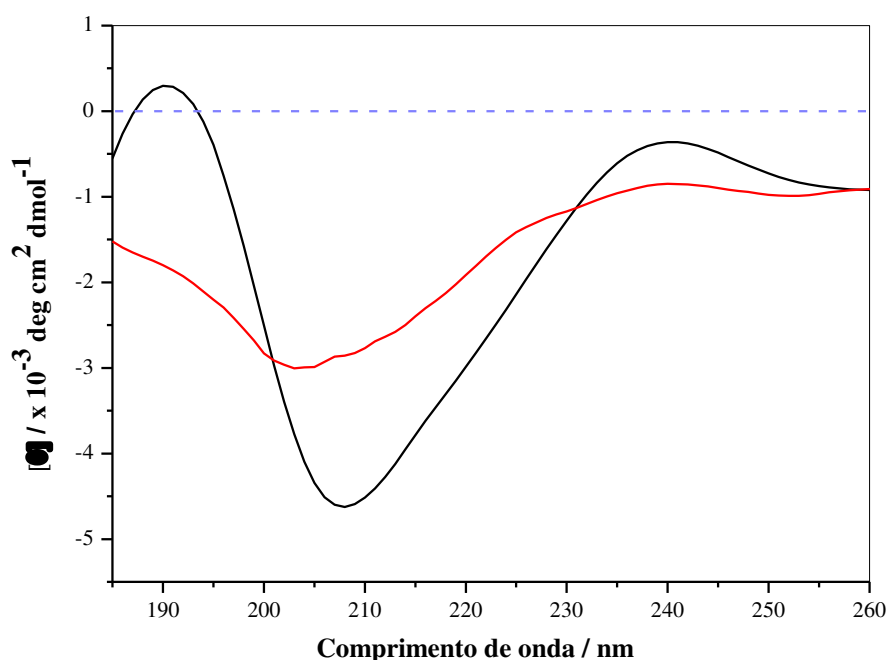


Figura 29. Espectro de Dicroísmo Circular do (---) FF $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (---) AgNPs $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Os dados foram tratados no programa *CDNN CD Spectra Deconvolution*, o qual fornece o conteúdo percentual de cada estrutura, conforme está na Tabela 7.

Tabela 5 - Porcentagens de estrutura secundária obtidas pelo programa *CD Spectra Deconvolution* para as amostras de FF e AgNPs

	FF / %	AgNPs / %
hélice α	17	12
folha β (paralela, antiparalela e β-turn)	56	56
<i>random coil</i>	27	32

A associação proteína-nanopartícula pode ser um processo controlado por fatores entrópicos, com liberação de um grande número de moléculas de água e/ou contra-íons. A liberação de moléculas de água (provenientes da desidratação de partes da molécula de proteína, da nanopartícula, ou de ambas) é frequentemente o fator de ligação mais importante entre proteínas e a superfície das partículas, e assim, durante o processo de formação dos bionanoconjugados, ocorreriam alterações mínimas na conformação da proteína concomitantemente com o aumento da entropia do sistema, tal como proposto por Dawson *et al.* (2007), para o caso de AuNP.

No caso deste trabalho, as proteínas no FF mostram majoritariamente uma conformação em folhas β e *random coil*. Após a associação, uma diminuição do conteúdo em hélice α (de 17% no FF para 12%) e um aumento do conteúdo em *random coil* (de 27% para 32%), indicam perda de estrutura secundária da proteína, leve ou drástica, dependendo da porcentagem de perda estrutural, tal como reportado na literatura (Gomes, 2009; Sharma *et al.*, 2013; Shang *et al.*, 2007; Sirivastava *et al.*, 2005).

2.3.7 Espectrometria de Massas (MS)

As proteínas, digeridas com tripsina, foram então analisadas por espectrometria de massas e identificadas por buscas no programa MASCOT.

Os cromatogramas LC-MS para as amostras de filtrado fúngico e nanopartículas de prata estão mostrados nas Figuras 30 e 31. Nos cromatogramas, os peptídeos referentes aos três sinais mais intensos foram selecionados para posterior fragmentação, resultando em espectros que permitem associar uma sequência de aminoácidos a um padrão de fragmentação, como exemplificado para os peptídeos **VTDLALYDIR** e **YFPTQALNFAFR** também na Figuras 30 e 31.

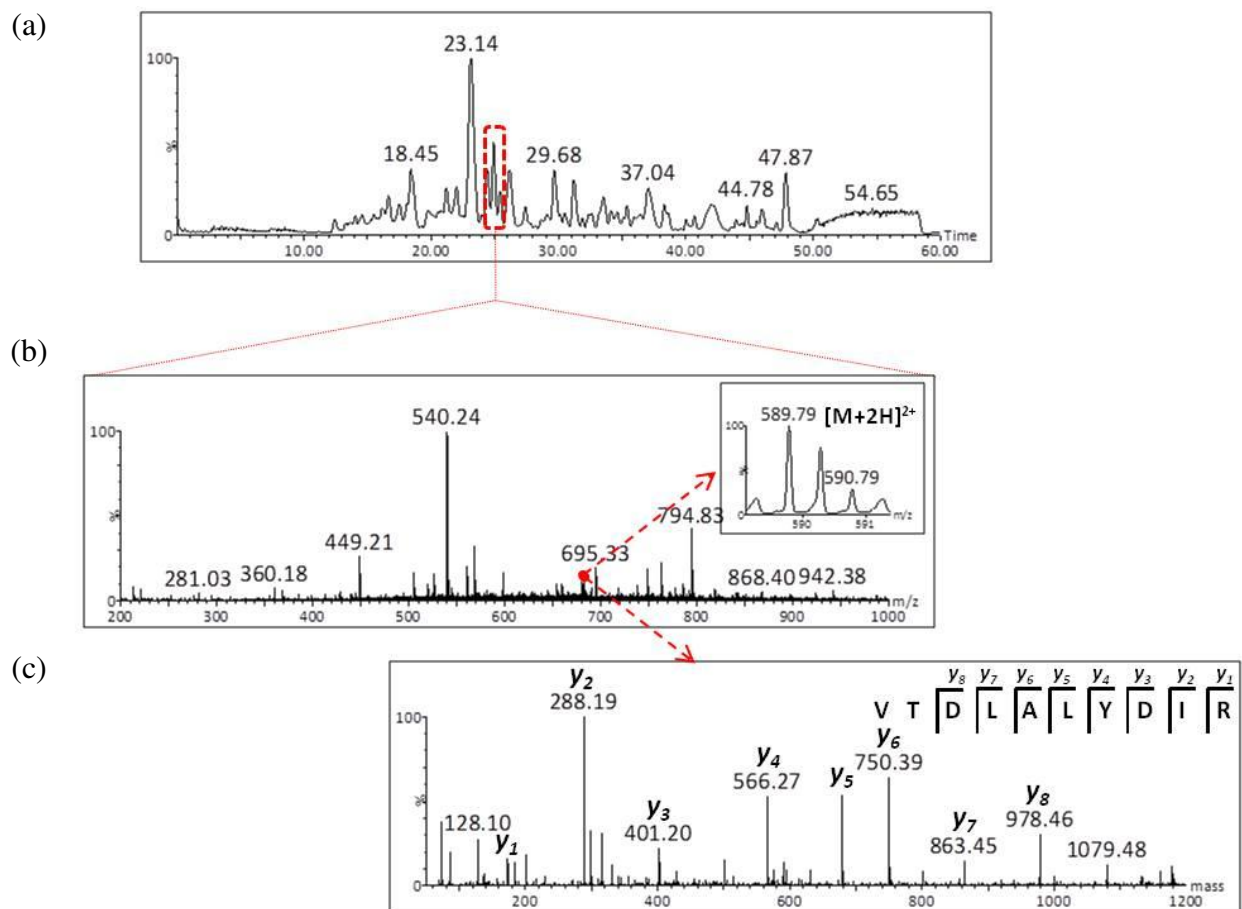


Figura 30. (a) Cromatograma (LC-MS) obtido para amostra de filtrado fúngico e (b) e (c) exemplo de espectro de fragmentação do peptídeo **VTDLALYDIR** identificado em uma proteína desidrogenase nas análises por *shotgun*.

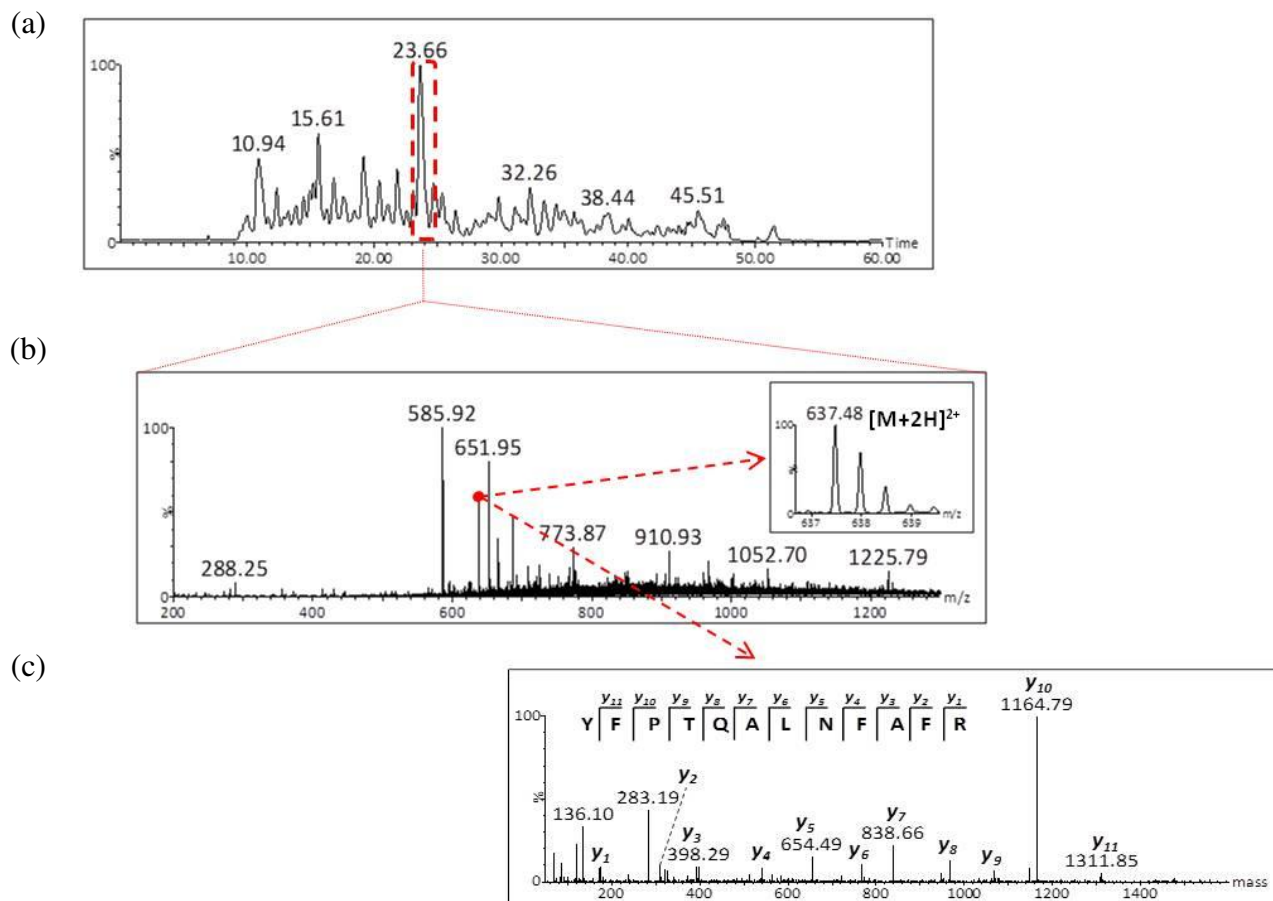
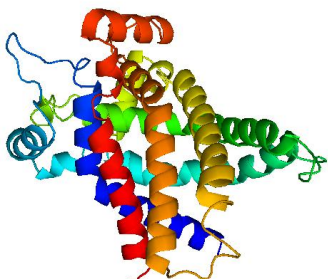
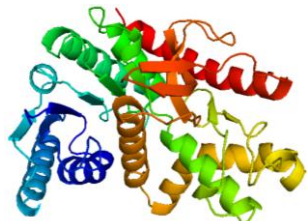


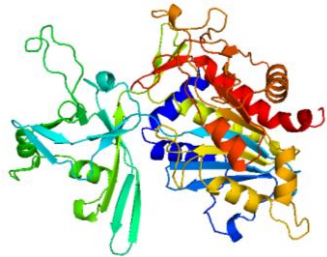
Figura 31. (a) Cromatograma (LC-MS) obtido para amostra de filtrado fúngico e (b) e (c) exemplo de espectro de fragmentação do peptídeo **YFPTQALNFAFR** identificado em uma proteína carreadora mitocondrial nas análises por *shotgun*.

Os dados obtidos e interpretados estão na Tabela 6. Os valores de *score* obtidos fornecem uma avaliação da significância do resultado, sendo que para o filtrado fúngico este valor deve ser maior ou igual a 52 e para as AgNPs este valor deve ser maior ou igual a 53, possuindo estatística confiável para a identificação das proteínas tendo uma probabilidade $\leq 5\%$ de serem falsos positivos ou eventos aleatórios.

Tabela 6 - Proteínas identificadas pelas análises de *shotgun* para o filtrado fúngico e nanopartículas de prata, pI teóricos, massas nominais, *score* da identificação, peptídeos identificados, % de cobertura na identificação, família de proteínas e espécie com maior homologia. Estruturas das proteínas obtidas pelo programa Phyre2 (*Protein Fold Recognition Server*)

Filtrado Fúngico						
Proteína identificada	pI	Massa / kDa	<i>score</i>	Peptídeos identificados	% cobertura	Função / Espécie com maior homologia
<p>predicted protein</p> 	6,50	28,3	110	<p>1 MKFLSTLAGA LAFTTTSASA IAHRNTERTC ITPGAIPDLK GSDIRNVGVV 51 LFQALDMIDV FGPLDPLQLV SLSVQQLNLH LIAETLDPVS TAPVAMNKFN 101 SSFWPTIPPT KTFADDLDDLD LLIVPGGPGA RNPNLGAVTD YIAKMAPKVK 151 ILMTICTGSG IAARAGVLDG HLAATNKNAW ATMKAMGPKV NWVSPARFVI 201 DGKIWSSSGV TSGLDLIFAF IETFWGAQQS QRIASIIIEHV PRAATDDPFS 251 QHFNITPTEA QPCPKA</p>	6	<p>Glutamina amidotransferase <i>/ Fusarium oxysporum</i></p>
<p>Malato desidrogenase</p> 	6,25	35,4	92	<p>1 MAKAPMRVAV TGAAGQIGYA LLFRIAAGEM LGKDQPVLQ LLEIPDEKAQ 51 KALKGVMMEI EDCAFPLLAG MEAHADPMTA FKDVDVALLV GARPRGPGME 101 RKDLLSANAQ IFTAQ GKALN AVASRNVKVL VVGNPANTNA YIAMKSAPDL 151 PRENFTAMLR LDHNRALSQI AAKTGKPVSS IEKLFVWGNH SPTMYADYRY 201 ATIDGQSVKD MINDPVWNNND VFLPTVGKRG AAIIEARGLS SAASAANAAI 251 DHVRDWVLGS NGKIVTMGIP SNGDYEIPQD VMFGFPVTTA NGKYEVVKGK 301 EVDAYSREKI NITLKELEEE RAGVQHLLG</p>	5	<p>Malato desidrogenase <i>/ Rastonia solanacearum</i></p>

hypothetical protein FG06655.1



5,37 53,9 89

1 MAPPQEALDF VDFVNASPTP YHAVQSASAR FEKAGFKLIR
ERDSWASTLR
51 PGGKYYLTRN ASTIVAFTIG RKWRPGNPVA IVGAHTDSPC
LRLKPVSKKT
101 NVGFLQIGVE TYGGGIWTSW FDRDLSIAGR VLVKEGDNFV
QKLVKVDKPL
151 VRIPTLAIHL HRQTNFDPNK ETELFPIAGL VAAELNKDVK
EKSEKKDDG
201 EEDEEFKPLK VITERHHPQV LDVIAAEAGV EVSDIVDFEL
VLYDTQKSCI
251 GGLADEFIFS PRLDNLGMTY CSVEGLIESV KNESSLEEDG
TIRLTVCFDH
301 EEIGSTSAQG ANSNLLPSVI RRLSVLPGNR DASSEGSYEA
VHHEGEDATA
351 YEQTLRSFSL VSADMAHSVH PNYAGKYESS
HQPAMNGGTV VKINANQRYA
401 TNSPGIVLIE ECARTAGVPL QLFVVRNDSP CGSTIGPGLA
AALGMRTLDL
451 GNPQLSMHSI RETGGTADVG YGIRLFREFF EKYGSLEPKI
LID

5

Zinco peptidase
/ Fusarium
oxysporum

hypothetical protein FG02461.1

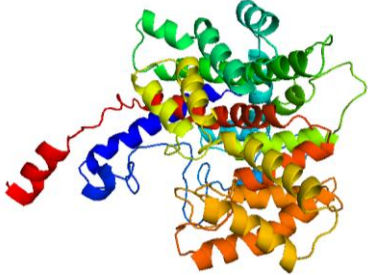
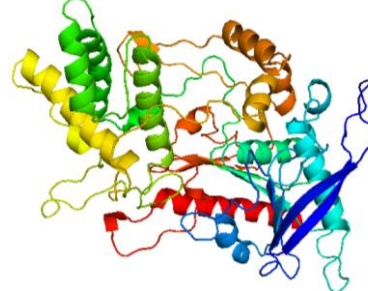


9,01 35,2 75

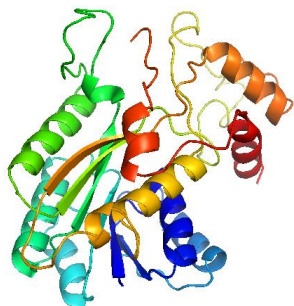
1 MFAASRIQRR AFSATARDLS KVTVLGAAGG IGQPLSLLLK
MNPRVTDLAL
51 YDIRGGPGVA ADISHVNTKS SVKGYEPNAA GLKEALSGAE
VVLIPAGVPR
101 KPGMTRDDL NNASIVRDL AKAAAEAAPK AKLLIISNPV
NSTVPIVKEV
151 YKAAGVYNPK TLFGVTTLDV VRASRFVSEI KGTPKDENI
TVVGGHSGVT
201 IVPLFSQSNH PDLSSNAELV KRVQFGGDEV VKAKDGAGSA
TLSMAMAGAR
251 MADSVLRAVQ GEKGVKEPAF VESPLYKDQG IEFFSSQVEL
GPEGVEKIHP
301 LGKLDANEEK LVDAALVDLK KNIKGVAFV ASNPPK

6

Desidrogenase
/ Fusarium
graminearum e
Fusarium
oxysporum

<p>hypothetical protein FG00175.1</p>		8,24	52,0	74	<p>1 MALNLTTSRR ALSSLKPLTR AAFVGARGYA TAEPDLKATL REAIKAKREL 51 LKKVKAHSNK VLGEVKVENT LGGMRGLKAM VWEGSVLDAN EGIRFHGRTI 101 KDCQKELPKG KTGTEMLPEA MFWLLLTGQV PSVNQVRGFS RELAEKAQIP 151 EFVSKMLNDF PKDLHPMTQF AMAVSALNYE SKFAKAYEQG INKADYWEPT 201 FDDCISLLAK LPTIAAKIYQ NAYRGGGALP AEVDLEQDWS YNFAAMLGKG 251 GKENENFQDL LRLYLALHGD HEGGNVSAHA THLVGSALS PFLSYSAGLQ 301 GLAGPLHGLA AQEVLRWIIQ MKEAIPSNYT EQDVNDYLWS TLNSGRVVPG 351 YGHAVLRKPD PRFEALMDYA AARPEIANDP VFQVVEKNSR IAPEVLKKHG 401 KTKNPYPNVD SSSGVLFHHY GFHETLYYTA TFGVSRGLGP LAQLIWDRAL 451 GLPIERP KSI NLEGILKQVE GQ</p>	4	<p>Citrato sintase / <i>Fusarium oxysporum</i></p>
<p>hypothetical protein FG02204.1</p>		5,16	59,6	69	<p>1 MARGWVFNCA AVLLALTAGV DAYTVPALSA RAKDSGPKAV NISVPVDHFH 51 NETIYEPHSD KKFPLRYWFD AQYYRKGGPV IILASGETSG EDRIPFLEHG 101 ILQMLANATG GIGVILEHRY YGTSFPVPDL KPENMRFLST EQALADTAYF 151 AQHVEFP GME EHNLTASTTP YIIYGGSYAG AFAAFARKIY PDLFWGGISS 201 SGVTEAIVDY WQYFEAARLF APGDCAKVTQ KLTHAVDNIL LGDDKEEKKQ 251 LKIAFGLLGL RDDDFAMTIS QGIGGLQSNW WDPASDSSSF GLYCGSVSSD 301 DILFASTRPL APYVKKWLIS AGYKKQLKYM TNRFLNYIGY IRSNVESDKS 351 GRCDGKTL DQ CYSIRGSMND TKLDPNNMSR QWTYQTCTQW GYWQTGSGAP 401 KDQLPMVSRL IDVEYNTIPC REEFNITTP NVESINKLGG FNFSYPRVAF 451 IDGEYDPWRA ATPHAIGLPE RESTASEPFI LIPYGVHHWD ENGLAPGSEE 501 IGLPPPAVKQ AQQDIIDFTK AWLEDWEKEK GGATADL</p>	2	<p>Serina carboxipeptidase / <i>Fusarium graminearum</i></p>

**hypothetical protein
LOC100191904**



6,23

35,7

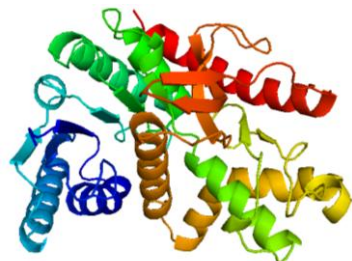
67

1 MSSPHFSKVL VFGATGEVGS AVALEAHALG AHVSIALRDT
TKTNEWISPS
51 QERAADLQRI SADLTPDSL KRAVHDTGAQ AAFIYAVRSK
DALRGAI AAL
101 RDAGIQYVVF LSTSQVRTAG TTKGDIRSIK PDHFIPWQHA
QVEIALEELE
151 VPHAAVR**AGF FASNPLRI**YL DRSSEPKQVN LLAPEVPHDP
IDPKDIGR**AA**
201 **AAVLVNPRL**Y ASGYQGEPKK DVVYLSGPAL LSQTEQWEII
NRELVVAGKP
251 EVKVN HITVE QYLENLAKLH VPDVVAKSLA
KSMVETRALY APEDYEKSR**G**
301 **NVELLTGR**KA TSFDEFVKRE IPRYFD

8

Desidrogenase
*/ Fusarium
fujikuroi*

malate dehydrogenase



6,25

35,4

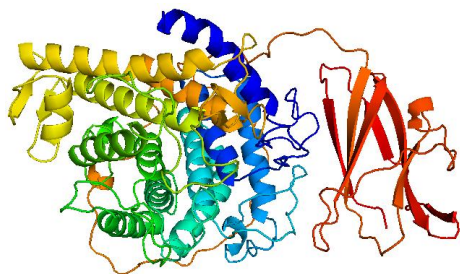
85

1 MAKAPMRVAV TGAAGQIGYA LLFRIAAGEM LGKDQPVLQ
LLEIPDEKAQ
51 KALKGVMMEI EDCAFPLLAG MEAHADPMTA
FKDVDVALLV GARPRGPGME
101 RKDLLSANAQ IFTAQ GKALN AVASRNVKVL
VVGNPANTNA YIAMKSAPDL
151 PRE**NFTAMLR** LDHNRALSQI AAKTGKPVSS IEKLFVWGNH
SPTMYADYRY
201 ATIDGQSVKD MINDPVWNND VFLPTVGKRG AAIEAR**GLS**
SAASAANAAI
251 **DHVR**DWVLGS NGKIVTMGIP SNGDYEIPQD VMFGFPVTTA
NGKYEVVKG F
301 EVDAYSREKI NITLKELEEE RAGVQHLLG

7

**Malato
desidrogenase /**
*Fusarium
moliniiforme e
Fusarium
verticillioides*

putative glucoamylase GMY1



5,56 68,7 84

1 MYFVSSAFLL GSFVLQNVLG RPTFDERSLL QERQSSVDSF
IKSESSIAIE
51 QLLCNIGSDG CNSKNVATGI VIASPDTQDP DYFYTWTRDA
ALVFKYVVDR
101 **FINQYDAGLQ** RKIQEYIASQ AKLQGVSNPS GSLSDGSGLG
EAKFNVDMSA
151 FTGGWGRPQR DGPALRATAM ITYANWLIAN GYTSTANDIV
WPVVRNDLNY
201 VAQYWNQTGF DLWEEVKGSS FFTTGSQYRG
AALAKKLGKS GDNYSNIAPQ
251 ALCFLQTYWI SSGKYVDSNI NVNDGRTGKD ANSILSSIHN
FDPALNCDPA
301 TFQPCSDKAL ANHKAVTDSF RSWNINKGIS QGSAVAVGRY
VEDVYYNGNP
351 WYLATLAAAE QLYDAIYVWK QQGSITVSDV SLSFFKDLVS
SVSTGTYASD
401 SATFKSITDA VSKYADGYVA IVAKYVGTGD HLAEQFDKND
GHPLSATDLT
451 WSYAAFLSAA DRRAGVIPPS WAGSVAAVPN
QCGTNTVAGS YSSATATSPF
501 ASQTPKGGVP TPTGTQTSTS TSTSTSSSST GTSCPTATSV
AVTFQEVVTT
551 NFGDTIKIVG NIAALGNWDT SKAVALSASD YTASNPVWKA
TISLTAGQSI
601 QYKYINVKGD GSLTWEKDPN RTYAVPKTCA
TTATKSDKWQ S

1

Glicoamilase /
Fusarium
verticillioides e
Fusarium
graminearum

**hypothetical protein
LOC100191904**



6,23 35,7 69

1 MSSPHFSKVL VFGATGEVGS AVALEAHALG AHVSIALRDT
TKTNEWISPS
51 QERAADLQRI SADLTDPSL KRAVHDTGAQ AAFIYAVRSK
DALRGAI AAL
101 RDAGIQYVVV LSTSQVRTAG TTKGDIRSIK PDHFIPWQHA
QVEIALEELE
151 VPAAVR**AGF FASNPLRI**YL DRSSPEPKQVN LLAPEVPHDP
IDPKDIGRAA
201 **AAVLVNPRLY** ASGYQGEPKK DVVYLSGPAL LSQTEQWEII
NRELVVAGKP
251 EVKVNHITVE QYLENLAKLH VPDVVAKSLA
KSMVETRALY APEDYEKSRG
301 **NVELLTGR**KA TSFDEFVKRE IPRYFD

8

Redutase /
Botryotinia
fuckeliana

**NADP-specific glutamate
dehydrogenase**



5,75

48,8

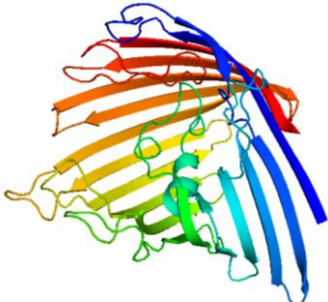
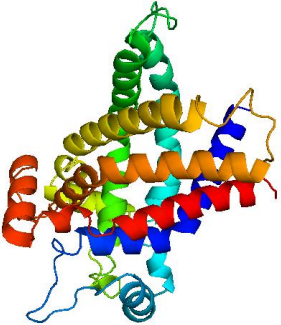
62

1 MSHLPQEPEF EQAYGELASA LENSSEFNEH PEYR**TALAVA**
AIPERVIQFR
51 VVWDDKGNL QVNRGYRVQF NGALGPYKGG
 LRFHPSVNLS ILKFLGFQEI
101 FKNALTGLNM GGGKGGADFD PKGKSDAEIR
 RFCQAFMTEL SKHIGAETDV
151 PAGDIGVGGR **EIGYLF**GAYR KFANRWEGVL
 TGKGLSWGGS LIRPEATGYG
201 LVYYVEYMLK HANRGTFEKG RVALSGSGNV
 AQYAALKIIE LGGSVVSLSD
251 SKGALVAKEG SSFTPEQIHN IAALKIKHQA LTTFEHDGQF
 TWIEGARPWV
301 HVGKVDIALP SATQNEVSKE EAQALVDAGA FIVAEGSNMG
 CTAEAIDVFE
351 AHRKEKGAEA LWYAPGKASN CGGVAVSGLE
 MAQNSQRIQW TEKEVDDRLK
401 AIMKDAFVAG LETAQKYVEA KEGELPSLIA GSNIAGFIKV
 AEAMHDQGDW
451 F

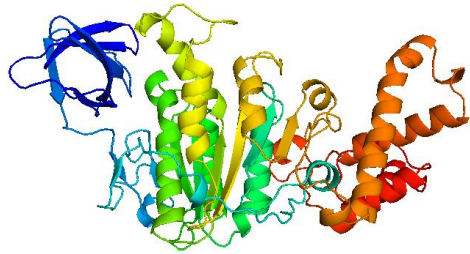
4

**Glutamato
desidrogenase /
*Fusarium
graminearum* e
*Fusarium
oxysporum***

AgNPs

Proteína identificada	pI	Massa / kDa	score	Peptídeos identificados (em destaque)	% cobertura	Função / Espécie com maior homologia
<p>porin Gram-negative type</p> 	9,42	39,3	152	<p>1 MKMKLFAAAV AALAAGGAYA QSSVTLYGVV DAGLTYANKV PNGNGGGSSR 51 VGLDSGGLSG SRWGLRGVED LGGGLKGIFN LESGFTIDDG KSAQGGRLFG 101 RNAYVGLQGQ WGQLTLGRQQ NLLYDFSLIY DPMALASRYG LANQDAFFSG 151 RADNAVKYIG TFGGLSVSAL YSFNRDGNEQ PGLPKLGREW SLGANYAGGP 201 FSVGAVYDQS NQTTIATADN KEQRATIAGT YAFGPAKLYA GYRWYHANFA 251 TVAGNGNLRN NLYWLGAGYQ ATPALTLTGT AYYQQFKNSN AGNPSWLFVVG 301 TDYALSKRTD AYFNLAYAKN SSGSGLGVLN LNKTDSYAGT TLGSTNFGNQ 351 NVYSSPAAGN ANQFGATVGI RHKF</p>	16	<p>Porina / <i>Rastonia pickettii</i> e <i>Rastonia solanacearum</i></p>
<p>predicted protein</p> 	9,86	33,6	113	<p>1 MSEQPQKVLG MPPFVADFLM GGVSAAVSKT AAAPIERVKL LIQNQDEMLK 51 TGRLDRKYNG IGDCFKTMA DEGVMSLWRG NTANVIRYFP TQALNFAFRD 101 KFKKMFGYKK DKDGYALWMA GNLASGGAAG ATSLLFVYSL DYARTRLAND 151 AKNAKSGGDR QFENGLVDVYK KTLASDGIAG LYRGFMPSVA GIIVYRGLYF 201 GMYDSIKPVV LTGPLANNFL ASFALGWIVT TGAGIASYPL DTIRRRMMMT 251 SGEAVKYKNT LDAARQIVAK EGVKSLFKGA GANILRGVAG AGVLSIYDQL 301 QVLLFGKAFK</p>	7	<p>Carreador mitochondrial / <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Fusarium oxysporum</i></p>

**ATP synthase beta chain,
mitochondrial precursor**



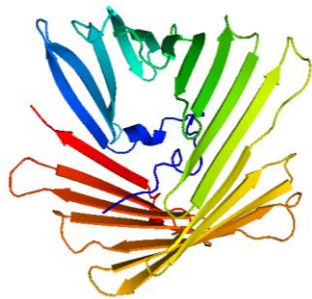
5,15 55,5 112

1 MFKSGISAF A RTARPSFAAA SRRAVRPAAL NLRAPALSRF
ASSAGVGDGK
51 IYQVIGAVVD VKFDTDKLPP ILNALETQNN GQKLVLEVSQ
HLGENVVRCI
101 AMDGTEGLVR **GAKASDTGAP ITIPVGPATL GRI**INVTGDP
IDERGPIKTD
151 KFRPIHAEAP EFVEQSTTAE ILVTGIKVV D LLAPYARGGK
IGLFGGAGVG
201 KTVFIQELIN NIAKAHGGYS VFTGVGERTR EGNDLYHEMQ
ETSVIQLDGD
251 SKVALVFGQM NEPPGARARV ALTGLTIAEY FRDEEGQDVL
LFIDNIFR**FT**
301 **QAGSEVSALL** **GR**IPSAVGYQ PTLAVDMGQM
QERITTTTKG SITSVQAVYV
351 PADDLTD PAP ATTF AHL DAT TVLSRGISEL GIYP AVDPLD
SKSRMLDPRI
401 VGQEHYETAT RVQQILQEYK SLQDI IAILG MDELSEADKL
TVERARKIQ R
451 FLSQPFTVAQ VFTGIEGKLV DLKDTIASFK AILAGEGDDL
PEGAFY M VGD
501 FASARAKGEK ILAELEGQA

6

**ATP sintase /
*Neurospora
crassa* e *Fusarium
oxysporum***

hypothetical protein FG09933.1



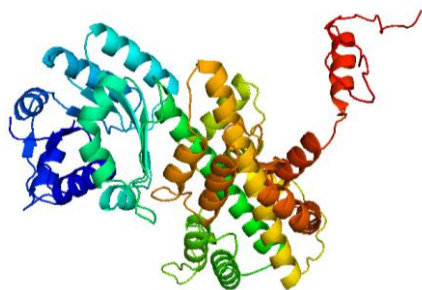
9,51 37,1 87

1 MSVPAFSDIA KPANDLLNKD FYHLSATTFE FKDTAPNGVA
FKVTGKSSHE
51 KATSAAIEGK YTDKPTGTTS PSSSSTLSQ SPSPPPPVS
NPRRKQNLPS
101 LSVSRILGPK SGWPIGFATF VRPGFAQLLM FYSRTGLTLT
QWNTANALD
151 TKIEVADSLA KGLKLEGLFN FLPATAAKGA KFNLFHKQPG
FHGRAFFDLL
201 KGPVANVDAV VGHEGFLAGA SAGYDANKAA
LTAYSAAVGY AAPQYSAAIT
251 ASDNLSVFAA SYHKVNSQV EAGAKATWNS
KTGNAVGLLEV ASKYRIDPVS
301 FTKVKINDRG **IAALAYNVLL** REGVTLGLGG SFDTQKLDQA
THKLGASFTF
351 EG

3

**Porina /
*Fusarium
graminearum* e
*Nectria
heamatococca***

**6-phosphogluconate
dehydrogenase**



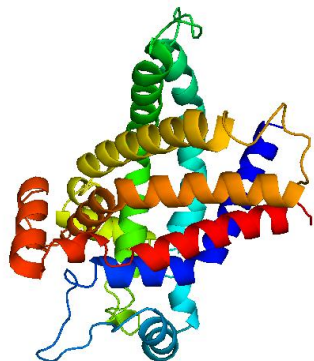
5,93 54,1 87

1 MADQAVADFG LIGLAVMGQN LILNAADHGF TVCAYNRRTS
KVDRFLENEA
51 KGKPIVGAHS VEEFCAKLKR PRRIMLLVMA GKPVDQFIES
LLPHLEKGDI
101 IIDGGNSHFP DSNRRTKYLA EKGIR**FVGS** **VSGGEEGARY**
GPSLMPGGNE
151 EAWPYIKDVF QSIKASDGE ACCDWVGDEG
AGHFVKMVHN GIEYGDMQLI
201 CEAYDILKRG LGLPAKEIAD VFAKWNGVL DSFLIEITRD
VLYFNDNDGT
251 PLVEKILDKA GQKGTGKWTA INALDLGMPV TLIGEAVFSR
CLSALKDERI
301 RASSLLDGPT PEFTGDKQAF IDDLEQALYA SKIISYAQGF
MLIQEAAREY
351 GWKLNKPSIA LMWRGGCIIR SVFLKDITNA YRKNPDLENL
LFDEFFNTAI
401 KKAQSGWRNV VSKGALWGIP TPAFSTALSF YDGYRTRDLP
ANLLQAQR**DY**
451 **FGAHTFRI**KP EHANETYPEG KDIHVNW TGR GGNVSASTYI
A

4

**Fosfogluconato
desidrogenase /
*Aspergillus niger***

predicted protein



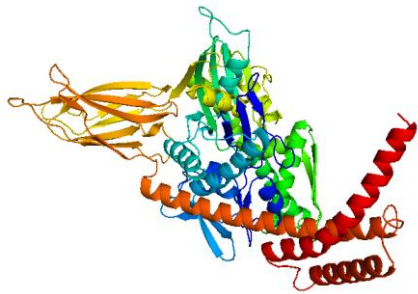
6,50 28,3 84

1 MKFLSTLAGA LAFTTTSASA IAHRNTERTC ITPGAIPDLK
GSDIRNVGVV
51 LFQALDMIDV FGPLDPLQLV SLSVQQLNLH LIAETLDPVS
TAPVAMNKFN
101 SSFWPTIPPT KTFADDLDDL LLIVPGGPGA RNPNLGAVTD
YIAKMAPKVK
151 ILMTICTGSG IAARAGVLDG HLAATNKNAW
ATMKAMGPK**VNWVSPARFVI**
201 DGKIWSSSGV TSGLDLIFAF IETFWGAQQS QR**IASIIEHV**
PRAATDDPFS
251 QHFNITPTEA QPCPKA **IASIIEHVPR**

6

**Glutamina
amidotransferase
*Fusarium
oxysporum***

hypothetical protein FG01950.1



5,00

85,9

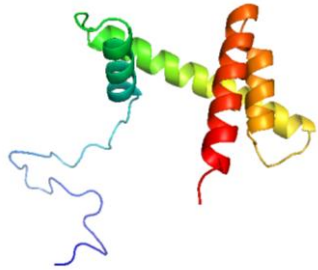
82

1 MSVVGIDFGT LKTVIAIARN **RGVDVVTNEV** **SNR**ATPSLVG
 FGPKSRYLGE
 51 AAKTQEISNL KNTVSSLKRL AGRSFNDPDI QVEQQYVTAP
 LVDVNGQVGA
 101 EVNYLGKKEH FTATQLVGMV LSKIKQTAGA
 ELKLPVQDVC MSVPPWFTDV
 151 QRR**ALIDAAE** **IAGLR**VLRLI NDGTAAALGW GITKLDLPAP
 EEPARRVCFI
 201 DIGHSSYTVS IVEFKKGELA VKATTWDKDF GGRDFDRALV
 EHLAKEFKGK
 251 YKVDIMTHGR ALARTIAAAE KTKKILSANQ QAPVNIESLM
 NDIDASAMIT
 301 RQEFTEAMIEP LLQRTHHPLE EALAQAQGTK DDIDIEVVG
 GGSRVPALKE
 351 RIQAFFGKTL SFTLNADREAL ARGSAFSCAI LSPVFRVRDF
 AVQDIISYPI
 401 EFGWEKAPDI PDEDTSLVTF NKGNVMPSTK ILTFYRKQPF
 DLEARYAQPE
 451 LLPGKTNPWI GRFSVKNVKA DGKDDFMICK LKARVNIHGV
 LNVETGYEVE
 501 EEEVEEEVNE DPDVSLPAPP MASSSPPDSV STSSASVGD
 DSRAYPVKRQ
 551 RLNDDDEDDKL LCSAAVDEN LEPSTYENRS LTYTSHKAME
 TDKDAPKKTR
 601 KVKKQVRKGD LPISTGSASL DDSTKASLLE KESAMVMEDK
 LVADTEEKKN
 651 ELEAYIYDLR AKLDEQYSEF ASDEEKETIK AKLEATEDWL
 YEDGEDTTKG
 701 VYVAKIDEIR **AMAGPIVQRH** FEKVEAERQA
 ALEKAEARA AKKAEEDARK
 751 AQDAEKATAD QEMKDADAQD AEGTADPQ

4

**Quinase, HSP70,
 actina / *Fusarium
 graminearum* e
*Fusarium
 oxysporum***

histone H2B



10,1

14,8

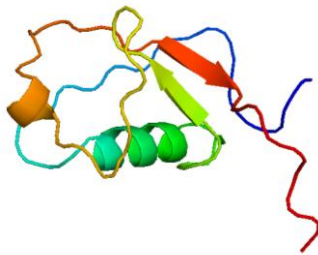
89

1 MPPKAADKKP AAKAPVASKA PEKGDAGKKT ASTGEKKKRT
KARRETYSSY
51 IYKVLKQVHP DTGISNRAMS ILNSFVNDIF ERVATEASKL
AAYNKKSTIS
101 SREIQTSVRL ILPGELAKHA VSEGTKAVTK YSSSTK

11

Histona /
Magnaporthe
oryzae

integral membrane protein



6,77

47,8

82

1 MLGTPLNCEL GEDEVVNND LRISFHRTIR VPDNDQKSFL
PPDLGAYPLK
51 PIQAYSKKMP TEMTSKGLF FPMYQSEAMW INFECRKSQH
YIIKIYVGGV
101 NAISGEAAVE DAGTKLRRQA KLARQHANVD AASSLQDYII
VPGQKWLDGI
151 AEADGSVRQF VAMPFGSGYS VESQVTGKDA AGGIQFEITP
YKPPQVASNT
201 QRSANGHQKS FSIFVKLTG KHITLSVWKE DTISMIKDMI
QVKEGIPLSQ
251 QR**LIFNGQL EDGR**TLADYG IENEFTIVLV LNLRRGGGTGP
PLEMAVAAGG
301 KIKQGIVADK LADHWQSART TVLNVQILNS AVYRTVTGED
PPTMPIDAKT
351 YARHGLPFYD LYEEQSGISG DFSMIKSIGQ IDHKEDDTAT
PKIVKIGEQA
401 TQLRVGLTNP NGPLRGFRTA SDLKKEYEGF HVVQF

2

Proteína de
membrana /
Pyrenophora
tritici-repentis e
Fusarium
graminearum

**RS15_PODAN 40S RIBOSOMAL
PROTEIN S15 (S12)**



10,07

17,5

78

1 MADEYDAEQA AELKRKRAFR KFSYR**GIDLD QLLDLSSDQL**
RDVVHARARR
 51 RINRGLKRRP MGLIKLRKA KQEAQPNEKP DLVKTHLRDM
 IVVPEMIGSV
 101 IGIYSGKEFN QVEIKPEMVG HYLAEFSISY KPVKHGRPGI
 GATHSSRFIP
 151 LK

10

Ribosomal /
Fusarium
graminearum e
Fusarium
oxysporum

hypothetical protein FG05972.1



9,10

25,9

60

1 MVAEEPQRQK DPAVSGKENS KQRRRTAEN LAPPFFALLF
 ALLAFYILFS
 51 PPSSSLSPV PVCHSTISS VSSQVIPDK NIAKMSSEQ
 TFIAIKPDGV
 101 QR**GLVGPIS RF**FENRGFKLA AIKLMTPGKE HLEKHYADLA
 GKPFAGLIE
 151 YMNSGPICAM VWEGRDAVKT GRSILGATNP LASSPGTIR**G**
DYAIDVGRNV
 201 CHGSDSVENA QKEIALWFKE GEVVSWSAQ FNWVYEKA

7

Difosfato quinase
/ Fusarium
graminearum e
Fusarium
oxysporum

As análises por experimentos do tipo *shotgun* das amostras de filtrado fúngico e nanopartículas de prata permitiram a identificação de 22 proteínas, das quais 9 já eram conhecidas para espécies de fungos e 13 foram anotadas como hipotéticas, putativas ou preditas. Estas foram identificadas por homologia através do *Basic Local Alignment Search Tool* (blast.ncbi.nlm.nih.gov) (BLAST), o qual encontra regiões de similaridade entre sequências. O programa compara nucleotídeos ou sequência de proteínas com sequências depositadas em bancos de dados e calcula a significância estatística da análise (no caso deste trabalho, $\geq 94\%$). O BLAST pode ser usado para inferir relações funcionais e evolutivas entre sequências, bem como ajudar a identificar membros das famílias dos genes. Das proteínas identificadas, 20 mostraram similaridade com proteínas sequenciadas em fungos, especialmente *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium fujikuroi* e *Neurospora crassa*. Porém, 11 também mostraram homologia com proteínas do *Fusarium oxysporum*. Além disso, algumas foram relacionadas a sequências de diferentes espécies, como por exemplo, *Rastonia solanacearum* e *Rastonia pickettii*, salientando que sequências similares entre proteínas são comuns entre organismos distantemente relacionados na escala de evolução dos seres vivos. Segundo Costa *et al.*(1999), embora pequenos trechos de determinados aminoácidos possam revelar conservação, o resultado pode ser bem diferente quando se trata da sequência completa da proteína. No presente trabalho, entretanto, a maioria das proteínas foi identificada com pelo menos duas sequências de aminoácidos, proporcionando uma maior cobertura da sequência completa, o que resultou em maior confiabilidade na identificação.

As proteínas identificadas apresentaram massa molecular de 14,8 a 85,9 kDa, em concordância com os dados obtidos pela eletroforese em gel. Além

disso, os valores de ponto isoelétrico (pI) encontrados foram de ligeiramente ácidos (5,00) a básicos (10,1), condizente com o pH do meio de cultura utilizado (extrato de malte, extrato de levedura e ágar).

Das 22 proteínas, algumas desidrogenases (por exemplo, malato desidrogenase, NADP⁺-glutamato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase e proteínas hipotéticas: FG02461.1, LOC100191904) foram identificadas como sendo enzimas redox NAD(P)H dependentes, pertencentes a uma família de proteínas específicas, a *Rossmann superfamily*. Esta superfamília inclui uma grande variedade de famílias proteicas, por exemplo, desidrogenases, oxidoredutases, sintases entre outras (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Por exemplo, duas proteínas, a glutamato e a malato desidrogenase (Figura 32), pertencem à família das desidrogenases, importantes no metabolismo do fungo.

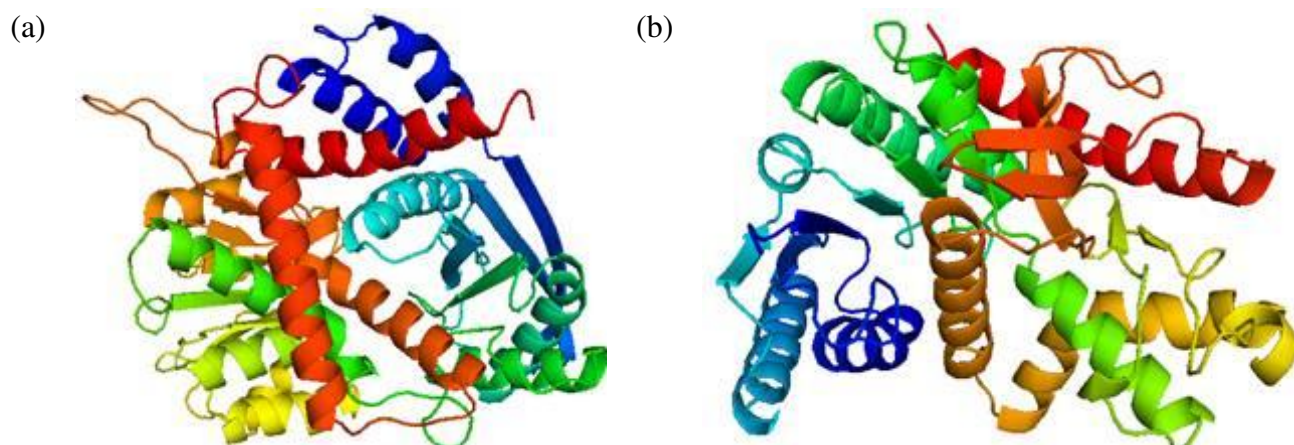


Figura 32. Representação em *cartoon* das proteínas (a) glutamato desidrogenase e (b) malato desidrogenase, identificadas no BLAST, pertencentes à família das oxidoredutases.

Porém, uma oxidoredutase, a proteína hipotética LOC100191904 (Figura 33), identificada como **oxidoredutase quinona NAD(P)H dependente**, se destaca por catalisar reações de redução de quinonas, podendo, desta maneira, estar envolvida na síntese das nanopartículas, em

concordância com o mecanismo proposto por Durán *et al.* em 2005, que demonstraram que o mecanismo de síntese das AgNPs se dá de forma extracelular devido à presença das enzimas redutase e de antraquinonas secretadas pelo fungo. Em seu trabalho, através de análises de espectroscopia no UV-Vis, fluorescência e atividade enzimática, foi verificado que enzimas redutase nitrato dependentes e quinonas estão envolvidas na redução dos íons prata à prata metálica. Tal afirmação foi comprovada mais tarde, em 2008, por Ingle *et al.* (2008).

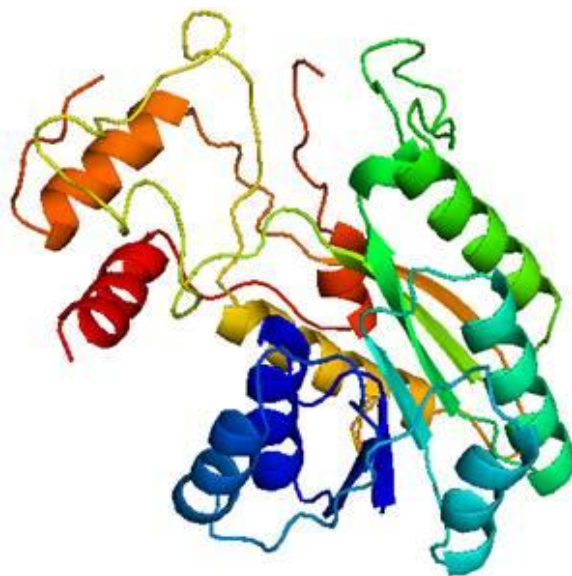


Figura 33. Representação em *cartoon* da proteína hipotética LOC100191904, identificada no BLAST como oxidoredutase quinona NAD(P)H dependente.

Em seguida, com o propósito de compreender o possível papel destas proteínas na formação e na estabilização das AgNPs, estas foram classificadas em categorias funcionais, preditas por homologia, baseado em um trabalho de Rison *et al.* (2000), como mostra o gráfico da Figura 34.

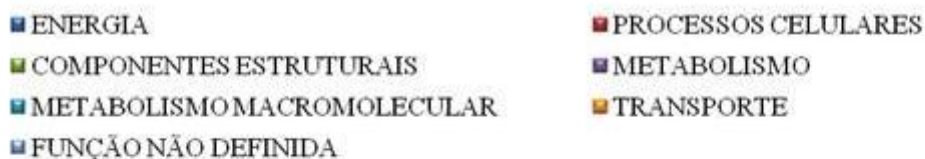


Figura 34. Gráfico representativo da classificação das proteínas em categorias funcionais.

A categoria “Processos celulares” agrupou o maior número de proteínas (31,82%), cujas funções estão relacionadas à regulação intracelular e defesa contra estresses externos. Um número expressivo de proteínas (22,73%) foi classificado em “Metabolismo Macromolecular”, que são proteínas envolvidas nos processos de biossíntese, metabolismo e degradação de outras proteínas. Proteínas do citoesqueleto e da parede celular foram classificadas em “Componentes estruturais”, representando 13,67% do total. O mesmo valor foi obtido para a categoria “Energia”, proteínas estas que estão envolvidas no metabolismo da glicose e na produção de ATP. As proteínas com função “Metabolismo” compreenderam 9,09% e englobam aquelas que desempenham importante papel no metabolismo dos aminoácidos e do nitrogênio, como também no metabolismo secundário. Proteínas responsáveis pelo transporte de macromoléculas compuseram o grupo com o menor número de representantes (4,55%), classificadas na categoria “Transporte”. Finalmente, as proteínas que não foram relacionadas a uma função clara (4,55%), foram incluídas na categoria “Função não definida”. Desta maneira, percebe-se que a maior parte das proteínas identificadas participa dos processos metabólicos do fungo.

Fungos filamentosos, como é o caso do *Fusarium oxysporum*, possuem alta capacidade de secreção de um grande número de enzimas degradativas e proteínas. Estes micro-organismos secretam lipases, invertases, lactases, proteinases, amilases, quinases, xilanasas (Christakopoulos *et al.*, 1996; Christakopoulos *et al.*, 1997), glucanases (Christakopoulos *et al.*, 1995) entre outras, as quais possuem diversas funções, como por exemplo, a aquisição de nutrientes (hidrolisam substratos tornando-os assimiláveis na forma de nutrientes). A secreção de proteínas possivelmente ocorre durante o crescimento das hifas, sendo liberadas através de um fluxo de massa passando pela parede recém-sintetizada. Estas proteínas são conhecidas por desempenhar funções muito importantes, tais como: captação de nutrientes, comunicação celular, detoxificação do ambiente e virulência (no caso dos micro-organismos patogênicos) (Tjalisma *et al.*, 2004). Os fungos também secretam pequenas proteínas, geralmente ricas em cisteínas que possuem atividade enzimática desconhecida, sendo algumas delas importantes também nas interações patógeno-hospedeiro como fitotoxinas ou indutoras de respostas de defesa da planta (Paper *et al.* 2007).

2.4 Conclusões

As proteínas secretadas pelo *F. oxysporum* foram estudadas e caracterizadas por variadas técnicas. Por FTIR e Raman, ficou evidenciada a presença destas macromoléculas nas amostras de FF e AgNPs. Ainda por espectroscopia Raman, espectros SERS obtidos no acompanhamento da formação das nanopartículas mostraram mudanças na intensidade das bandas

Ag-N (240 cm^{-1}) e Ag-S (233 cm^{-1}), sugerindo o envolvimento de resíduos de cisteína, amins livres e amidas na formação e estabilização das AgNPs.

Por fluorescência de emissão, com excitação em 280 nm, foram obtidos espectros com máximos de emissão em 370 nm (para FF), mostrando a existência de resíduos de aminoácidos aromáticos nas proteínas e, no caso das amostras de AgNPs, máximos de emissão em 361 nm e picos adicionais em 422 e 489 nm. O deslocamento no máximo de emissão e a diminuição na intensidade (*quenching*) indicaram a interação das proteínas com a superfície das nanopartículas.

As análises por Dicroísmo Circular permitiram avaliar não somente a composição estrutural das proteínas presentes no FF e nas AgNPs, como também alterações conformacionais quando estas proteínas interagem com as nanopartículas. Observou-se uma leve perda de estrutura secundária, uma vez que houveram mudanças nos conteúdos percentuais de estruturas em hélice α e *random coil*.

As proteínas (de peso entre 14,8 e 85,9 kDa, em concordância com a eletroforese em gel) também foram identificadas por espectrometria de massas, onde, dentre as várias proteínas identificadas, uma oxidoredutase (quinona NAD(P)H dependente) se destacou por catalisar reações de redução de quinonas, podendo estar envolvida na síntese das nanopartículas, em concordância com mecanismos propostos na literatura.

Capítulo 3. Atividade Antimicrobiana das Nanopartículas de Prata

3.1 Introdução

As nanopartículas de prata possuem propriedades físicas e químicas únicas quando comparadas com os compostos de prata em escala macroscópica (da Silva *et al.*, 2011; Priyanka *et al.*, 2009). Apresentam ampla aplicação em diversos campos (Vijayakumar *et al.*, 2013; Matei *et al.*, 2008). As aplicações não somente das AgNPs, mas também dos íons prata são bem conhecidas na área dos bactericidas, sendo usadas na síntese de novos materiais, como por exemplo, resinas dentárias (Herrera *et al.*, 2001), zeólitas (Faghihian e Kamali, 2003), além de variados materiais médicos, dentre eles, as vestimentas (Bosetti *et al.*, 2002; Markarian, 2006).

Por conta disso, estas partículas têm sido empregadas com grande eficácia em várias áreas das ciências químicas, biológicas, biomédicas, farmacêuticas e afins, devido à sua eficiente atividade antimicrobiana. Esta propriedade, inclusive sobre micro-organismos resistentes, tem despertado o interesse não só de pesquisadores, mas também de indústrias, sendo possível encontrar no mercado produtos contendo nanopartículas de prata. Por exemplo, o tecido Leggerissimo® da Santaconstancia Tecelagem, o desodorante Nivea *Silver Protect*, a pomada para queimaduras Silvadene, máquinas e geladeiras da Samsung, todos possuindo íons ou AgNPs em sua composição com o objetivo de inibir a proliferação de micro-organismos.

Vislumbrando-se a potencial ação bactericida dos colóides de prata, outros colóides foram estudados, sendo a prata a mais tóxica contra micro-organismos. O primeiro estudo registrado da ação bactericida da prata foi conduzido por Karl Wihelm Von Naegeli em 1893, sobre células eucariotas e procariotas, com a prata na forma iônica (Guggenbichler *et al.*, 1999). Em seu

trabalho, Von Naegeli observou que 9,2 nM de íons prata eram suficientemente tóxicos para algas, mas que possuía baixa toxicidade para células animais (Golubovich e Rabotnova, 1974).

O espectro de ação antibacteriana dos íons e nanopartículas de prata é amplo e muito eficiente contra inúmeros micro-organismos patogênicos, tais como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas com pouco desenvolvimento de resistência bacteriana e também contra vírus (Klasen, 2000; Sondi e Salopek-Sondi, 2004; Vigneshwaran *et al.*, 2007a, Morones *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2005; Rhim *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005). Sendo assim, esta propriedade tem sido amplamente estudada (Pal *et al.*, 2007; Sondi e Salopek-Sondi, 2004; Morones *et al.*, 2005; Shahverdi *et al.*, 2007; Shrivastava *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2007), embora seu mecanismo de inibição ainda seja desconhecido. Alguns estudos (Jun *et al.*, 2007; Homouda *et al.*, 2000; Dibrov *et al.*, 2002; Dragieva *et al.*, 1999) revelaram que a carga positiva dos íons prata é crucial para a atividade antibacteriana, a qual se dá através de interações eletrostáticas entre a carga negativa da membrana celular do micro-organismo e a carga positiva dos íons prata liberados pelas nanopartículas. Sondi e Salopek-Sondi (2004) reportaram que a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata frente a bactérias Gram-negativas é dependente da concentração de nanopartículas e também está associada à formação de “poços” na parede celular bacteriana. Desta maneira, as AgNPs acumuladas na membrana penetram no interior da célula resultando em morte celular. Além disso, Kumar *et al.* (2005) demonstraram que o mecanismo antibacteriano dos produtos que contêm a prata pode estar relacionado à redução dos íons prata a prata metálica (Ag^0). Também tem sido mostrado que os íons Ag^+ inibem as enzimas para os ciclos de P, S e N em bactérias nitrificantes (Ratte, 1999). Estes íons podem bloquear a transcrição

do DNA, interrompendo a respiração bacteriana e a produção da adenosina trifosfato (ATP), além de reagir com as proteínas através de reação com os grupos -SH de enzimas, levando à inativação das mesmas (Jeon *et al.*, 2003). Porém, quando em sua forma nanoestruturada, a atividade antibacteriana se torna mais eficaz devido à grande superfície de contato e a alta reatividade (Nagarajan e Rajagoplan, 2008), características estas que aumentam as probabilidades de interação com compostos presentes na superfície celular (Rizwan *et al.*, 2010).

A eficiente atividade antimicrobiana dos íons e nanopartículas de prata é bem conhecida, porém seu modo de ação ainda permanece parcialmente desconhecido, mas estudos sugerem que ele pode estar relacionada com sua forte interação com os grupos tiol (-SH) das proteínas dos micro-organismos e consequente inativação das mesmas causando a morte do micro-organismo (Liau *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2000; Gao e Craston, 2008).

Dados da literatura demonstram que a ação antimicrobiana da prata é potencializada quando na forma de nanopartículas, em parte, devido à grande superfície disponível para interação com o ambiente (Baker *et al.*, 2005). Gade *et al.* (2008) observaram por Microscopia Eletrônica de Transmissão a presença de nanopartículas de prata na membrana de *Escherichia coli* e foi demonstrado que após 60 minutos de tratamento houve rompimento da bactéria em decorrência da incorporação das nanopartículas no interior celular. Em outro estudo, a ação antibacteriana sobre *E. coli* foi observada para nanopartículas de prata em baixas concentrações (Sondi e Salopek-Sondi, 2004). Baker *et al.* (2005) verificaram que partículas menores, devido à sua maior área superficial, foram mais efetivas.

Além da ação antimicrobiana, as nanopartículas de prata apresentam propriedades eletrônicas e óticas que são dependentes de parâmetros como

tamanho, forma e composição das partículas. Estas propriedades são responsáveis por suas diversas e importantes aplicações como, por exemplo, na produção de transistores, células à combustível, marcação por fluorescência (Bruchez *et al.*, 1998), detecção de DNA/RNA por marcadores específicos, assim como possuem potencial para aplicação em diagnósticos em biomedicina, biossensores, agricultura e medicina (Krolikowska *et al.*, 2003; Riddin *et al.*, 2006; Panáček *et al.*, 2009).

Não somente a liberação de íons prata, mas também outros mecanismos têm sido propostos como os responsáveis pela ação antimicrobiana das AgNPs. Assim, três mecanismos podem explicar tal atividade (Durán *et al.*, 2014; Asharani *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2009; Smetana *et al.*, 2008):

- (1) Liberação de íons prata, gerados através da dissolução oxidativa de nanopartículas de prata. Tais íons podem interagir com grupos tiol de importantes enzimas e proteínas, além de afetarem o DNA. Células bacterianas expostas a íons Ag^+ podem sofrer alterações morfológicas, como por exemplo, deslocamento da membrana celular permitindo assim o vazamento do conteúdo intracelular.
- (2) Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais agem como aceptores de elétrons causando danos irreversíveis ao DNA. Fora da célula, afetam a membrana celular e as proteínas de membrana. Além disso, as espécies reativas de oxigênio, tais como H_2O_2 e OH^\cdot , entre outras, são subprodutos do metabolismo natural dos organismos. As AgNPs podem agir como catalisadores na produção em excesso das ROS gerando assim um estresse oxidativo na célula provocando uma ruptura na membrana celular.
- (3) Interação direta das AgNPs com a parede celular, se acumulando e aderindo na membrana, formando poços e alterando a

permeabilidade da membrana, causando apoptose e consequentemente o vazamento do conteúdo celular.

Diante do caráter não conclusivo das hipóteses abordadas, deve-se considerar que a prata apresenta uma ação sinérgica e não um só modo de atuação na atividade antibacteriana (Mohanty *et al.*, 2011).

Com a descoberta dos antibióticos e sua introdução no uso medicinal, os elementos metálicos com atividade bactericida, como a prata, foram descartados. Todavia, cada vez mais as bactérias se tornaram resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, sendo esta uma das causas da síntese constante de substâncias antibióticas alternativas e da volta dos trabalhos com colóides de prata no meio científico (Kamat, 2002).

Tendo em vista a ampla variedade de aplicações das nanopartículas de prata, estudos de toxicidade se fazem necessários antes da aplicação destes nanomateriais. Existem várias vias por onde as nanopartículas podem entrar no corpo humano; por exemplo, por inalação (Oberdorster *et al.*, 2001), ingestão oral (Jani *et al.*, 1990) ou ainda por contato direto com a pele (Kreilgaard *et al.*, 2002). Após a absorção, estas partículas podem se disseminar em diferentes partes do corpo (Oberdorster *et al.*, 2002; Borm *et al.*, 2004). Assim, estudos considerando os possíveis impactos utilizando AgNPs em larga escala, incluindo sua toxicidade, além dos riscos ao meio ambiente e à saúde humana têm se tornado relevantes e por isso muitos trabalhos *in vivo* têm sido publicados (Gaiser *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2012; Wise *et al.*, 2010). Porém, pouco tem sido demonstrado em relação à genotoxicidade destas partículas frente a diferentes organismos e tipos celulares (Lima *et al.*, 2012). Desta forma, estudos *in vitro* e *in vivo* que avaliem a citotoxicidade, genotoxicidade e bioacumulação das AgNPs são muito relevantes e fundamentais para a aplicação segura destas nanopartículas.

3.2 Procedimento Experimental

A parte experimental deste capítulo está dividida em: (3.2.1) Cultura dos micro-organismos: *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Xac*, (3.2.2) MIC (*Minumum Inhibitory Concentration*) e MBC / MFC (*Minimum bactericidal concentration / Minimum fungicidal concentration*), (3.2.3) Caracterização microscópica dos micro-organismos e (3.2.4) Testes de toxicidade e genotoxicidade.

3.2.1 Cultura dos micro-organismos:

3.2.1.1 *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*

Primeiramente, as espécies de *Candidas* (*albicans* cepa ATCC 10231 e *parapsilosis* cepa B IFM48375) foram cultivadas em meio de cultura líquido YPD contendo peptona, extrato de levedura e dextrose, na presença de cloranfenicol. Nestas condições, as culturas foram mantidas a uma temperatura de 32°C por um período de 24 h. Posteriormente, foram cultivadas em meio de cultura YPD sólido, nas mesmas condições de tempo e temperatura do cultivo em meio líquido.

3.2.1.2 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Inicialmente, a *Xac* (cepa 306, IBSBF 1594) foi cultivada em meio de cultura sólido Luria Bertani (LB) contendo peptona, extrato de levedura e ágar, na presença de ampicilina. Nestas condições, a cultura foi mantida a uma

temperatura de 32°C por um período de 24 a 48 h. Posteriormente, foram cultivadas em meio de cultura LB líquido, nas mesmas condições de tempo e temperatura do cultivo em meio sólido, sendo possível verificar um melhor e maior crescimento celular.

Em todos os casos, os meios de cultura (Apêndice IV) foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, à temperatura de 120°C e pressão de aproximadamente 1,0 atm.

3.2.2 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) e MBC / MFC (Minimum bactericidal concentration / Minimum fungicidal concentration)

Para a determinação do MIC, em uma placa estéril tipo ELISA de 96 poços (Wiegand *et al.*, 2008; Bussmann *et al.*, 2010), 100 µL de AgNPs foram diluídas em série e a cada poço foram adicionados 50 µL das culturas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Xac*. Antes da adição na placa, as colônias de cada patógeno foram previamente transferidas para tubos de ensaio de 15 mL contendo 10,0 mL de solução salina 0,9% estéril e homogeneizadas por agitação em vórtex. O número de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC mL⁻¹) presentes em solução foi determinado por absorbância a 530 nm. As concentrações dos patógenos foram ajustadas em meio de cultura RPMI 1640 de maneira a se obter 0,5-2,5 x 10³ UFC mL⁻¹, o que equivale a uma absorbância de 0,1.

Em seguida, cada placa, devidamente identificada, foi incubada à temperatura adequada a cada micro-organismo (T = 35°C) e a leitura do valor de MIC foi efetuada após o término do período de incubação de cada patógeno

(*C. albicans* e *C. parapsilosis* = 24 h; *Xac* = 48 h) através da turbidez da cultura.

Após a leitura do MIC, o conteúdo de todos os poços da placa ELISA teste foi inoculado por estriamento em placas de petri contendo meio de cultura sólido LB, a fim de se determinar o MBC / MFC (*Minimum bactericidal concentration / Minimum fungicidal concentration*), ou seja, o caráter bacteriostático ou bactericida, fungistático ou fungicida, das nanopartículas de prata. Torna-se interessante mencionar que duas amostras de AgNPs pré-tratadas foram estudadas:

- (1) AgNPs_{lavada}, a qual foi ultracentrifugada à 50.000 rpm por 30 min por 3 vezes, com o objetivo de separar as proteínas ligadas às partículas daquelas presentes em solução. A cada ultracentrifugação, o sobrenadante foi retirado e 6,0 mL de água destilada foram adicionadas;
- (2) AgNPs_{não lavada}, a qual não passou por ultracentrifugação.

3.2.3 Caracterização microscópica dos micro-organismos

3.2.3.1 Preparação das amostras

A preparação dos micro-organismos para análises microscópicas consistiu em, primeiramente, uma etapa de fixação com solução de glutaraldeído 2,5% (KOCH) em tampão fosfato (Quemis) 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,2 durante 2 h para conservação das características estruturais e morfológicas. Em seguida, as amostras foram passadas por solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato (Quemis) 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,2 por

1 h. Após as etapas de fixação (gluteraldeído) e pós-fixação (tetróxido de ósmio), as amostras foram submetidas a uma bateria de desidratação de concentrações crescentes de etanol P. A. (Nuclear); 30% por 20 minutos, 50% por 20 minutos, 70% por 16 h, 90% por 20 minutos e três vezes 100% também por 20 minutos. Todo o preparo foi realizado sob membrana PTFE (Millipore) de 0,45 µm e 13 mm. A última etapa, considerada de extrema importância, é a utilização do *Critical Point Dryer (CPD)*.

3.2.3.2 Microscopia dos micro-organismos

Após secagem em equipamento *Critical Point Dryer (CPD)*, a morfologia da *C. parapsilosis*, da *Xac* e do *F. oxysporum* foi observada por MEV. Nesta etapa, os objetivos de aquisição das micrografias foram, além de caracterizar a morfologia dos micro-organismos, estudar possíveis alterações morfológicas na ausência e na presença de AgNPs_{não lavadas}, pois é sabido que uma das possíveis atuações das nanopartículas de prata se dá de forma direta com a parede celular. Para tanto, foram preparadas amostras controle (micro-organismos na ausência de nanopartículas de prata), amostras contendo AgNPs_{não lavadas} em concentração igual ao valor de MIC, para cada caso, como constante na Tabela 7.

Tabela 7 - Amostras de *C. parapsilosis*, *F. oxysporum* e *Xac* preparadas para MEV

1	<i>C. parapsilosis</i>	na ausência de AgNPs _{não lavadas}
3		AgNPs _{não lavadas} 13,1 µg mL ⁻¹
4	<i>F. oxysporum</i>	na ausência de AgNPs _{não lavadas}
5		na presença de AgNPs _{não lavadas}
6	<i>Xac</i>	na ausência de AgNPs _{não lavadas}
8		AgNPs _{não lavadas} 6,55 µg mL ⁻¹

As imagens foram adquiridas em um microscópio eletrônico de varredura da Jeol (JSM-T300) de aceleração igual a 10 keV e detectores de elétrons secundários e retroespalhados, sendo as amostras depositadas em um porta-amostra e recobertas com ouro pelo processo de *sputtering* utilizando um metalizador BAL-TEC.

3.2.4 Testes de cito- e genotoxicidade (Lima et al., 2013)

Da mesma maneira como nos ensaios de MIC, amostras de AgNPs pré-tratadas (AgNPs_{lavadas} e AgNPs_{não lavadas}) foram empregadas nos ensaios de toxicidade. As análises de citotoxicidade foram realizadas utilizando-se linfócitos humanos (ensaio TALI) e células 3T3 da linhagem dos fibroblastos (análises de MTT). Os testes com linfócitos foram feitos em meio RPMI enriquecido com 10% FBS (*fetal bovine serum*) e para as análises com as células 3T3 foi utilizado meio DMEN (meio Dulbecco Mem) enriquecido com 15% de FBS. Ambos os meios foram enriquecidos com antibióticos e as culturas celulares foram mantidas a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂. Após incubação, estas foram mantidas por 1 hora na presença de nanopartículas de prata visando os testes de citotoxicidade. Para as análises de genotoxicidade,

foram realizados dois testes: ensaio *COMET* e *Allium cepa*, onde as sementes foram germinadas em água ultrapura à temperatura ambiente. Quando as raízes alcançaram 2,0 cm de comprimento, as mudas foram removidas da caixa de germinação e colocadas em contato com o material de interesse. A Figura 35 ilustra os ensaios realizados neste trabalho.

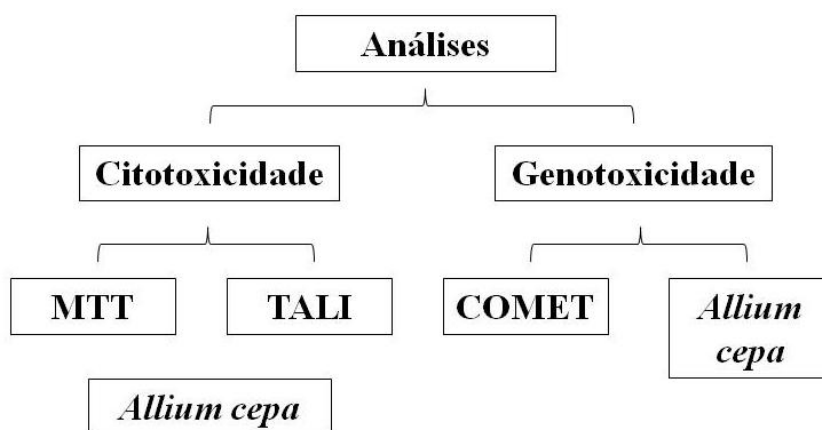


Figura 35. Esquema representativo do procedimento experimental adotado nos testes de toxicidade e genotoxicidade (adaptado de (Lima *et al.*, 2013).

3.3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos neste capítulo serão apresentados e estão divididos nos seguintes itens: (3.3.1) Leitura do valor de MIC, MBC/MFC para fungos leveduriformes *C. albicans* e *C. parapsilosis* e para a bactéria *Xac*, (3.3.2) Caracterização microscópica dos micro-organismos e (3.3.4) Testes de cito- e genotoxicidade.

3.3.1 Cultura dos fungos *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *F. oxysporum* e da bactéria *Xac* e leitura do valor de MIC

A atividade antimicrobiana das AgNPs contra diferentes espécies de micro-organismos (levedura e bactéria) foi determinada pelo método de microdiluições, como explicado no procedimento experimental (item 3.2.2). Apenas para exemplificar, na Figura 36 está uma placa tipo ELISA utilizada na determinação do MIC da *C. albicans*. Nota-se claramente (poços sem turbidez) que a mínima concentração de AgNPs_{não lavadas} necessária para inibir o crescimento da levedura é 13,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

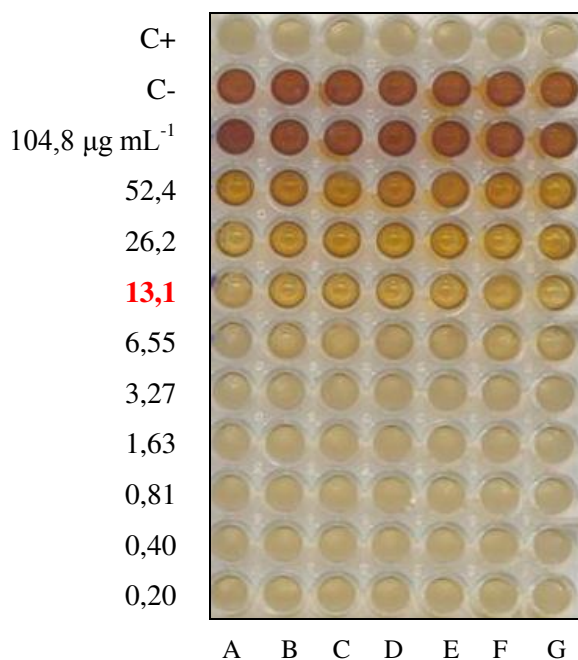


Figura 36. Imagem da placa tipo ELISA obtida no ensaio de MIC para a *C. albicans*. Agente antimicrobiano: AgNPs_{não lavadas} (MIC = **13,1** $\mu\text{g mL}^{-1}$). C+: controle positivo, C-: controle negativo; poços 3-12: variação na concentração de AgNPs 104,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; A-G: replicatas.

É interessante citar que a atividade antimicrobiana frente à *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Xac* foi estudada contra suspensões de AgNPs previamente tratadas de maneiras diferentes: AgNPs_{não lavadas} e AgNPs_{lavadas}, ou seja, estas foram ultracentrifugadas a 50.000 rpm durante 30 minutos por 3 vezes, com o objetivo de separar as proteínas ligadas às partículas daquelas proteínas presentes na dispersão. Sendo assim, o tamanho das partículas, o índice de polidispersividade bem como o valor de potencial zeta das partículas foi novamente medido e os valores encontrados estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Medidas de tamanho, polidispersividade e potencial zeta das AgNPs_{não lavada} e AgNPs_{lavada} (medidas feitas por TEM)

	AgNPs _{não lavadas}	AgNPs _{lavadas}
Diâmetro / nm por TEM	28,0 ± 13,1	34,6 ± 15,3
Polidispersividade (pdl)*	0,27	0,22
Potencial zeta / mV	-31,7 ± 2,8	-47,5 ± 3,7

* medido por DLS

A AgNPs_{lavadas} exibiu maior tamanho quando comparada com a AgNPs_{não lavadas} indicando aglomeração de partículas no processo de ultracentrifugação. As micrografias das partículas mostraram um tamanho médio igual a 28,0 nm para as AgNPs_{não lavadas} e 34,6 nm para as AgNPs_{lavadas} (Figura 37).

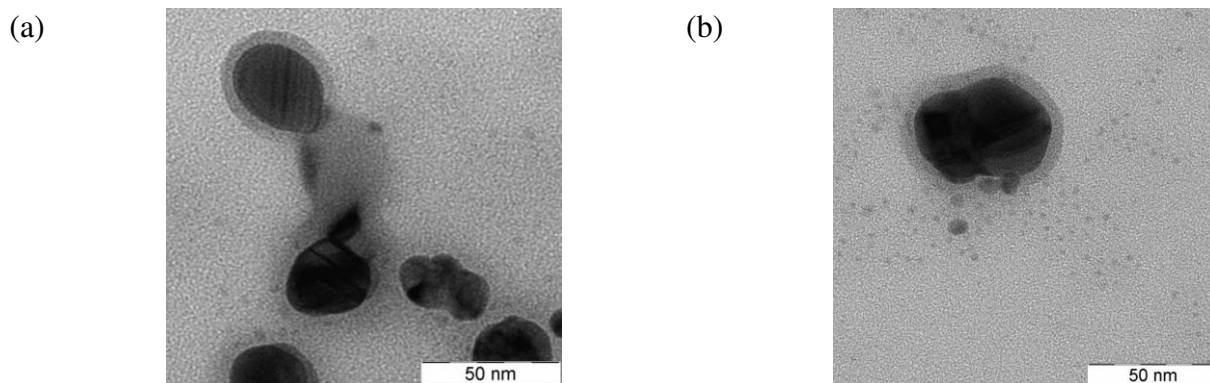


Figura 37. Micrografias das AgNPs obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (a) AgNPs_{não lavadas} e (b) AgNPs_{lavadas}.

Como mostrado na Tabela 8, os valores de polidispersividade para ambas as partículas foi ao redor de 0,2, indicando baixa polidispersividade. Em relação ao valor de potencial zeta, um aumento de cerca de 10 mV (em módulo) foi observado quando as partículas foram lavadas. Esta diferença pode ser atribuída à perda de proteínas durante o processo de lavagem com água (ultracentrifugação), como por exemplo, aquelas que não estavam ligadas à superfície da nanopartícula, causando leve aglomeração e consequentemente aumentando o tamanho das partículas.

Após uma prévia caracterização, quanto ao tamanho, carga superficial, polidispersividade e morfologia, iniciaram-se os estudos de atividade antimicrobiana. As amostras de AgNPs foram diluídas em meios de cultura apropriados a cada micro-organismo de maneira a obter-se concentrações de partículas em um intervalo de 104,8 a 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados obtidos foram graficados e estão demonstrados na Figura 38.

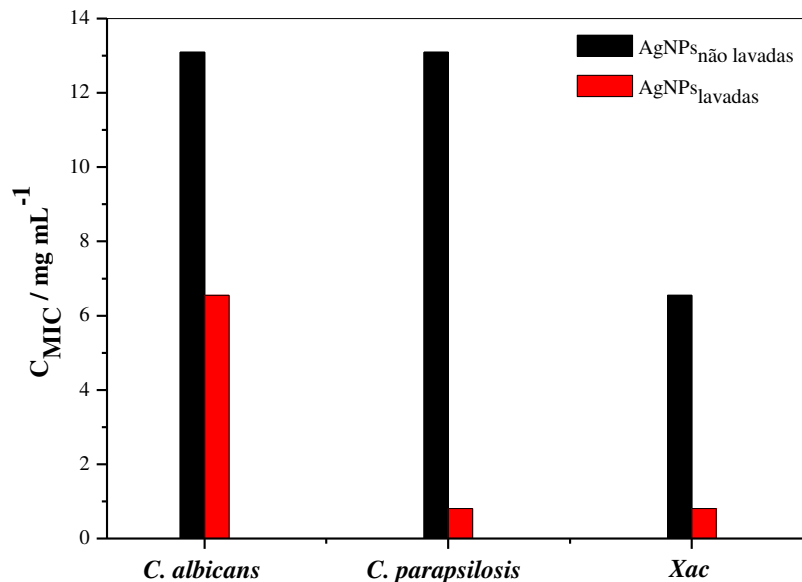


Figura 38. Comparação dos valores de MIC das AgNPs_{não lavadas} e AgNPs_{lavadas} contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Xac*.

O menor valor de MIC, em concentração de AgNPs_{não lavadas} igual a $6,55 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi obtido contra a *Xac*. O crescimento da *C. albicans* e da *C. parapsilosis* foi inibido em concentrações de nanopartículas de prata iguais a $13,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados podem ser explicados em termos das diferenças nas estruturas de parede celular dos micro-organismos testados; a *Xac*, um procarioto Gram-negativo e as espécies de *Candida*, organismos eucariotos. Considerando isto, micro-organismos procariontes, sendo um tipo celular mais simples, possuem duas membranas celulares e uma membrana externa porosa, o que facilita a entrada das AgNPs no periplasma passando por uma fina parede de polissacarídeos. Já as células eucarióticas, por definição, e em contraste com as procarióticas, possuem um núcleo, que contém a maioria do DNA celular envolvido por uma dupla camada lipídica. O DNA é assim mantido em um compartimento separado dos outros componentes celulares

que se situam no citoplasma, onde a maioria das reações metabólicas ocorre. No citoplasma, no entanto, organelas distintas podem ser reconhecidas. Dentre elas, duas são proeminentes, os cloroplastos (nas células vegetais) e as mitocôndrias (animais e vegetais), envoltas numa bicamada de membrana que é distinta da membrana nuclear. Ambas as organelas possivelmente têm origem simbiótica. Desta maneira, a maior complexidade das células eucarióticas pode explicar os valores maiores de MIC obtidos para a *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Foi observada também uma diferença significativa nos valores de MIC entre as AgNPs_{não lavadas} e AgNPs_{lavadas} para todos os micro-organismos. Isto porque, a liberação de íons Ag⁺ a partir dos *clusters* de Ag são, aparentemente, os responsáveis pela ação antimicrobiana, embora as nanopartículas de prata também podem interagir com a superfície celular causando sua ruptura (Sondi e Salopek-Sondi, 2004; Lok *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009).

Dubas *et al.* (2011) reportaram que a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata depende fortemente da capa de estabilização ao redor das partículas, sendo que, quanto menor a concentração de agente estabilizante, maior o efeito antimicrobiano, devido à degradação mais rápida das nanopartículas de prata. Uma vez produzidas biossinteticamente, as nanopartículas de prata formadas já são estabilizadas por proteínas do próprio micro-organismo utilizado em sua síntese (Durán *et al.*, 2007; Mohanpuria *et al.*, 2008). Submetidas à lavagem (ultracentrifugação a 50000 rpm durante 30 minutos por 3 vezes), as proteínas presentes em solução puderam ser separadas daquelas ligadas à superfície das partículas. Estas, por sua vez, foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), sendo as concentrações iguais a 204,2 µg mL⁻¹ e 75,58 µg mL⁻¹ para AgNPs_{não lavadas} e AgNPs_{lavadas}, respectivamente. Levando-se em consideração o estudo realizado

por Dubas e colaboradores, era de se esperar que, por possuir uma menor quantidade de agente estabilizante, as AgNPs_{lavadas} apresentassem um efeito antimicrobiano mais pronunciado. Portanto, a diferença na atividade antimicrobiana considerando nanopartículas com diferentes concentrações de agente estabilizante, é devida, provavelmente, a diferenças nas quantidades de íons Ag⁺ liberados (Kittler *et al.*, 2010). No caso deste trabalho, acredita-se que a liberação de íons prata seja intracelular, uma vez que estes, quando fora da célula, foram quantificados por Potenciometria* e as quantidades encontradas foram muito baixas, da ordem de 10⁻³ µg mL⁻¹.

Simultaneamente ao estudo da atividade antimicrobiana, testes da atividade fungicida e bactericida (determinação de valores de MBC/MFC) foram realizados para observação da capacidade das AgNPs em matar ou apenas inibir o crescimento dos micro-organismos.

Um agente fungistático ou bacteriostático tem como princípio impedir a proliferação dos micro-organismos, ou seja, detém a multiplicação do patógeno, seu aumento em número, mas não tem a propriedade de matar, permitindo assim, em um micro-organismo, ao sistema imunológico a tarefa de eliminar aquela infecção. O crescimento é limitado pois, estes agentes interferem na produção de proteínas, na replicação do DNA ou outros aspectos do metabolismo celular. Já os bactericidas ou fungicidas, são agentes que destroem o micro-organismo por meio de diversos mecanismos, seja através da destruição da parede celular, da inibição da síntese proteica, entre outros. Apesar de matarem o patógeno, não possuem a capacidade de destruir as células mortas, ou seja, ocorre a morte celular, mas não há a lise da célula.

* Determinação de íons Ag⁺ através da técnica de Potenciometria com potencial de circuito aberto com um fio de prata como eletrodo referência e um fio de platina como eletrodo de trabalho. O equipamento utilizado foi um potenciostato PGSTAT 302N, AUTOLAB.

Os resultados deste estudo estão sumarizados na Tabela 9, onde o símbolo (+) representa o crescimento do micro-organismo em determinada concentração, enquanto a sinalização (-) se refere a ausência do crescimento. As células destacadas correspondem aos respectivos valores de MIC.

Tabela 9 - Resultados dos ensaios de atividade fungicida e bactericida das AgNPs_{não lavadas} e AgNPs_{lavadas} contra os micro-organismos testados

Concentração AgNPs / $\mu\text{g mL}^{-1}$		<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Xac</i>
104,8	AgNPs _{não lavadas}	+	-	-
	AgNPs _{lavadas}	-	-	-
52,4	AgNPs _{não lavadas}	+	-	-
	AgNPs _{lavadas}	-	-	-
26,2	AgNPs _{não lavadas}	+	+	-
	AgNPs _{lavadas}	-	-	-
13,1	AgNPs _{não lavadas}	+	+	-
	AgNPs _{lavadas}	-	-	-
6,55	AgNPs _{não lavadas}	+	+	-
	AgNPs _{lavadas}	+	+	-
3,27	AgNPs _{não lavadas}	+	+	+
	AgNPs _{lavadas}	+	+	-
1,63	AgNPs _{não lavadas}	+	+	+
	AgNPs _{lavadas}	+	+	-
0,81	AgNPs _{não lavadas}	+	+	+
	AgNPs _{lavadas}	+	+	-
0,40	AgNPs _{não lavadas}	+	+	+
	AgNPs _{lavadas}	+	+	+
0,20	AgNPs _{não lavadas}	+	+	+
	AgNPs _{lavadas}	+	+	+

Como apresentado na Tabela 9, a *C. albicans* cresceu na presença de todas as concentrações de nanopartículas não lavadas. Desta forma, estas

apenas inibiram o crescimento deste fungo, sendo consideradas fungistáticas. Já as nanopartículas lavadas podem ser consideradas fungicidas de 104,1 a 13,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentrações nas quais houve morte celular) e fungistáticas a partir de 6,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$, concentração a partir da qual houve crescimento.

Para concentrações menores a 26,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de $\text{AgNPs}_{\text{não lavadas}}$ e 6,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de $\text{AgNPs}_{\text{lavadas}}$, houve crescimento da *C. parapsilosis*, podendo-se considerar então o caráter fungistático das nanopartículas nestas concentrações e fungicida para as concentrações maiores a estas.

No caso da *Xac*, até concentrações iguais a 6,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para $\text{AgNPs}_{\text{não lavadas}}$ e $\text{AgNPs}_{\text{lavadas}}$, não houve crescimento do micro-organismo, sendo as nanopartículas, portanto bactericidas. Porém, a partir destes valores, as nanopartículas inibiram o crescimento, mas não foram capazes de matar a bactéria.

3.3.2 Caracterização microscópica dos micro-organismos

Como mencionado anteriormente, antes da caracterização microscópica dos micro-organismos estudados, estes foram secos em equipamento *Critical Point Dreyer (CPD)*, o qual foi inicialmente introduzido por Anderson (Anderson, 1951), em 1951, sendo considerado o método mais comumente utilizado para o preparo de amostras biológicas (Pathan *et al.*, 2008). Neste sistema de secagem ocorre a substituição do etanol por dióxido de carbono líquido que se evapora a altas temperaturas. O *CPD* é geralmente empregado para:

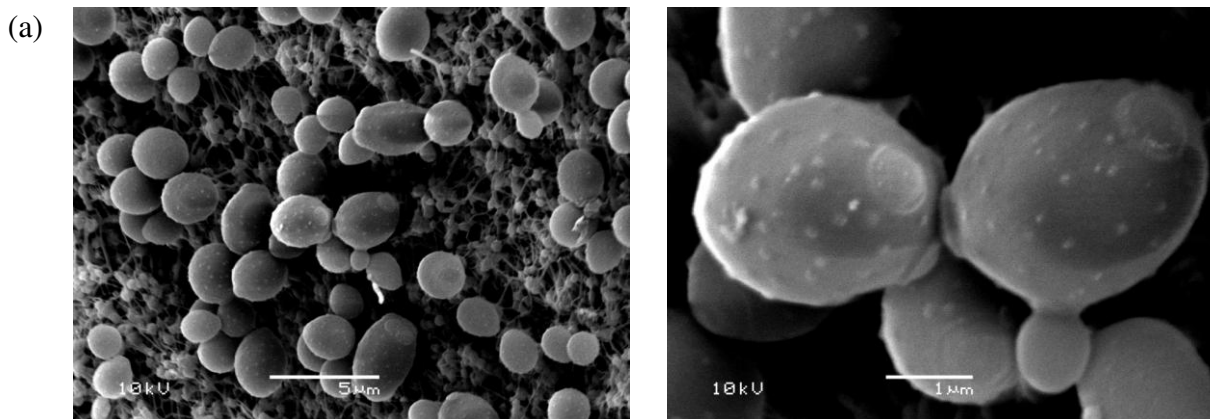
- (1) caracterizar a morfologia;

(2) investigar a presença de nanopartículas de prata em micro-organismos.

Além disso, a utilização do *CPD* diminui as chances de ocorrer distorção na morfologia celular devido à mínima tensão superficial criada durante a desidratação da amostra por etanol P.A.

Uma vez secos e metalizados com ouro, a *C. parapsilosis*, o *F. oxysporum* e a *Xac* tiveram sua morfologia caracterizada por MEV.

Desta maneira, puderam-se observar alterações morfológicas causadas pela presença das nanopartículas de prata nos micro-organismos estudados. As imagens obtidas por microscopia para a *C. parapsilosis* estão apresentadas na Figura 39, onde (a) representa a *C. parapsilosis* na ausência de $\text{AgNPs}_{\text{n\~{a}o lavadas}}$ e (b) representa a *C. parapsilosis* na presença de $\text{AgNPs}_{\text{n\~{a}o lavadas}} 13,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC). Da mesma maneira, a Figura 40a, mostra a imagem MEV da *Xac* na ausência de $\text{AgNPs}_{\text{n\~{a}o lavadas}}$ e a Figura 40b, mostra imagem MEV da *Xac* na presença de $\text{AgNPs}_{\text{n\~{a}o lavadas}} 6,55 \mu\text{g mL}^{-1}$. No caso do *F. oxysporum*, a Figura 41 (a) e (b) referem-se ao micro-organismo na presença e na ausência das nanopartículas de prata, respectivamente.



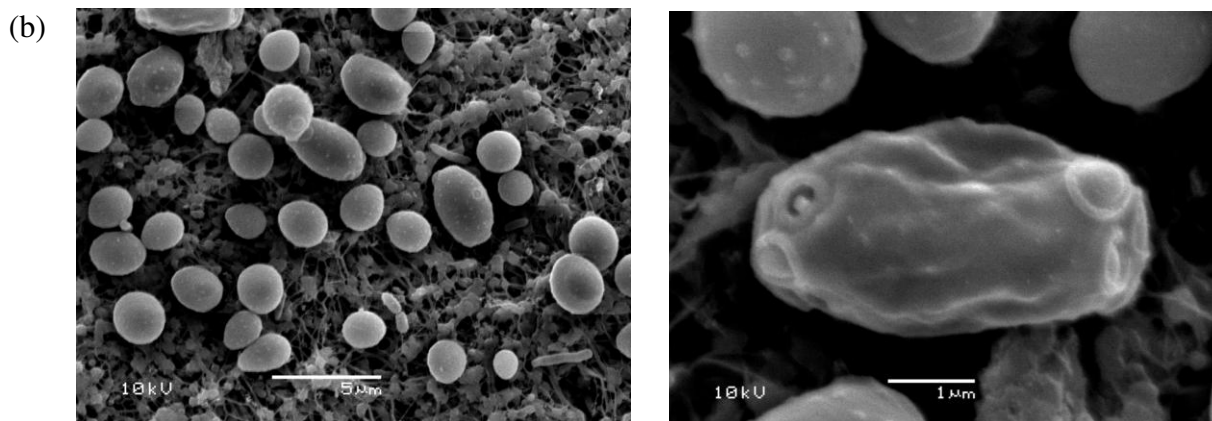
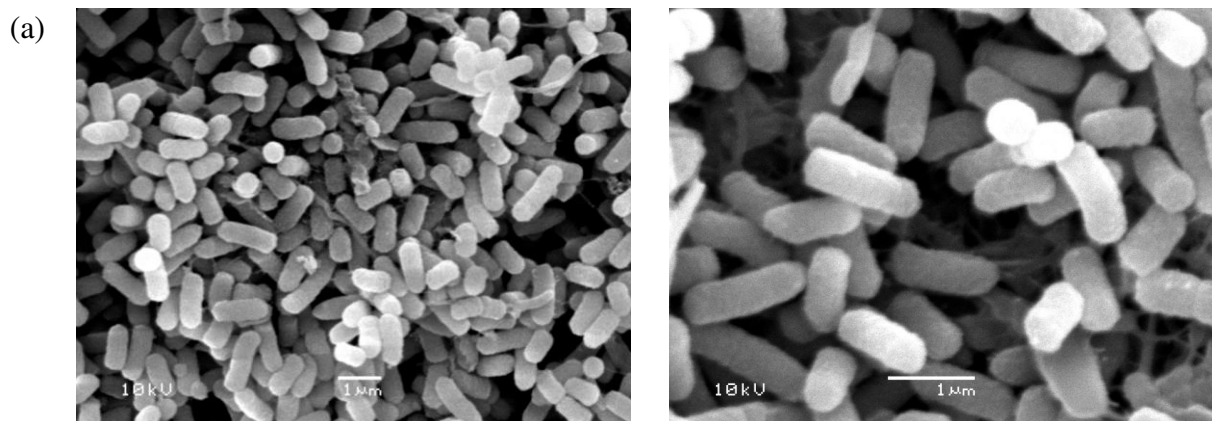


Figura 39. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura da *C. parapsilosis* (a) na ausência de AgNPs_{não lavadas}, (b) na presença de AgNPs_{não lavadas} $13,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Nas micrografias da *C. parapsilosis* (Figura 39), observa-se que na presença de AgNPs_{não lavadas} em concentração igual ao MIC ($13,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), alterações na parede celular são observadas (Figura 39b), conferindo ao micro-organismo aspecto murcho, bem diferente do micro-organismo controle (na ausência de AgNPs_{não lavadas}, Figura 39a).



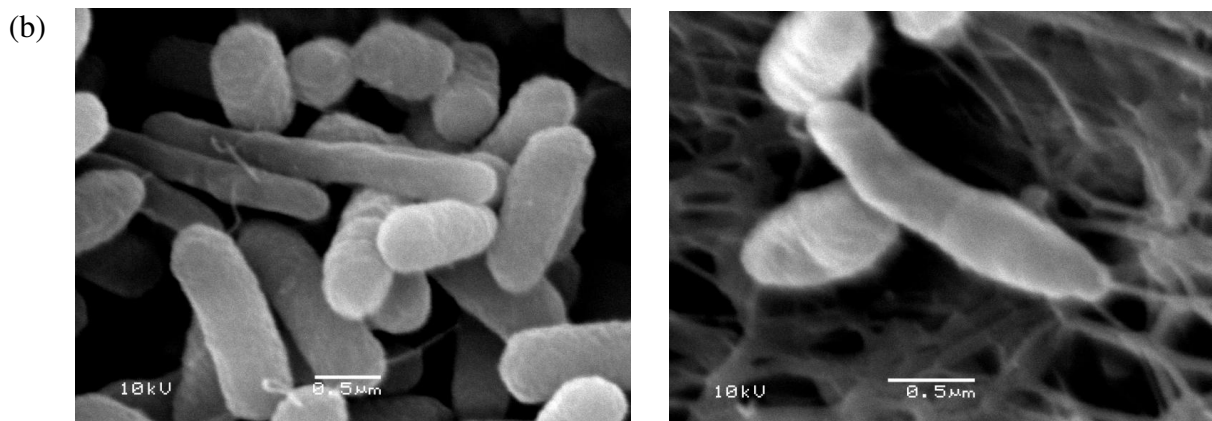


Figura 40. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura da *Xac* (a) na ausência de $\text{AgNPs}_{\text{não lavadas}}$, (b) na presença de $\text{AgNPs}_{\text{não lavadas}}$ $6,55 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Da mesma maneira, as imagens de MEV da *Xac* (Figura 40) mostram que na presença $\text{AgNPs}_{\text{não lavadas}}$ em concentração igual a $6,55 \mu\text{g mL}^{-1}$, a bactéria murchou, como consequência da interação direta das nanopartículas com a parede celular. O aspecto da *Xac* na Figura 40b (na presença de $\text{AgNPs}_{\text{não lavadas}}$) se mostra bem diferente do aspecto observado na Figura 40a (na ausência de $\text{AgNPs}_{\text{não lavadas}}$).

Como já mencionado, apesar do mecanismo exato da ação de nanopartículas de prata ainda estar sob investigação, alguns autores acreditam que a prata, em sua forma nanoestruturada apresenta propriedades antimicrobianas mais eficientes comparadas a outros sais devido a sua grande área superficial, o que provoca um maior contato com o micro-organismo (Rai *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2005; Sondi e Salopek-Sondi, 2007; Song *et al.*, 2006). Alguns estudos (Morones *et al.*, 2005; Kvítek *et al.*, 2010) propõem que as nanopartículas agem de três maneiras: (1) se fixando à superfície da membrana do micro-organismo, perturbando a permeabilidade e causando distúrbios no sistema respiratório da célula; (2) penetrando no interior do micro-organismo causando danos por interagirem com compostos contendo enxofre (proteínas) e fósforo como o DNA; (3) liberando íons Ag^+

como um contribuinte adicional ao efeito antimicrobiano e ainda, que AgNPs com maior área superficial disponível para interação possivelmente apresenta um efeito microbiano mais forte. Tais mecanismos podem ser utilizados para comprovar as mudanças morfológicas observadas quando a *C. parapsilosis* e a *Xac* encontram-se na presença das AgNPs.

Na Figura 41 são apresentadas as imagens da microscopia do *F. oxysporum*. A Figura 41a mostra um conjunto de hifas, o micélio, o qual funciona como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes. Além disso, em maiores ampliações, são mostradas algumas hifas (filamentos microscópicos e ramificados que constituem os fungos) contendo esporos e esporângios.

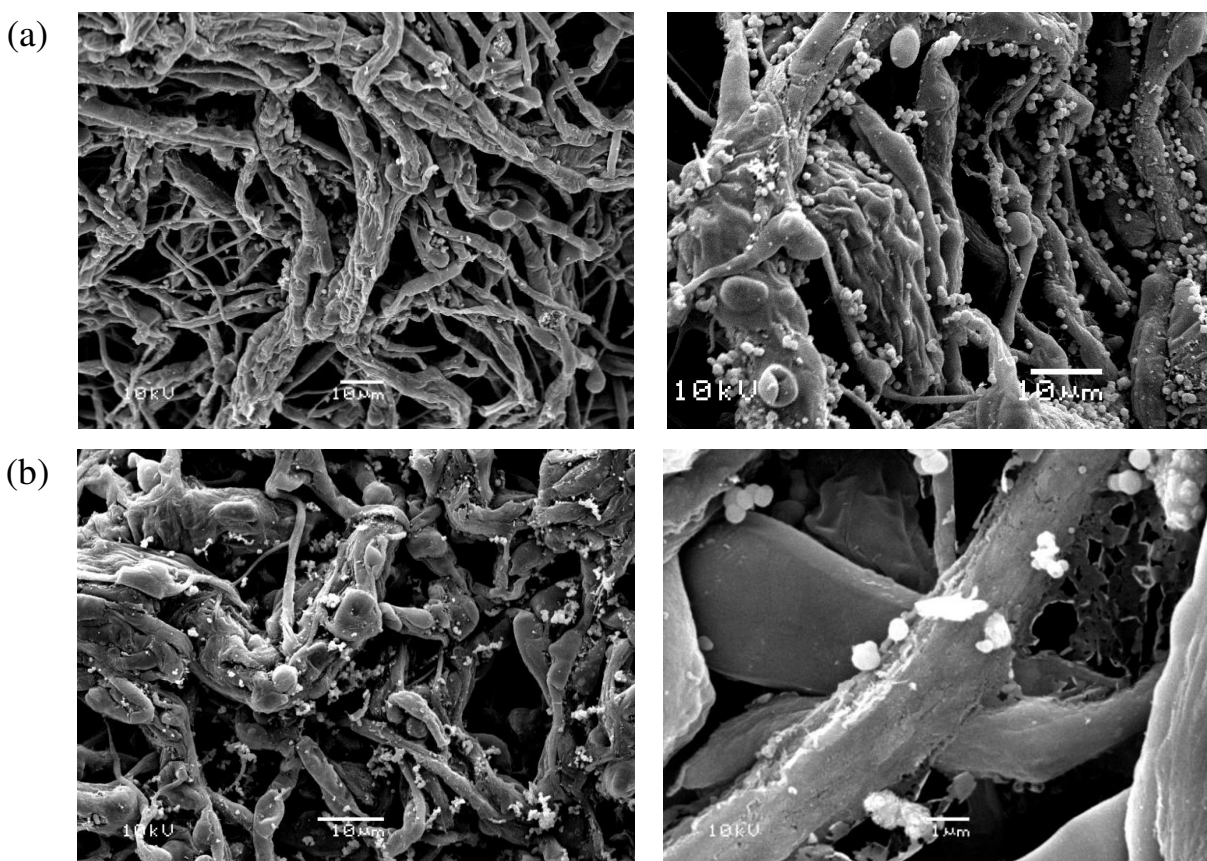


Figura 41. Imagens da Microscopia eletrônica de varredura do *F. oxysporum* (a) na ausência de AgNPs_{não lavadas} e (b) na presença de AgNPs_{não lavadas}.

Como visto na Figura 41, aparentemente não são observadas mudanças morfológicas, tais como as encontradas para a *C. parapsilosis* e *Xac*. Isto porque, a parede celular dos fungos é formada por uma estrutura rígida, feita de um material fibroso e depositada em camadas concêntricas, com a função de proteção contra pressão osmótica. A sua constituição depende do fungo, podendo ser basicamente de quitina ou de mistura de duas substâncias (glucanas e mananas). A quitina é um polímero de glicose imerso em uma matriz proteica que está restrita a uma área específica na parede, sendo encontrada em maior proporção em fungos filamentosos, como é o caso do *F. oxysporum*, do que em leveduras (*C. parapsilosis*). As glucanas e mananas formam manoproteínas e glicoproteínas, estando associadas à proteínas. As glucanas são polímeros de glicose ligados por pontes β -glicosídicas, enquanto as mananas são polímeros de manose e é o material amorfo da parede.

Desta forma, as AgNPs_{não lavadas}, mesmo em contato direto com o *F. oxysporum*, não foram capazes de causar alterações, ao menos que visíveis, em sua estrutura.

3.3.3 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade

Da mesma maneira que para os ensaios de atividade antimicrobiana (MIC), amostras de AgNPs pré tratadas foram empregadas nos testes de toxicidade. As amostras de AgNPs_{não lavadas} apresentaram citotoxicidade em células de fibroblastos da linhagem 3T3 (ensaio MTT) e linfócitos (ensaio *Tali*) para concentrações superiores a $39,51 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor de IC_{50} , o qual representa a concentração de AgNPs que levou à 50% de morte celular. Já as AgNPs_{lavadas} não apresentaram efeito citotóxico para essas linhagens celulares

(viabilidade celular ao redor de 90%). Desta maneira, trabalhar com concentrações de AgNPs inferiores ao valor do IC₅₀ torna-se seguro em termos de citotoxicidade para as linhagens celulares estudadas.

A genotoxicidade, estudada pelo ensaio *COMET* em células de fibroblastos da linhagem 3T3 e linfócitos, mostrou que para todas as concentrações testadas (1,5; 3,0; 15 e 30 µg mL⁻¹) as AgNPs_{não lavadas} causaram danos ao DNA, enquanto que as AgNPs_{lavadas} apenas causaram danos em concentração igual a 30 µg mL⁻¹. Nas análises *in situ* com células vegetais (*Allium cepa*) também foi observado um aumento nos danos ao DNA conforme exposição a maiores concentrações de AgNPs_{não lavadas} (5,0; 10 e 50 µg mL⁻¹), enquanto as AgNPs_{lavadas} somente apresentaram danos significativos em concentrações iguais a 50 µg mL⁻¹. Ainda, foi possível estudar a citotoxicidade das nanopartículas neste tipo de célula vegetal, sendo que ambas, AgNPs_{não lavadas} e AgNPs_{lavadas}, não foram citotóxicas pois causaram alterações insignificantes nos índices mitóticos.

Em 2012, Lima *et al.* (Lima *et al.*, 2012) apresentaram e discutiram algumas publicações (Kim *et al.*, 2012; Ordzhonikidze *et al.*, 2009; Panda *et al.*, 2011) relacionadas à genotoxicidade e a citotoxicidade de nanopartículas de prata com objetivo de um melhor entendimento das possíveis aplicações destes nanomateriais de uma maneira segura. O trabalho concluiu que, considerando os estudos reportados na literatura, torna-se complexo estabelecer uma tendência para a toxicidade (citotoxicidade e genotoxicidade) das nanopartículas de prata, uma vez que sintetizadas de maneiras diferentes, possuem variados tamanhos, podendo ou não possuir agentes de estabilização e, finalmente, são testadas em diversos tipos de testes de toxicidade. De fato, utilizando-se diferentes organismos e/ou culturas de

células, não é possível chegar a uma conclusão frente à toxicidade de nanopartículas de prata.

Os resultados e discussões da cito- e genotoxicidade das AgNPs estão apresentados e discutidos mais detalhadamente no artigo publicado no *Journal of Physics: Conference Series* (Lima *et al.*, 2013).

3.4 Conclusões

As nanopartículas de prata biossinteticamente produzidas, de tamanho igual a 28,0 e 34,6 nm, para AgNPs_{não lavadas} e AgNPs_{lavadas}, respectivamente, apresentaram efeito antimicrobiano frente a diferentes micro-organismos de maneira eficiente, com valores de MIC baixos, da ordem de $\mu\text{g mL}^{-1}$. Quando pré-tratadas, estas apresentaram efeito tóxico mais pronunciado, devido a menor concentração de agente estabilizante ao redor da partícula e consequente liberação de maior quantidade de íons Ag^+ . Os testes de atividade fungicida e bactericida mostraram que em determinadas concentrações as AgNPs possuíram a capacidade de inibir o crescimento dos patógenos estudados, atuando como agentes bacteriostático e fungistático. Por outro lado, em maiores concentrações, as nanopartículas foram capazes de matar os micro-organismos (atuando como agentes bactericida e fungicida), mostrando o caminho promissor no emprego deste nanomaterial no combate microbiano. Ainda, com o pré-tratamento das amostras, as AgNPs_{lavadas} apresentaram um caráter mais bactericida/bacteriostático e fungicida/fungistático que as AgNPs_{não lavadas}, em concordância com os resultados obtidos de MIC. A *Candida parapsilosis*, o *Fusarium oxysporum* e a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram caracterizadas morfológicamente por microscopia eletrônica de

varredura na presença e na ausência de nanopartículas de prata, as quais apresentaram efeito sob a membrana da *C. parapsilosis* e da *Xac*, mas não sobre o *F. oxysporum*, devido à existência de diferenças estruturais nos micro-organismos estudados. A partir dos estudos de toxicidade, pode-se concluir que as AgNPs_{não lavadas} possuem um maior efeito citotóxico para fibroblastos da linhagem 3T3 e linfócitos quando comparadas com AgNPs_{lavadas}, provavelmente devido à diferenças na capa envoltória. O valor de IC₅₀ ao redor de 40 µg mL⁻¹ indica que estudos envolvendo concentrações de AgNPs_{não lavadas} inferiores a este valor podem ser considerados seguros em termos de citotoxicidade para as linhagens celulares estudadas. Também para estes tipos celulares, as AgNPs_{não lavadas} causaram mais danos ao DNA quando comparadas com as AgNPs_{lavadas} sendo, portanto, consideradas genotóxicas. O mesmo comportamento foi observado para os estudos de genotoxicidade em células vegetais (*Allium cepa*). Porém, para esta mesma linhagem celular, ambas as amostras de nanopartícula não apresentaram efeito citotóxico, uma vez que não alteraram significativamente os índices mitóticos.

Capítulo 4. Impregnação das Nanopartículas de Prata em
Tecido de Algodão

4.1 Introdução

Uma das áreas mais carentes em produtos antimicrobianos é a área da saúde, devido ao alto índice de infecções hospitalares provenientes de micro-organismos, que em muitos casos, são resistentes aos antibióticos tradicionais. Uma única infecção hospitalar pode gerar um gasto de aproximadamente 40.000 dólares em custos de cuidados médicos chegando a aproximadamente 60.000 dólares em cuidados de sepsia de pós-operatório, na ocorrência de um grave surto (Gibbins e Warner, 2005).

Nesta linha, e com a preocupação em melhorar a qualidade de vida dos seres humanos, uma nova área tem se desenvolvido no domínio dos acabamentos têxteis, principalmente no que se refere ao crescimento de micro-organismos. Tanto os tecidos têxteis produzidos com fibras naturais, como os que são manufaturados com fibras sintéticas não são resistentes ao crescimento de bactérias ou fungos patogênicos (Lee *et al.*, 2003).

O controle de micro-organismos nestes materiais é essencial, uma vez que estes podem ser os causadores do aumento de contaminação por micro-organismos patogênicos em ambientes como casas, hospitais ou indústrias alimentícias. Com a alta incidência de infecções nosocomiais (qualquer infecção adquirida pelo paciente após a sua entrada no hospital ou após a sua alta quando a infecção estiver diretamente relacionada com a internação hospitalar) e o constante fluxo de pessoas com doenças infecciosas, muitos pesquisadores têm focado os estudos no desenvolvimento de materiais têxteis antimicrobianos para serem usados em ambientes hospitalares (Chadeau, *et al.*, 2010; Gao e Cranston, 2008).

Nos hospitais, os materiais têxteis são encontrados na forma de lençóis, fronhas, batas dos profissionais da saúde, cortinas, máscaras, batas cirúrgicas e

cobertores, todos proliferadores de bactérias (Borkow e Gabbay, 2007). Uma maneira de evitar a incidência de bactérias e proteger usuários é o tratamento de materiais têxteis com agentes antimicrobianos. Portanto, estruturas metálicas nanométricas depositadas na superfície de materiais tem recebido uma considerável atenção nesses últimos anos e um dos metais mais utilizados pela indústria têxtil é a prata, a qual é conhecida dentro da comunidade médica pelo largo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e certas viroses, incluindo cepas resistentes a antibióticos. A prata também pode ser usada para reduzir infecções em tratamento de queimaduras, prevenir a colonização bacteriana em equipamentos médicos, bem como tecidos têxteis, e em tratamentos de água (Monteiro *et al.*, 2009). Esse agente antimicrobiano age efetivamente afetando o metabolismo celular e inibindo o crescimento celular das bactérias. Nesta linha, as nanopartículas de prata têm sido impregnadas em tecidos como algodão, náilon, poliéster entre outros para a obtenção de materiais estéreis (Durán *et al.*, 2005; Vigneshwaran *et al.*, 2007c; Rai *et al.*, 2009; Ravindra *et al.*, 2010; Durán *et al.*, 2007; Perelshtein *et al.*, 2008). Em 2009, Ilic' *et al.* (2009) verificaram que tecidos de algodão impregnados com 10 e 50 ppm de nanopartículas de prata apresentaram atividade antimicrobiana frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Entretanto, após alguns ciclos de lavagem, os tecidos com 10 ppm liberaram todo o conteúdo de nanopartículas enquanto os tecidos com 50 ppm liberaram 98,4%. Dessa maneira, diferentes estratégias têm sido estudadas para aumentar a adesão das partículas às fibras do tecido, sendo uma das possibilidades a modificação da superfície dos tecidos com, por exemplo, grupos catiônicos (Khali-Abad *et al.*, 2009). No entanto, estas modificações envolvem mais etapas no processo, gerando um alto custo de produção. Uma

alternativa que tem se mostrado eficiente é a impregnação de nanopartículas de prata produzidas biossinteticamente, por exemplo, por fungos, em tecidos de algodão. A adesão destas às fibras dos tecidos é eficiente devido à presença de proteínas ao redor das partículas, permitindo uma maior adesão às fibras dos tecidos.

Durán *et al.* (2007) estudaram a impregnação de nanopartículas de prata produzidas pelo fungo *F. oxysporum* em tecidos de algodão. Os autores observaram que os tecidos impregnados com as nanopartículas apresentaram atividade antibacteriana frente à bactéria *S. aureus*, reduzindo o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 99,9%. Marcato *et al.* (2012), impregnaram tecidos de algodão e poliéster com nanopartículas de prata produzidas também pelo fungo *F. oxysporum*, e verificaram alta atividade antimicrobiana mesmo após 20 ciclos de lavagens. Este estudo demonstrou pequena perda das nanopartículas de prata durante os processos de lavagens em decorrência da alta adesão das partículas às fibras de algodão. Estes resultados indicam a grande funcionalidade e relevância da capa proteica, proveniente do fungo, e localizada ao redor das partículas. Como já relatado, esta capa proteica também é responsável pela alta estabilidade das partículas em suspensões aquosas (Durán *et al.*, 2005; Gade *et al.*, 2008).

Assim sendo, várias são as maneiras pelas quais as propriedades antimicrobianas podem ser conseguidas em materiais têxteis, tais como: a incorporação de agentes antimicrobianos diretamente na produção das fibras, revestimento ou adsorção de antimicrobianos sobre as fibras têxteis, como no caso deste trabalho, e imobilização de antimicrobianos em fibras através de ligações iônicas ou covalentes (Kostic *et al.*, 2008; Hegemann *et al.*, 2007).

4.2 Procedimento Experimental

A parte experimental deste capítulo está dividida em: (4.2.1) Impregnação das AgNPs em tecido de algodão e (4.2.2) Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados.

4.2.1 Impregnação das AgNPs em tecido de algodão

Os tecidos de algodão com dimensões de 10 x 10 cm foram impregnados com a dispersão de nanopartículas de prata pelo método *padding* como representado na Figura 42, com o objetivo de retirar o excesso de AgNPs.



Figura 42. Representação esquemática da impregnação de AgNPs em tecido de algodão pelo método *padding*.

Em seguida, cada tecido, impregnado 1 ou 2x com AgNPs, foi seco à temperatura ambiente por 24 h (Durán *et al.*, 2007). Após a impregnação, os tecidos foram lavados com 400 mg de sabão em pó (Surfe toque de fofo) sob agitação de aproximadamente 300 rpm por 15 minutos. Logo depois, foram enxaguados com 400 mL de água destilada, nas mesmas condições de agitação e tempo de lavagem. A cada novo processo, foram retiradas e armazenadas em tubo tipo falcon alíquotas de cada lavagem e de cada enxágue para posterior análise por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), Perkin Elmer, modelo Optima 3000DV, para quantificação de prata lixiviada. Além disso, pedaços de 1,0 x 1,0 cm do tecido, após cada ciclo de lavagem ou de enxágue, foram retirados e secos à temperatura ambiente, e foram realizadas análises por MEV, Fluorescência de Raio-X e atividade antimicrobiana destes tecidos.

Os experimentos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizados em microscópio JEOL (JSM-T300) com 20 keV de aceleração e detectores de elétrons secundários e retroespalhados, sendo as amostras depositadas em um porta-amostra e recobertas com ouro pelo processo de *sputtering* utilizando um metalizador BAL-TEC). A Fluorescência de Raio-X (XRF) foi conduzida em Espectrômetro EDX-700 da Shimadzu.

4.2.2 Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados

A atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados foi estudada contra espécies de *Cândida* (*albicans* e *parapsilosis*) e *Xac*, através do método da difusão em ágar, como descrito por vários autores (El-Rafie *et al.*, 2010; Sadhasivam *et al.*, 2010; Gopinath *et al.*, 2012). Cada

pedaço de 1,0 x 1,0 cm dos tecidos impregnados ou não, preparados de maneira asséptica (mantidos no fluxo e sob lâmpada UV por 1 h de cada lado), foi colocado em placa de petri contendo meio Mueller-Hinton ágar e LB ágar (no caso da *Xac*) à temperatura adequada ($T_{C. albicans, C. parapsilosis e Xac} = 35^{\circ}\text{C}$), na presença de cada micro-organismo (previamente inoculado na placa). Após o período de incubação (*C. albicans* e *C. parapsilosis* = 24 h; *Xac* = 48 h) o halo de inibição foi medido em milímetros e os resultados foram graficados.

4.3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos neste capítulo estão divididos nos seguintes itens: (4.3.1) Impregnação das AgNPs em tecido de algodão e (4.3.2) Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados.

4.3.1 Impregnação das AgNPs em tecido de algodão

Quando foram impregnados com AgNPs, a primeira observação que se faz é a alteração na coloração dos tecidos, uma vez que a suspensão de nanopartículas apresenta coloração marrom escura. Após a impregnação, os tecidos foram submetidos a lavagens com sabão em pó e enxágues com água, o que explica a diminuição na intensidade da cor (Figura 43) como consequência da lixiviação de prata a cada novo ciclo de lavagem e enxágue.

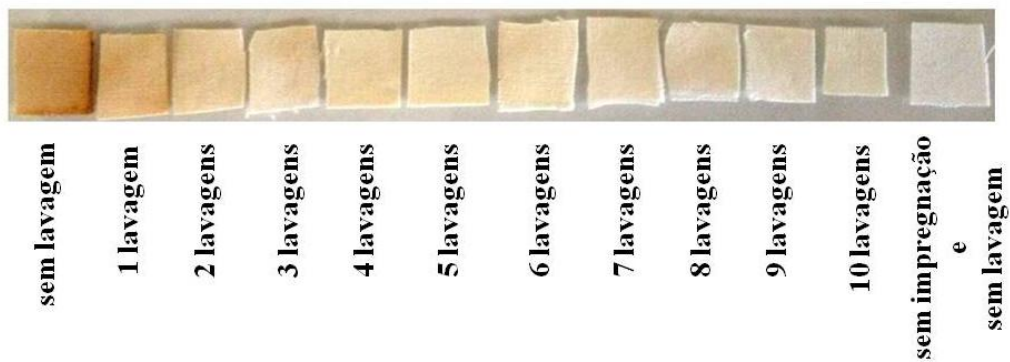


Figura 43. Fotografia dos tecidos de algodão impregnados uma vez com AgNPs e submetidos à 10 lavagens.

Como citado na parte experimental (seção 4.2.1), a cada processo de lavagem, alíquotas da água de lavagem e da água de enxague foram retiradas e analisadas por ICP, com o objetivo de verificar a lixiviação das AgNPs dos tecidos. Este estudo foi realizado com tecidos de algodão impregnados uma ou duas vezes com AgNPs. Os resultados obtidos foram graficados e são mostrados na Figura 44.

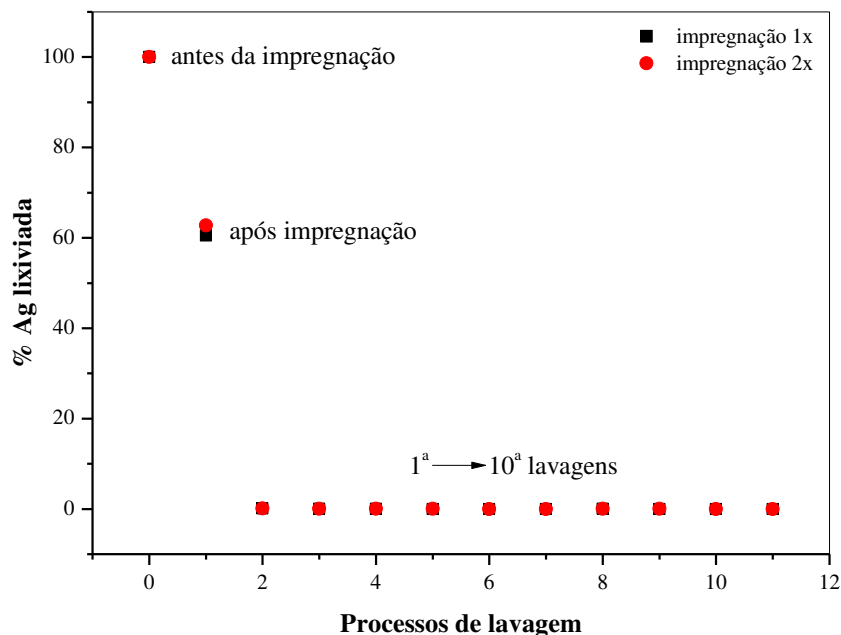


Figura 44. Comparação das porcentagens de prata lixiviada após cada ciclo de lavagem. (1 ou 2 vezes de impregnação de AgNPs nos tecidos de algodão)

Na Figura 44, observa-se que a quantidade de prata lixiviada ao final da impregnação (tanto 1x como 2x) foi aproximadamente igual a 60%. Sendo assim, a porcentagem de impregnação no tecido de algodão pode ser calculada como a diferença entre o total (100%) e a quantidade de prata lixiviada, resultando então em aproximadamente 40% ($38,59 \mu\text{g mL}^{-1}$) de impregnação. Além disso, as quantidades de prata lixiviada a cada novo ciclo de lavagem foram praticamente as mesmas para os tecidos impregnados uma ou duas vezes com AgNPs, ou seja, o limite de impregnação do tecido de algodão utilizado foi atingido com apenas 1 impregnação. Desta maneira, os experimentos seguintes foram realizados com os tecidos impregnados uma vez com AgNPs.

Em seguida, as amostras foram submetidas a análises por XRF e as porcentagens de prata impregnada nos tecidos a cada novo ciclo de lavagem e

enxágue foram determinadas e graficadas, como mostra a Figura 45. Da mesma maneira que observado por ICP-OES, conforme os tecidos impregnados com AgNPs foram submetidos aos ciclos de lavagem e enxágue, a quantidade de prata impregnada diminuiu, mais intensamente na primeira lavagem e depois se manteve praticamente constante, como mostra a Figura 45.

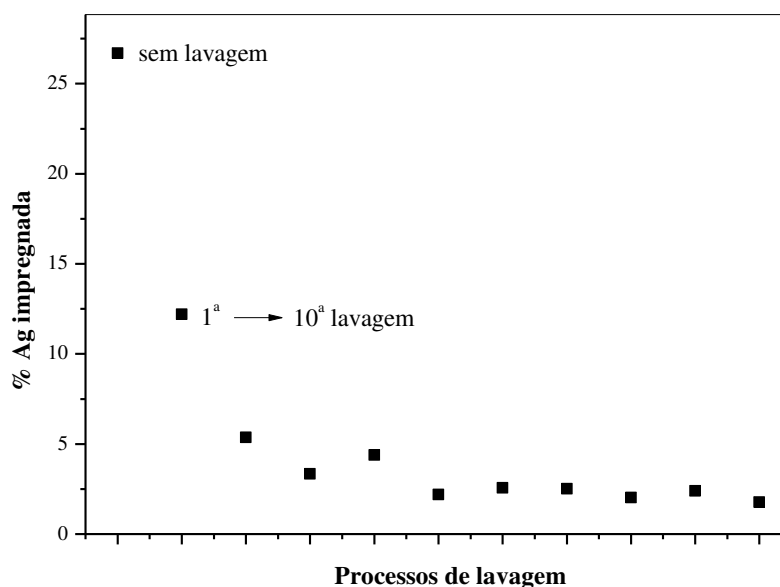


Figura 45. Determinação por XRF da porcentagem de prata impregnada nos tecidos de algodão em função dos ciclos de lavagem.

O espectro de XRF do tecido de algodão impregnado e sem lavagem está mostrado na Figura 46. Através da quantificação elementar realizada pelo equipamento, foi obtida uma concentração de prata impregnada igual a $27,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que equivale a aproximadamente 30% de impregnação. Levando-se em conta o erro das técnicas de quantificação utilizadas (ICP e XRF), as quantidades de prata impregnadas podem ser consideradas comparáveis.

A Tabela 10 em destaque na Figura 46 mostra também a presença de elementos importantes, como S e P, por exemplo, os quais estão relacionados com a capa proteica estabilizante ao redor das nanopartículas.

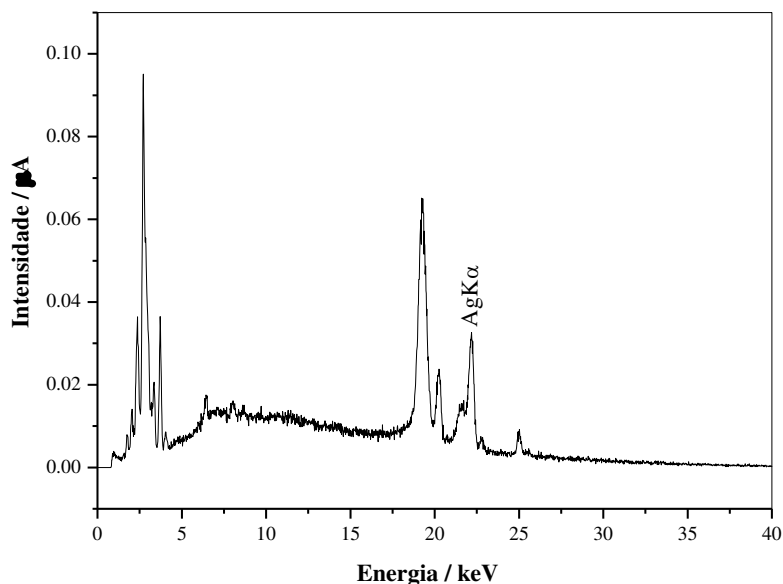


Tabela 10 - Elementos quantificados na amostra de tecido de algodão impregnado e sem lavagem

Elemento	Concentração / ppm
S	467
K	387
Ca	378
Si	285
P	268
Ag	27,9
Fe	13,8
Cu	1,42
Zn	2,53

Figura 46. Espectro de Fluorescência de Raio-X da amostra de tecido impregnado com AgNPs e sem lavagem.

Após a quantificação de prata impregnada, os tecidos controle (tecido de algodão sem impregnação e sem lavagem) e os tecidos impregnados e submetidos à ciclos de lavagem foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo que as micrografias estão ilustradas nas Figuras 47 a 49a. As fibras na amostra controle exibem estruturas uniformes com superfícies lisas (imagens em maior ampliação) conforme se observa na Figura 47.

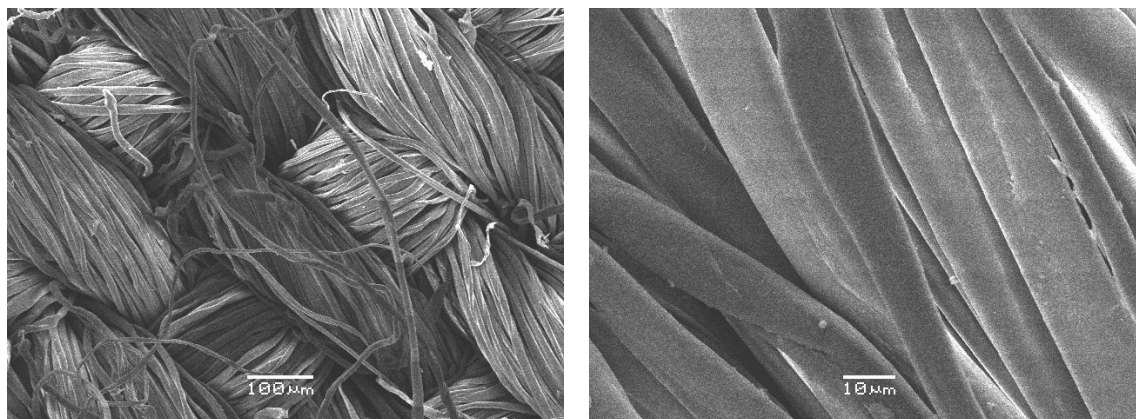


Figura 47. Micrografias das fibras de algodão (amostra controle).

As amostras controle também foram submetidas ao mesmo ciclo de 10 lavagens, com o objetivo de se observar a mudança estrutural nas fibras de algodão. O resultado encontra-se na Figura 48 e a destruição das fibras após as lavagens é evidente, uma vez que todo o processo se deu de maneira mecânica.

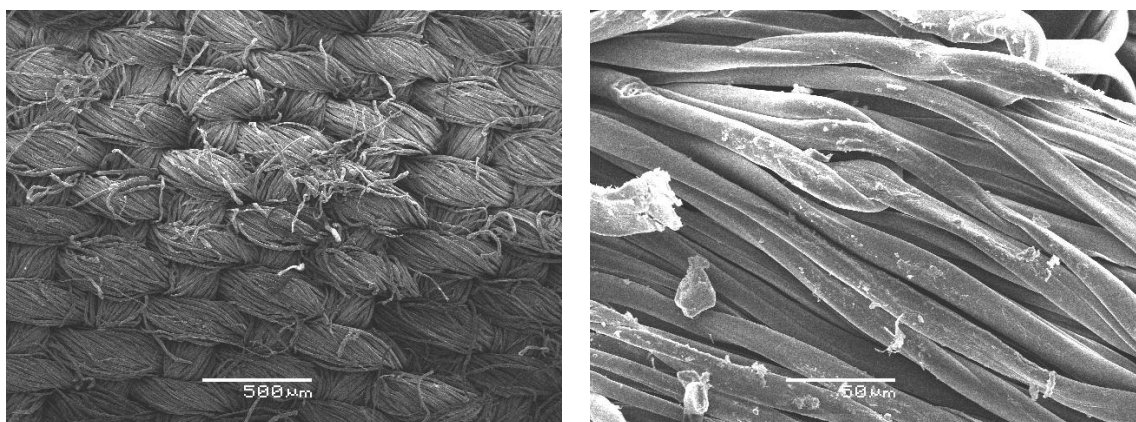
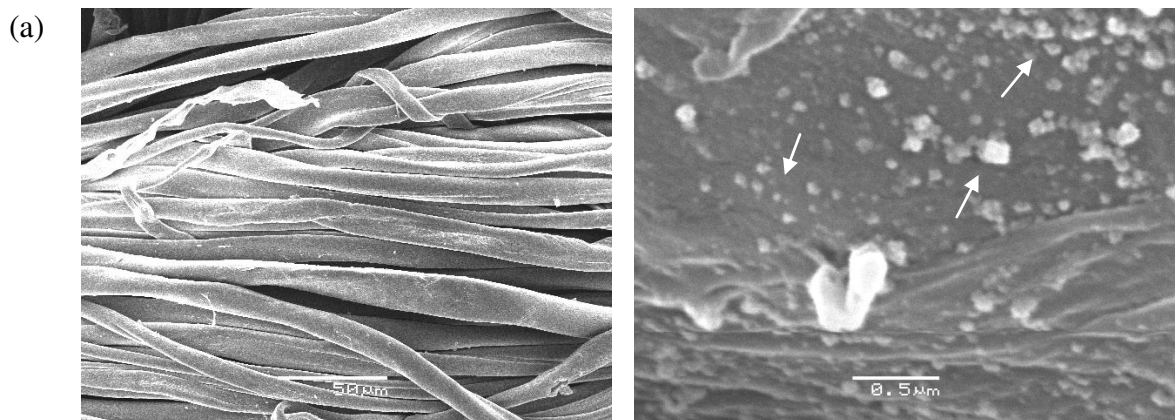


Figura 48. Micrografias das fibras de algodão sem impregnação após 10 ciclos de lavagem.

Nas imagens obtidas para os tecidos de algodão impregnados sem lavagem (Figura 49a), claramente observa-se a presença das AgNPs por toda a fibra. Tal afirmação pode ser feita, pois, juntamente com as imagens MEV,

foram realizadas análises por EDS, objetivando-se o monitoramento do pico de prata. O resultado encontra-se na Figura 49b. Na tabela inserida estão os dados obtidos, sendo a porcentagem de prata encontrada em torno de 0,2%. Há também a presença de outros elementos, sendo o carbono o maior contribuinte, cerca de 64%, o que era esperado, tendo em vista que o algodão é composto por celulose. Além disso, essa quantidade de carbono também pode ser proveniente das proteínas ao redor das nanopartículas, como já discutido. Para uma melhor visualização, imagens ampliadas são apresentadas, as quais demonstraram que as nanopartículas impregnadas são pequenas e não apresentam agregação considerável nas fibras do tecido (destacadas com seta branca).



(b)

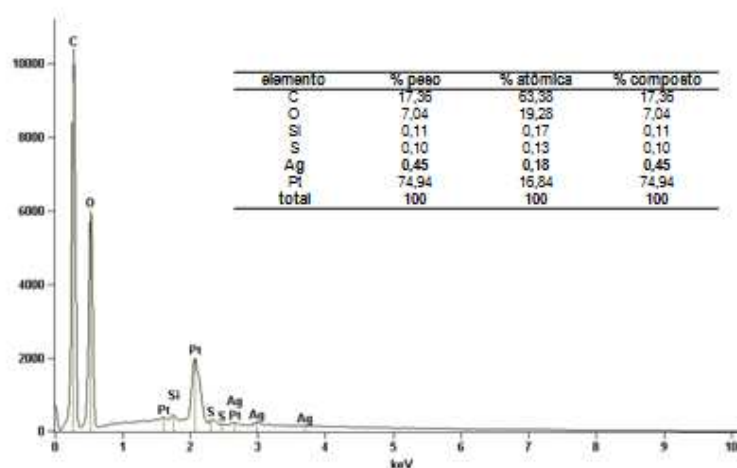


Figura 49. (a) Micrografias das fibras de algodão impregnadas com AgNPs sem lavagem.
(b) Espectro EDS do tecido de algodão impregnado.

Sendo assim, o método *padding* se mostrou satisfatório, uma vez que a impregnação se deu de maneira homogênea, além da eficiente adsorção das nanopartículas de prata nas fibras do tecido.

4.3.2 Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados

Como mencionado no procedimento experimental, após cada ciclo de lavagem e secagem à temperatura ambiente, amostras de 1,0 x 1,0 cm de tecido foram coletadas para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana (em duplicata sem erro nas medidas do halo). Como mostrado nas análises por ICP e XRF, conforme os tecidos foram submetidos a lavagens, a quantidade de prata impregnada diminuiu (Figuras 44 e 45). Porém, apesar deste comportamento, mesmo os tecidos com baixas quantidades de AgNPs (em torno de 2,0%) apresentaram atividade antimicrobiana contra os fungos *C. albicans* e *C. parapsilosis*, e contra a bactéria *Xac*, como mostrado a seguir.

Todos os tecidos impregnados apresentaram halo de inibição contra todos os micro-organismos testados, como mostrado na Figura 50 e Tabela 11.

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados com AgNPs para cada ciclo de lavagem

Ciclo de lavagem	*C _{AgNPs} / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Halo de inibição / mm		
		<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Xac</i>
Sem lavagem	27,9	11,0	16,0	11,0
1	12,8	11,0	16,0	12,0
2	5,7	11,0	13,0	11,0
3	3,5	11,0	11,0	11,0
4	4,6	10,0	10,0	11,0
5	2,3	10,0	10,0	11,0
6	2,7	10,0	10,0	11,0
7	2,6	10,0	10,0	12,0
8	2,1	10,0	10,0	12,0
9	2,5	10,0	10,0	12,0
10	1,9	10,0	10,0	12,0

* Concentração determinada por XRF.

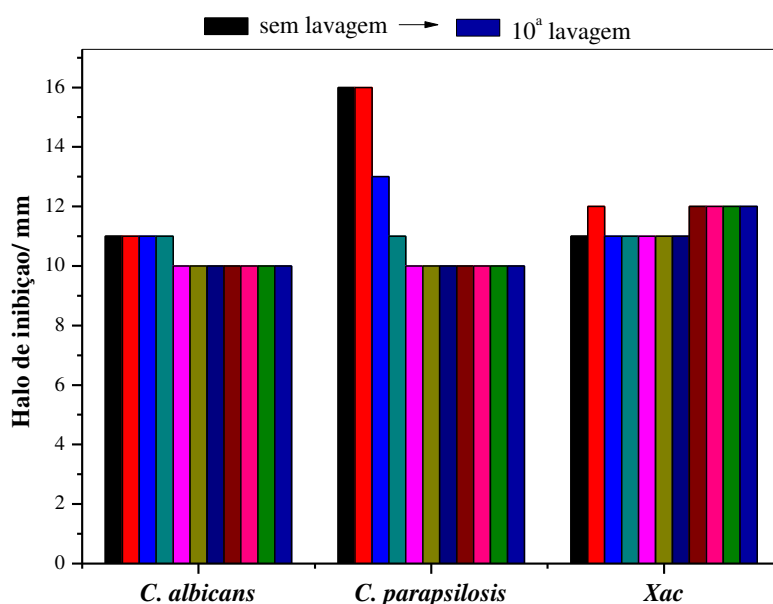


Figura 50. Atividade antimicrobiana dos tecidos de algodão impregnados e submetidos à ciclos de lavagem contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Xac*.

A atividade antimicrobiana foi observada após todos os ciclos de lavagem, porém o halo foi mais pronunciado até o 4º ciclo de lavagem, demonstrando que, mesmo após o tecido ser submetido à uma lavagem mecânica, as nanopartículas permaneceram aderidas às fibras do tecido. Torna-se necessário mencionar que o tecido de algodão sem impregnação (amostra controle) também foi testado contra os três micro-organismos, não apresentando halo de inibição (halo = 0,0 mm). Como já mencionado, esta eficiente adesão se deve, possivelmente, as proteínas existentes ao redor das nanopartículas de prata. A Figura 50 mostra que, dos micro-organismos testados, a *C. parapsilosis* se mostrou mais sensível às AgNPs, apresentando um máximo de halo de inibição (16 mm). A *C. albicans* e a *Xac* apresentaram halo de inibição em torno de 11 mm independente dos ciclos de lavagem.

4.4 Conclusões

Neste capítulo, a atividade antimicrobiana de tecidos de algodão impregnados com AgNPs biossinteticamente produzidas foi comprovada. Os tecidos impregnados apresentaram atividade pronunciada contra uma espécie de bactéria, a *Xac.* e duas espécies de leveduras, a *C. albicans* e a *C. parapsilosis*.

Os resultados obtidos são de extrema importância, uma vez que a *Xac* é a causadora do cancro cítrico, doença grave que acomete fortemente a citricultura brasileira, provocando lesões nas folhas, frutos e ramos, levando, conseqüentemente, a queda das folhas, frutos e produção. e as Cândidas são as grandes responsáveis por infecções hospitalares generalizadas, especialmente em pacientes com a saúde debilitada e

O método *padding* mostrou-se eficiente na impregnação das nanopartículas, com cerca de 40% de prata impregnada. Mesmo após serem submetidos à lavagem e a vários ciclos de lavagem (10), as AgNPs permaneceram aderidas às fibras do tecido e, apesar da concentração de AgNPs ter diminuído aproximadamente 15 vezes, a atividade antimicrobiana foi mantida, demonstrando a alta eficiência das AgNPs e o caminho promissor deste nanomaterial no combate antimicrobiano.

Capítulo 5. Conclusões Gerais e Propostas Futuras

5.1 Conclusões gerais

A presente tese envolveu a produção de nanopartículas de prata utilizando micro-organismos adequados para um processo biotecnologicamente viável (fungo *Fusarium oxysporum*). Neste trabalho foi realizada a caracterização das nanopartículas de prata quanto ao diâmetro e à morfologia por técnicas microscópicas; potencial zeta por espalhamento de luz dinâmica; o estudo das proteínas e dos peptídeos envolvidos na síntese e na estabilização das nanopartículas de prata por técnicas de dicroísmo circular, fluorescência, espectrometria de massas e eletroforese em gel; o estudo e a caracterização da adesão/incorporação das nanopartículas de prata em tecidos de algodão; além do estudo da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata e dos tecidos impregnados frente a diferentes espécies de bactérias e de fungos (leveduras) patogênicos.

Nanopartículas de prata biogênicas, esféricas e relativamente homogêneas, com diâmetro médio de aproximadamente 28 nm (medidos por TEM), foram produzidas em 168 h de reação, sendo estáveis por 4 meses (período em que foram acompanhadas) devido à capa proteica circundante, como confirmado por UV-Vis e TEM, por exemplo.

Por XPS foi possível entender a composição superficial das AgNPs. Com deconvoluções apropriadas, os espectros revelaram componentes referentes à presença de proteínas (no caso de C, O, N e S) e componentes relacionadas à prata (espectro Ag 3d) em seu estado de oxidação zero (prata metálica), comprovando a formação das AgNPs. Além disso, uma pequena quantidade de óxido de prata também foi observada, o que era esperado, uma vez que as nanopartículas não foram sintetizadas sob atmosfera inerte. Apesar

dos resultados obtidos por XPS, não foi possível determinar os grupos funcionais proteicos envolvidas na estabilização nas AgNPs.

Análises por XRD permitiram a determinação da cristalinidade das AgNPs sintetizadas. O padrão de difração obtido pôde inferir a existência de nanopartículas cúbicas de face centrada, em concordância com trabalhos encontrados na literatura. Além disso, como nas análises por XPS, a presença de óxido de prata também foi evidenciada por esta técnica.

A presença de proteínas e peptídeos que envolvem as nanopartículas e proporcionam sua alta estabilidade é descrita na literatura, porém, a caracterização destas biomoléculas não é comumente realizada. Deste modo, as proteínas secretadas pelo *F. oxysporum* foram estudadas e caracterizadas por variadas técnicas.

Por FTIR e Raman, ficou evidenciada a presença destas macromoléculas nas amostras de Filtrado Fúngico (FF) e nas AgNPs. Ainda por espectroscopia Raman, espectros SERS obtidos no acompanhamento da formação das nanopartículas mostraram mudanças na intensidade das bandas Ag-N (240 cm^{-1}) e Ag-S (233 cm^{-1}), sugerindo o envolvimento de resíduos de cisteína, aminas livres e amidas na formação das AgNPs. Além disso, os espectros obtidos por fluorescência de emissão, com excitação em 280 nm, forneceram máximos de emissão em 370 nm (para FF), mostrando a existência de resíduos de aminoácidos aromáticos nas proteínas e, no caso das amostras de AgNPs, máximos de emissão em 361 nm e picos adicionais em 422 e 489 nm (presença de pequenos *clusters* envolvendo alguns átomos de prata, que se adsorvem na superfície das nanopartículas). Um deslocamento no máximo de emissão e uma diminuição na intensidade da fluorescência, fenômeno denominado *quenching*, indicaram a interação das proteínas com a superfície das nanopartículas.

Outra técnica utilizada na caracterização das proteínas foi o dicroísmo circular. As análises por esta técnica permitiram avaliar não somente a composição estrutural das proteínas presentes no FF, como também alterações conformacionais quando estas proteínas interagem com as AgNPs. Observou-se uma leve perda de estrutura secundária, uma vez que houveram mudanças nos conteúdos de estruturas em hélice α e randômica (*random coil*). Além disso, as proteínas (de peso entre 14,8 e 85,9 kDa, em concordância com a eletroforese em gel) também foram identificadas por espectrometria de massas, onde, dentre as várias proteínas, uma desidrogenase (desidrogenase quinona NADP(H) dependente) foi identificada e se destacou por participar como catalisador em reações de redução de quinonas, podendo estar envolvida na síntese das nanopartículas, em concordância com mecanismos propostos por alguns grupos de pesquisa.

As nanopartículas de prata biossinteticamente produzidas apresentaram efeito antimicrobiano frente à diferentes micro-organismos de maneira eficiente, com valores de MIC baixos, da ordem de $\mu\text{g mL}^{-1}$. Quando pré-tratadas (AgNPs_{lavada}), estas apresentaram efeito tóxico mais pronunciado, devido a menor concentração de agente estabilizante ao redor da partícula e consequente liberação de maior quantidade de íons Ag^+ . Os testes de atividade fungicida e bactericida mostraram que em determinadas concentrações as AgNPs possuem a capacidade de inibir o crescimento dos patógenos estudados. Por outro lado, em concentrações mais altas, as nanopartículas de prata foram capazes de provocar a morte os micro-organismos, mostrando o caminho promissor no emprego deste nanomaterial no combate antimicrobiano. A *Candida parapsilosis*, o *Fusarium oxysporum* e a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram caracterizadas morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura na presença e na ausência de

nanopartículas de prata, as quais apresentaram efeito sob a membrana da *C. parapsilosis* e da *Xac*.

A partir dos estudos de toxicidade, pode-se concluir que as AgNPs_{não lavada} possuem um maior efeito citotóxico para fibroblastos da linhagem 3T3 e linfócitos quando comparadas com AgNPs_{lavada}, provavelmente devido à diferenças na capa envoltória. O valor de IC₅₀ ao redor de 40 µg mL⁻¹ indica que estudos envolvendo concentrações de AgNPs inferiores a este valor podem ser considerados seguros em termos de citotoxicidade para as linhagens celulares estudadas. Também para estes tipos celulares, as AgNPs_{não lavada} causaram mais danos ao DNA quando comparadas com as AgNPs_{lavada} sendo, consideradas, portanto, genotóxicas. O mesmo comportamento foi observado para os estudos de genotoxicidade em células vegetais (*Allium cepa*), porém, para esta mesma linhagem celular, ambas as amostras de nanopartícula não apresentaram efeito citotóxico, uma vez que não alteraram significativamente os índices mitóticos.

A atividade antimicrobiana de tecidos de algodão impregnados com AgNPs biossinteticamente produzidas foi comprovada. O método *padding* mostrou-se eficiente na impregnação das nanopartículas, com cerca de 40% de prata impregnada e demonstrando que, mesmo após serem submetidos à lavagem enérgica e a vários ciclos de lavagem (10), as AgNPs permaneceram aderidas às fibras do tecido e apresentaram atividade antimicrobiana pronunciada contra uma espécie de bactéria, a *Xac* e duas espécies de leveduras, a *C. albicans* e a *C. parapsilosis*.

Os resultados obtidos neste trabalho foram muito relevantes, uma vez que a *Xac* é a causadora do cancro cítrico, doença grave que acomete fortemente a citricultura brasileira e as espécies de *Cândida* são as grandes

responsáveis por infecções hospitalares generalizadas, especialmente em pacientes com a saúde debilitada.

5.2 Propostas futuras

- ✓ Estudo da toxicidade das AgNPs em células epiteliais, uma vez que estas nanopartículas foram impregnadas com sucesso em tecidos de algodão, os quais ficarão em contato direto com a pele humana, por exemplo.
- ✓ Separação das proteínas presentes no Filtrado Fúngico por FPLC pela filtração em gel e, em seguida, produzir AgNPs utilizando proteínas de diferentes faixas de tamanho, para um melhor entendimento de quais proteínas estão efetivamente envolvidas na síntese destas partículas.

Capítulo 6. Referências

Abdolvand, A. (2006). *Modification of optical and structural properties of glass containing silver nanoparticles via DC electric field and moderately elevated temperatures*. 2006. 105f. Tese (Doutorado). ULB Saschen-Anhalt. Alemanha.

Aebersold, R.; Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.

Agnihotri, M.; Joshi, S.; Kumar, A. R.; Zinjarde, S.; Kulkarni, S. (2009). Biosynthesis of gold nanoparticles by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Materials Letters* 63, 1231–1234.

Ahmad, A.; Murherjee, P.; Senapati, S.; Mandal, D.; Khan, M. I.; Kumar, R.; Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 28, 313-318.

Ahmad, A.; Senapati, S.; Khan, M. I.; Kumar, R.; Sastry, M. Biosynthesis of silver nanoparticles using fungi. In: Ganguli, B. N.; Deshmukh, S. K. (Ed(s)). *Fungi: Multifaceted Microbes*. Boca Raton/EUA, CRC Press, 2006, 291-303.

Amaladhas, T. P.; Sivagami, S.; Devi, T. A.; Ananthi, N.; Velammal, S. P. (2012). Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Cassia angustifolia*. *Advanced Nature Science: Nanoscience and Nanotechnology* 3, 045006-0450013.

Anderson, T. F. (1951). Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Transactions of the New York Academy of Sciences* 13, 130-134.

Angelescu, D. G.; Vasilescu, M.; Somoghi, R.; Donescu, D.; Teodorescu, V. S. (2010). Kinetics and optical properties of the silver nanoparticles in aqueous L64 block copolymer solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 366, 155–162.

Asharani, P. V.; Wu, Y. L.; Gong, Z.; Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19, 255102-255110.

Aymonier, C.; Schlotterbeck, U.; Antonietti, L.; Zacharias, P.; Thomann, R.; Tiller, J. C.; Mecking, S. (2002). Hybrids of silver nanoparticles with amphiphilic hyperbranched macromolecules exhibiting antimicrobial properties. *Chemical Communications* 24, 3018-3019.

Baker, C. C.; Pradhan, A.; Shah, S. I. Metal nanoparticles. In: Nalwa, H. S. (Ed). *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, 2004. 449-473.

Baker, C.; Pradhan, A.; Pakstis, L.; Pochan, D. J.; Shah, S. I. (2005). Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal for Nanoscience and Nanotechnology* 5, 244-249.

Baker, R. A.; Tatum, J. H. (1998). Novel anthraquinones from stationary cultures of

Fusarium oxysporum. Journal of Fermentation and Bioengineering 85, 359-361.

Ballottin, D.; Rodrigues, A. G.; de Souza, A. O.; Marcato, P. D.; Durán, N.; Alves, O. L.; Gomes, A.; Gozzo, F. C.; Tasic, L. (2014). Biogenic nanosilver capping proteins: *Aspergillus tubingensis* versus *Fusarium oxysporum*. Nanoscale (submitted), DOI: 10.1039.

Bankura, K. P.; Maity, D.; Mollick, M. M. R.; Mondal, D.; Bhowmick, B.; Bain, M. K.; Chakraborty, A.; Sarkar, J.; Acharya, K.; Chattopadhyay, D. (2012). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. Carbohydrate Polymers 89, 1159-1165.

Barsotti Jr., R. J.; O'Connell, M. S.; Stellacci, F. (2004). Morphology control in self-assembled monolayers written by dip pen nanolithography. Langmuir 20, 4795-4798.

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. Biochimica and Biophysica Acta 1767, 1073-1101.

Barwal, I.; Ranjan, P.; Kateriya, S.; Yadav, S. C. (2011). Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. Journal of Nanobiotechnology 9, 56-68.

Bell, A. A.; Wheeler, M. H.; Liu, J.; Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S.; Orta, H. (2003). United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum*: potential targets for disease control. Pest Management Science 59, 736-747.

Bhainsa, K. C.; D'Sousa, S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigates*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 47, 160-164.

Borges, W. S.; Pupo, M. T. (2006). Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). Journal of Brazilian Chemical Society 17, 929-934.

Borkow, G.; Gabbay, J. (2007). Biocidal textiles can help fight nosocomial infections. Medical Hypotheses 70, 990-994.

Borm, P. J.; Kreyling, W. (2004). Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 4, 521-531.

Bosetti, M.; Massè, A.; Tobin, E.; Cannas, M. (2002). Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. Biomaterials 23, 887-897.

Boumans, P.; Klockenkamper, R. (1989). Total reflection X-ray fluorescence spectrometry. Proc. of the Second Workshop on TXRF, Dortmund, 26-27 May. Spectrochimica Acta 44B, 433-435.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Braga, P. C.; Ricci, D. (2004). *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281, 2013-2016.

Bussmann, R. W.; Bussmann, R. W.; Malca-García, G.; Glenn, A.; Sharon D.; Chait, G.; Díaz, D.; Pourmand, K.; Jonat, B.; Somogy, S.; Guardado, G.; Aguirre, C.; Chan, R.; Meyer, K.; Kuhlman, A.; Townesmith, A.; Effio-Carbajal, J.; Frías-Fernandez, F.; Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 132, 101–108.

Camusso, L.; Bortone, S. (1991). *Ceramics of the world: from 4000 b.c. to the present*. New York: Harry N. Abrams, 1991. 399p.

Castro-Longoria, E.; Vilchis-Nestor, A. R.; Avalos-Borjac, M. (2011). Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83, 42–48.

Chadeau, E.; Oulahal, N.; Dubost, L.; Favergeon, F.; Degraeve, P. (2010). Anti-listeria activity of silver functionalised textile prepared with plasma technology. *Food control* 21, 505-512.

Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology* 28, 580-588.

Chen, D. H.; Chen, C. J. (2002). Formation and characterization of Au–Ag bimetallic nanoparticles in water-oil microemulsions. *Journal of Materials Chemistry* 12, 1557–1562.

Chowdhury, J.; Ghosh, M. (2004). Concentration dependent surface enhanced Raman scattering of 2-benzoylpyridine adsorbed on colloidal silver particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 277, 121–127.

Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B. J.; Claeysens, M.; Bhat, M. K. (1995). Purification and mode of action of a low molecular mass endo-1,3-β-D-glucanase from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biotechnology* 39, 85-93.

Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B.; Claeysens, M.; Bhat, M. K. (1996). Purification and characterisation of a major xylanase with cellulase and transferase activities from *Fusarium oxysporum*. *Carbohydrate Research* 289, 91-104.

Christakopoulos, P.; Nerinckx, W.; Kekos, D.; Macris, B.; Claeysens, M. (1997). The alkaline xylanase III from *Fusarium oxysporum* F3 belongs to family F/10. *Carbohydrate Research* 302, 191-195.

Chung, Y. C.; Chen, I. H.; Chen, C. J. (2008). The surface modification of silver nanoparticles by phosphoryl disulfides for improved biocompatibility and intracellular uptake. *Biomaterials* 29, 1807-1816.

Clothier, R.; Gottshalg, E.; Casati, S.; Balls, M. (2006). The FRAME alternatives laboratory database. 1. In vitro basal cytotoxicity determined by the kenacid blue total protein assay. *Institute for Health and Consumer Protection* 34, 151-175.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Norma M7-A6. *Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada*. 6ª Ed. Pennsylvania/EUA: Edição Wayne 23 (2), 81.

Costa, P.; Pionneau, C.; Bauw, G.; Dubos, C.; Bahrmann, N.; Kremer, A.; Frigerio, J.; Plomion, C. (1999). Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. *Electrophoresis* 20, 1098-1108.

Creighton, J. A.; Eadon, D. G. (1991). Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 87, 3881-3891.

da Silva, B. F.; Pérez, S.; Gardinalli, P.; Singhal, R. K.; Mozeto, A. A.; Barceló, D. (2011). Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments. *Trends in Analytical Chemistry* 30, 428-540.

da Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422p.

Daniel, M. C.; Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews* 104, 293-346.

Dawson, K. A.; Linse, S.; Lynch, I. (2007). Water as a mediator of protein-nanoparticle interactions: entropy driven protein binding as a paradigm for protein therapeutics in the Biopharma industry? *E-nano newsletter* 10, 23-34.

Dibrov, P.; Dzioba, J.; Gosink, K. K.; Häse, C. C. (2002). Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 2668-2670.

Dollish, F. R. *Characteristic Raman frequencies of organic compounds*. New York: Wiley & Sons, 1974 443p.

Dougherty, G. M.; Rose, K. A.; Tok, J. B. H.; Pannu, S. S.; Chuang, F. Y. S.; Sha, M. Y.; Chakarova, G.; Penn, S. G. (2008). The zeta potential of surface-functionalized metallic nanorod particles in aqueous solution. *Electrophoresis* 29, 1131-1139.

Dragieva, I.; Stoeva, S.; Stoimenov, P.; Pavlikianov, E.; Klabunde, K. (1999). Complex formation in solutions for chemical synthesis of nanoscaled particles prepared by borohydride reduction process. *Nanostructured Materials* 12, 267-270.

- Dubas, S. T.; Wacharanad, S.; Potiyaraj, P. (2011). Tuning of the antimicrobial activity of surgical sutures coated with silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects* 380, 25-28.
- Dubey, S. P.; Lahtinen, M.; Sillanpää, M. (2010). Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 364, 34-41.
- Durán N.; Teixeira, M. F. S.; De Conti, R., Espósito, E. (2002). Ecological-friendly pigments from fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42, 53-66.
- Durán, N., Marcato, P. D.; Alves, O. L.; de Souza, G. I. H.; Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology* 3, 1-7.
- Durán, N., Marcato, P. D.; de Souza, G. I. H.; Alves, O. L.; Esposito, E. (2007). Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 3, 203-208.
- Durán, N.; Marcato, P. D.; de Conti, R.; Alves, O. L.; Costa, F. T. M.; Brocchi, M. (2010). Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21, 949-959.
- Durán, N.; Marcato, P. D.; Ingle, A.; Gade, A.; Rai, M. (2009). Fungi-mediated synthesis of silver nanoparticles: characterization processes and applications. *Progress in Mycology* 16, 420-443.
- Durán, N.; Mattoso, L. H. C.; de Moraes, P. C. (2006). *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. Ed. Antenna, 2006. 208p.
- Durán, N.; Guterres, S. S.; Alves, O. L. (2014). *Nanotoxicology: Materials, Methodologies, and Assessments*. New York: Springer, 2014. 411p.
- Edwards, P. P.; Thomas, J. M. (2007). Gold in a metallic divided state-from faraday to present-day nanoscience. *Angewandte Chemie-International Edition* 46, 5480 - 5486.
- Eftink, M. R.; Ghiron, C. A. (1981). Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry* 114, 199-227.
- El-Rafie, M. H.; Mohamed, A. A.; Shaheen, Th. I.; Hebeish, A. (2010). Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers* 80, 779-782.
- Evanoff, D. D.; Chumanov, G. (2005). Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *Chemphyschem* 6, 1221-1231.

Faghihian, H.; Kamali, M. (2003). Synthesis of Na-P-c zeolite from perlite and study of its ability to remove cyanide from liquid wastes. *International Journal of Environment and Pollution* 19, 557-566.

Fairbairn D. W.; Olive P. L.; O'Neill K. L. (1995). The Comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339, 37-59.

Fayaz, A. M.; Girilal, M.; Rahman, M.; Venkatesan, R.; Kalaichelvan, P. T. (2011). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Process Biochemistry* 46, 1958–1962.

Feng, Q. L.; Chen, G. Q.; Cui, F. Z.; Kim, T. N.; Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* 52, 662–668.

Freshney, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. New York: Wiley & Sons, 1994. 1170p.

Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C. (2007). The Lycurgus cup A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin* 40, 270-277.

Friedbacher, G.; Fuchs, H. (1999). Classification of scanning probe microscopies. *Pure and Applied Chemistry* 71, 1337-1357.

Gade, A.; Bonde, P.; Ingle, A. P.; Marcato, P. D.; Durán, N.; Rai, M. K. (2008). Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Biobased materials and Bioenergy* 2, 243-247.

Gadegaard, N. (2006). Atomic force microscopy in biology: technology and techniques. *Biotechnic & Histochemistry* 81, 87-97.

Gaiser, B. K.; Fernandes, T. F.; Jepson, M. A.; Lead, J. R.; Tyler, C. R.; Baalousha, M.; Biswas, A.; Britton, G. J.; Cole, P. A.; Johnston, B. D.; Ju-Nam, Y.; Rosenkranz, P.; Scown, T. M.; Stone V. (2012). Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 144-154.

Gao, Y.; Cranston, R. (2008). Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Textile Research Journal* 78, 60- 72.

Ge, H. M.; Song, Y. C.; Shan, C. Y.; Ye, Y. H.; Tan, R. X. (2005). New and cytotoxic anthraquinones from *Pleospora* sp. IFB-E006, an endophytic fungus in *Imperata cylindrical*. *Planta Medica* 71, 1063-1065.

Georgiou, D. C.; Grintzalis, K.; Zervoudakis, G.; Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 391-403.

- Geranio, L.; Heuberger, M.; Nowack, B. (2009). The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environmental Science Technology* 43, 8113-8118.
- Gericke, M.; Pinches, A. (2006). Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy* 83, 132-140.
- Geromanos, S. J.; Vissers, J. P. C.; Silva, K. C.; Dorschel, C. A.; Li, G. Z.; Gorenstein, M. V.; Bateman, R. H.; Langridge, J. I. (2009). The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependent LC-MS/MS. *Proteomics* 9, 1683-1695.
- Geurtsen, W.; Lehmann, F.; Spahl, W.; Leyhausen, G. (1998). Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *Journal of Biomedical Materials Research* 41, 474-480.
- Gibbins, B.; Warner L. (2005). The role of antimicrobial silver nanotechnology. *Medical Device & Diagnostics Industry* 112-116.
- Glomm, W. R. (2005). Functionalized gold nanoparticles for applications in bionanotechnology. *Journal of Dispersion Science and Technology* 26, 389-414.
- Gole, A.; Dash, C.; Ramakrishnan, V.; Sainkar, S. R.; Mandale, A. B.; Rao, M.; Sastry, M. (2001). Pepsin-gold colloid conjugates: preparation, characterization, and enzymatic activity. *Langmuir* 17, 1674-1679. (e referências do artigo).
- Golubovich, V. N.; Rabotnova, I. L. (1974). Kinetics of growth inhibition by silver ions. *Microbiology* 43, 948-950.
- Gomes, I. Interação de proteínas com superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres. 2009. 202f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2009.
- Gómez, L. A.; de Araújo, C. B.; Brito-Silva, A. M.; Galembeck, A. (2008). Solvent effects on the linear and nonlinear optical response of silver nanoparticles. *Applied Physics B* 92, 61-66.
- Gopinath, V.; Mubarak, A. D.; Priyadarshini, S.; Priyadharsshini, N. M.; Thajuddin, N.; Velusamy, P. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: A novel biological approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 96, 69-74.
- Gopinath, V.; Velusamy, P. (2013). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus sp.* GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum*. *Spectrochimica Acta, Part A* 106, 170-174.
- Govindaraju, K.; Tamilselvan, S.; Kiruthiga, V.; Singaravelu, G. (2010). Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *Journal of Biopesticides* 3, 394 - 399.

Guggenbichler, J. P.; Böswald, M.; Lugauer, S.; Krall, T. (1999). A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. *Infection* 27, Suppl. 1, S16-S23.

Gulrajani, M. L.; Guota, D.; Periyasamy, S.; Muthu, S. G. (2007). Preparation and application of silver nanoparticles on silk for imparting antimicrobial properties. *Journal of Applied Polymer Science* 108, 614-623.

Gurunathan, S.; Kalishwaralal, K.; Vaidyanathan, R.; Deepak, V.; Pandian, S. R. K.; Muniyandi, J.; Hariharan, N.; Eom, S. H. (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli* Colloids Surf. B 74, 328-335.

Guzmán, M. G.; Dille, J.; Godet, S. (2009). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction methos and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering* 2, 104-111.

Hamouda, T.; Myc, A.; Donovan, B.; Shih, A. Y.; Reuter, J. D.; Baker, J. R. (2000). Novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiological Research* 156, 1 – 7.

Harding, S. E.; Chowdhry, B. *Protein-Ligand Interactions: structure and spectroscopy*. New York: Oxford University Press Inc. 2001. 268p.

Hegemann, D.; Hossain, M. M.; Balazs, D. J. (2007). Nanostructured plasma coatings to obtain multifunctional textile surfaces. *Progress in Organic Coatings* 58, 237-240.

Herrera, M.; Carrión, P.; Baca, P.; Liébana, J.; Castillo, A. (2001). In vitro antibacterial activity of glass-ionomer cements. *Micronios* 104, 141-148.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em Outubro de 2013.

<http://www.fda.gov>. Acesso em Março de 2014.

<http://www.jeol.com>. Acesso em Janeiro de 2014.

<http://www.malvern.co.uk>. Technical note, Malvern Instruments. Acesso em Janeiro de 2014.

<http://www.matrixscience.com>. acesso em Novembro de 2013.

<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/N/Sequencing%20Grade%20Modified%20Trypsin%20Protocol.ashx>. Acesso em Novembro de 2012.

Huang, G. G.; Han, X. X.; Hossain, M. K.; Ozaki, Y. (2009). Development of a heat-Induced surface-enhanced raman scattering sensing method for rapid detection of glutathione in aqueous solutions. *Analytical Chemistry* 81, 5881-5888.

Huang, Y.; Huang, K.; Chang, H. (2006). Synthesis and characterization of Au core-Au-Ag shell nanoparticles from gold seeds: impacts of glycine concentration and pH. *Journal of Colloid and Interface Science* 301, 145–154.

Hunter, E.; Fendler, J. H. (2004). Exploitation of localized surface *Plasmon* resonance. *Advanced Materials* 16, 1685-1706.

IAEA. Viena Internacional Atomic Energy Agency. 1970, Viena. Radioisotope X-ray fluorescence spectrometry: Technical Reports series n° 115, 1970. 102 p.

Ilic, V.; Saponjic, Z.; Vodnik, V.; Potkonjak, B.; Jovancic, P.; Nedeljkovic, J.; Radetic, M. (2009). The influence of silver content on antimicrobial activity and color of cotton fabrics functionalized with Ag nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 78, 564–569.

Ingle, A.; Gade, A.; Pierrat, S.; Sonnichsen, C.; Rai, M. (2008). Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Current Nanoscience* 4, 141-144.

Ingle, A.; Rai, M.; Gade, A.; Bawaskar, M. (2009). *Fusarium solani*: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 2079-2085.

Jain, N.; Bhargava, A.; Majumdar, S.; Tarafdar, J. C.; Panwar, J. (2011). Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NPJ08: A mechanism perspective. *Nanoscale* 3, 635-641. Jani, P.; Halbert, G. W.; Langridge, J.; Florence, A. T. (1990). Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 42, 821–826.

Jeon, H. J.; Yi, S. C.; Oh, S. G. (2003). Preparation and antibacterial effects of Ag–SiO₂ thin films by sol–gel method. *Biomaterials* 24, 4921-4928.

Joo, T. H.; Kim, M. S.; Kim, K. (1987). Surface-Enhanced Raman scattering of benzenethiol in silver sol. *Journal of Raman Spectroscopy* 18, 57-60.

Jun Sung Kim, D. V. M.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.; Kim, Y.; Lee, Y.; Jeong, D. H.; Cho, M. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3, 95-101.

Käkien, A.; Ding, F.; Chen, P.; Mortimer, M.; Kahru, A.; Ke, P. C. (2013). Interaction of firefly luciferase and silver nanoparticles and its impact on enzyme activity. *Nanotechnology* 24, 345101-345110.

Kamat, P. V. (2002). Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B* 106, 7729-7744.

Kathiresan, K.; Manivannan, S.; Nabeel, M. A.; Dhivya, B. (2009). Studies on silver

nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71, 133-137.

Khalil, N. M. (2013). Biogenic silver nanoparticles by *Aspergillus terreus* as a powerful nanoweapon against *Aspergillus fumigatus*. *African Journal of Microbiology Research* 7, 5645-5651.

Keating, C. D., Kovaleski, K. K., Natan, M. J. (1998). Heightened electromagnetic fields between metal nanoparticles: surface enhanced raman scattering from metal–cytochrome c-metal sandwiches. *The Journal of Physical Chemistry* 102, 9414-9425.

Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B* 107, 668-677.

Kelly, S. M.; Price, N. C. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein and Peptide Science* 1, 349-386.

Khalil-Abad, M. S.; Yazdanshenas, M. E.; Nateghi, M. R. (2009). Effect of cationization on adsorption of silver nanoparticles on cotton surfaces and its antibacterial activity. *Cellulose* 16, 1147–1157.

Kim, D.; Jeong, S.; Moon, J. (2006). Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. *Nanotechnology* 17, 4019-4024.

Kim, J. S.; Sung, J. H.; Ji, J. H.; Lee, J. H.; Kang, C. S.; Yu, I. J. (2011). In vivo genotoxicity of silver nanoparticles after 90-day silver nanoparticle inhalation exposure. *Safety and Health Work* 2, 34-38.

Kittler, S.; Greulich, C.; Diendorf, J.; Köller, M.; Epple, M. (2010). Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials* 22, 4548–4554.

Klasen, H.J. (2000). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26, 117–130.

Kosmulski, M. *Surface charging and points of zero charge*. Boca Raton: CRC Press, 2009, 1092p.

Kostic, M.; Radic, N.; Obradovic, B.; Dimitrijevic, S.; Kuraica, M.; Skundric, P. (2008). Antimicrobial textile prepared by silver deposition on dielectric barrier discharge treated cotton/polyester fabric. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 14, 219-221.

Kouvaris, P.; Delimitis, A.; Zaspalis, V.; Papadopoulos, D.; Tsipas, S. A.; Michailidis, N. (2012). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus Unedo* leaf extract. *Materials Letters* 76, 18-20.

Kowshik, M.; Ashtaputre, S.; Kharrazi, S.; Vogel, W.; Urban, J.; Kulkarni, S. K.; Paknikar, K. M. (2003). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology* 14, 95–100.

Kreilgaard, M. (2002). Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, S77–S98.

Krolikowska, A.; Kudelski, A.; Michota, A.; Bukowska J. (2003). SERS studies on the structure of thioglycolic acid monolayers on silver and gold. *Surface Science* 532, 227–232.

Kumar, R.; Howdle, S.; Münstedt, H. (2005). Polyamide/silver antimicrobials: effect of filler types on the silver ion release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 75B, 311-319.

Kumar, R.; Roopan, S. M.; Prabhakarn, A.; Khanna, V. G.; Chakroborty, S. (2012). Agricultural waste *Annona squamosa* peel extract: Biosynthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A* 90, 173–176.

Kumar, S. A.; Abyaneh, M. K.; Gosa, V. I. S.W.; Kulkarni, S. K.; Pasricha, R.; Ahmad, A.; Khan, M. I. (2007). Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. *Biotechnology Letters* 29, 439- 445.

Kvítek, L.; Panáček, A.; Soukupová, J.; Kolár, M.; Vecerová, R.; Pucek, R.; Holecová, M.; Zboril, R. (2008). Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C* 112, 5825–5834.

Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer Science, 2006. 954p.

Lee, H. J.; Yeo, S. Y.; Jeong, S. H. (2003). Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. *Journal of Materials Science* 38, 2199-2204.

Lengke, M. F.; Fleet, M. E.; Southam, G. (2007). Synthesis of palladium nanoparticles by reaction of filamentous cyanobacterial biomass with a palladium(II) chloride complex. *Langmuir* 23, 8982-8987.

Li, S.; Shen, Y.; Xie, A.; Yu, X.; Qiu, L.; Zhang, L.; Zhang, Q. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chemistry* 9, 852–858.

Liang-Hong, F.; Yong-Xiao, G.; Yuan-Zeng, Z.; Min-Jiao, M. (2010). Study on the crystalline structure and the thermal stability of silver-oxide films deposited by using direct-current reactive magnetron sputtering methods. *Journal of the Korean Physical Society* 56, 1176-1179.

Liau, S. Y.; Read, D. C.; Pugh, W. J.; Furr, J. R.; Russell, A. D. (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology* 25, 279-283.

- Lima R.; Seabra, A. B.; Durán, N. (2012). Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology* 32, 867-897.
- Lima, R.; Feitosa, L. O.; Ballottin, D.; Marcato, P. D.; Tasic, L.; Durán, N. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of biogenic silver nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series* 429, 012020-012029.
- Lok, C. N.; Ho, C. M.; Chen, R.; He, Q. Y.; Yu, W. Y.; Sun, H.; Tam, P. K.; Chiu, J. F.; Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12, 527–534.
- Lorenz, C.; Windler, L.; von Goetz, N.; Lehmann, R. P.; Schuppler, M.; Hungerbühler, K.; Heuberger, M.; Nowack, B. (2012). Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. *Chemosphere* 89, 817-824.
- Maali, A.; Cardinal, T.; Treguer-Delapierre, M. (2003). Intrinsic fluorescence from individual silver nanoparticles. *Physica E: Low-dimensional System and Nanostructures* 17, 559–560.
- Macdonald, I. D. G.; Smith, W. E. (1996). Orientation of cytochrome c adsorbed on a citrate-reduced silver colloid surface. *Langmuir* 12, 706-713.
- Madras, G.; McCoy, B. J. (2001). Distribution kinetics theory of Ostwald ripening. *Journal of Chemical Physics* 115, 14-22.
- Magudapatty, G.; Gangopadhyayans, P.; Panigrahi, B. K.; Nair, K. G. M.; Dhara, S. (2001). Electrical transport studies of Ag nanoclusters embedded in glass matrix. *Physica B: Condensed Matter* 299, 142–146.
- Mandal, D.; Bolander, M.E.; Mukhopadhyay, D.; Sarkar, G.; Mukherjee, P. (2006). The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied Microbiology Biotechnology* 69, 485-492.
- Mandal, S.; Phadtare, S.; Sastry, M. (2005). Interfacing biology nanoparticles. *Current Applied Physics* 5, 118-127.
- Mann, M.; Kelleher, N. L. (2008). Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18132-18138.
- Marcato, P. D.; Nakasato, G.; Brocchi, M.; Melo, P. S.; Huber, S. C.; Ferreira, I. R.; Alves, O. L.; Durán, N. (2012) Biogenic silver nanoparticles: antibacterial and cytotoxicity applied to textile fabrics. *Journal of Nano Research*, 20, 69-76.
- Marinho, A. M. R.; Rodrigues-Fo, E.; Moitinho, M. L. R.; Santos, L. S. (2005). Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical*

Society 16, 280-283.

Markarian, J. (2006). Steady growth predicted for biocides. *Plastic, Additives and Compoundings* 8, 30-33.

Matei, A.; Cernica, I.; Cadar, O.; Roman, C.; Schiopu, V. (2008). Synthesis and characterization of ZnO-polymer nanocomposites. *International Journal of Material Forming* 1, 767-770.

Maxit, B. (2010). Particle size measurements of dark and concentrated dispersions by dynamic light scattering. Disponível em: <<http://www.labmate-online.com>>. Acesso em Dezembro de 2013.

McCormack, A. L.; Schieltz, D. M.; Goode, B.; Yang, S.; Barnes, G.; Drubin, D.; Yates, J. R. (1997). Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Analitical Chemistry* 69, 767-776.

Mie, G. (1908). BeitrÄage zur optik trÄuber medien, speziell kolloidaler metallÄosungen. *Annalen der Physik* 25, 377-445.

Miller, J. C.; Serrato, R.; Represas-Cardenas, J. M.; Kundahl, G. (2005). *The Handbook of nanotechnology, business, policy, and intellectual property law*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2005. 368p.

Miyama, T.; Yonezawa, Y. (2004). Aggregation of photolytic gold nanoparticles at the surface of chitosan films. *Langmuir* 20, 5918-5923.

Mock, J. J.; Barbic, M.; Smith, D. R.; Schlitz, S. (2002). Shape effects in *plasmon* resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *Journal of Chemical Physical* 116, 6755-6760.

Mohanpuria, P.; Rana, N. K.; Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research* 10, 507-517.

Mohanty, S.; Mishra, S.; Jena, P.; Jacob, B.; Sarkar, B.; Sonawane, A. (2011). An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, Biology, and medicine* 22, 916-924.

Monteiro, D. R.; Gorup, L. F.; Takamiya, A, S.; Ruvollo-Filho, A. C.; de Camargo, E. R.; Barbosa, D. B. (2009). The growing importance of materials that prevet microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal Antimicrobial Agents* 34, 103-110.

Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramírez, J. T.; Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346-2353.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.

Mukherjee, P.; Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar S, Khan M, Parishcha R, Ajaykumar P, Alam M, Kumar R, Sastry M (2001). "Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix; a novel biological approach to nanoparticle synthesis". *Nano Letters* 1 (10): 515–519

Mukherjee, P.; Roy, M.; Mandal, B. P.; Dey, G. K.; Mukherjee, P. K.; Ghatak, J.; Tyagi, A. K.; Kale, S. P. (2008). Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology* 19, 075103-075110.

Murugadoss, A.; Chattopadhyay, A. A. (2008). 'Green' chitosan-silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst. *Nanotechnology* 19, 1-9.

Nagarajan, P.; Rajagopalan, V. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Journal of Science and Technology of Advanced Materials* 9, 3–4.

Nair, P. M.; Park, S. Y.; Lee, S. W.; Choi, J. (2011). Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* 101, 31-37.

Naveen, H; Kumar, G; Karthik, L.; Roa, B. (2010). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Archives of Applied Science Research* 2, 161–167.

Newman, D. K.; Kolter, R. (2000). A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* 405, 94-97.

Oberdorster, G. (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *International Archives of Occupational Environmental Health* 74, 1–8.

Oberdorster, G.; Sharp, Z.; Atudorei, V.; Elder, A.; Gelein, R.; Lunts, A.; Kreyling, W.; Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 65, 1531–1543.

Oliveira, M. M. Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades. 2005. 174f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-Paraná. 2005.

Ordzhonikidze, C. G.; Ramaiyya, L. K.; Egorova, E. M.; Rubanovich, A. V. (2009). Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice *in vivo*. *Journal Acta Naturae (Russia)* 3, 99-101.

- Otari, S. V.; Patil, R. M.; Ghosh, S. J.; Pawar, S. H. (2014). Green phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Manilkara zapota* (L.) seeds and its inhibitory action against *Candida* species. *Materials Letters* 116, 367–369.
- Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. (2007). 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 Environment Microbiology* 73, 1712-1720.
- Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 2720-2722.
- Panáček, A.; Kolár, M.; Vecerová, R.; Pruček, R.; Soukupová, J.; Kryštof, V.; Hamal, P.; Zbořil, P.; Kvítek, L. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 30, 6333-6340.
- Panda, K. K.; Achary, V. M.; Krishnaveni, R.; Padhi, B. K.; Sarangi, S. N.; Sahu, S. N.; Panda, B. B. (2011). In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in vitro* 25, 1097-1105.
- Paper, J. M.; Scott-Craig, J. S.; Adhikari, N. D.; Cuomo, C. A.; Walton, J. D. (2007). Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics* 7, 3171-3183.
- Parikh, R.Y.; Singh, S.; Prasad, B.L.V.; Patole, M.S.; Sastry, M.; Shouche, Y.S. (2008). Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: Towards understanding biochemical synthesis mechanism. *ChemBioChem* 9, 1415-1422.
- Patakfalvi, R.; Dekany, I. (2005). Nucleation and growth of silver nanoparticles monitored by titration microcalorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 79, 587-594.
- Patakfalvi, R.; Virányi, Z.; Dékány, I. (2004). Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions. *Colloid and Polymer Science* 283, 299-305, 2004.
- Pathan, A. K.; Bond, J.; Gaskin, R. E. (2008). Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces—Horses for courses. *Micron* 39, 1049–1061.
- Peysers, L. A.; Vinson, A. E.; Bartko, A. P.; Dickson, R. M. (2001). Photoactivated fluorescence from individual silver nanoclusters. *Science* 291, 103-106.
- Perelshtein, I.; Applerot, G.; Perkas, N.; Guibert, G.; Mikhailov, S.; Gedanken, A. (2008). Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. *Nanotechnology* 19, 1-6.

- Pillai, Z. S.; Kamat, P. V. (2004). What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *Journal of Physical Chemistry B* 108, 945-951.
- Prakash, A.; Mallick, P.; Whiteaker, J.; Zhang, H.; Paulovich, A.; Flory, M.; Lee, H.; Aebersold, R.; Schwikowski, B. (2006). Signal maps for mass spectrometry-based comparative proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* 5, 423-432.
- Prasad, P. N. *Nanophotonics*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2004. 418p.
- Priyanka, G.; Pettee, B.; Britt, D. W.; Huang, W.; Johnson, W. P.; Anderson, A. J. (2009). Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Biological Engineering* 3, 1-13.
- Pyatenko, A.; Shimokawa, K.; Yamaguchi, M.; Nishimura, O.; Sukuri, M. (2004). Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure water. *Applied Physics A-Materials Science & Processing* 79, 803-806.
- Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27, 76-83.
- Rani, P. U., Rajasekharreddy, P. (2011). Green synthesis of silver-protein (core-shell) nanoparticles using *Piper betle* L. leaf extract and its ecotoxicological studies on *Daphnia magna*. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* 389, 188-194.
- Ratte, H. T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 89-108.
- Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L. (2003). Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 125, 13940-13941.
- Ravindra, S.; Mohan, Y. M.; Reddy, N. N.; Raju, K. M. (2010). Fabrication of antibacterial cotton fibres loaded with silver nanoparticles via “green approach”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 367, 31-40.
- Reimer, L. *Transmission electron microscopy*. 2nd Ed. Alemanha: Springer-verlag, 2009, 694p.
- Rhim, J. W.; Hong, S. I.; Park, H. M.; Ng, P. K. W. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5814-5822.
- Ribeiro, E. S.; Francisco, M. S. P.; Gushikem, Y.; Gonçalves, J. E. (2012). Princípios de XAS e XPS. Disponível em <www.chemkeys.com>. Acesso em Dezembro de 2013.
- Riddin, T. L.; Gericke, M.; Whiteley, C. G. (2006). Analysis of the inter- and extracellular formation of platinum nanoparticles by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using response surface methodology. *Nanotechnology* 17, 3482-3489.

Rison, S. C. G.; Hodgman, T. C.; Thornton, J. M. (2000). Comparison of functional annotation schemes for genomes. *Functional and Integrative Genomics* 1, 56-69.

Rizwan, W.; Kim, Y.; Mishra, A.; Yun, S.; Shin, H. (2010). Formation of ZnO-micro flowers prepared via solution process and their antibacterial activity. *Journal of Nanoscale Research Letters* 5, 1675–1681.

Roco, M. C. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 337-346.

Sadhasivam, S.; Shanmugam, P.; Yun, K. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81, 358–362.

Sanchez-Cortes, S.; García-Ramos, J. V.; Morcillo, G. (1994). Morphological study of metal colloids employed as substrate in the SERS spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* 167, 428-436.

Sanchez-Cortes, S.; García-Ramos, J. V.; Morcillo, G.; Tinti, A. (1995). Morphological study of silver colloids employed in surface-enhanced raman spectroscopy: activation when exciting in visible and near-infrared regions. *Journal of Colloid and Interface Science* 175, 358-368.

Sastry, M.; Ahmad, A.; Islam, N. I.; Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science* 85, 162-170.

Scherl, A.; Tsai, Y. S.; Shaffer, S. A.; Goodlett, D. R. (2008). Increasing information from shotgun proteomic data by accounting for misassigned precursor ion masses. *Proteomics* 8, 2791-2797.

Shahverdi, A. R.; Fakhimi, A.; Shahverdi, H. R.; Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 3, 168-171.

Sharma, B.; Mandani, S.; Sarma, T. K. (2013). Biogenic growth of alloys and core-shell nanostructures using uréase as a nanoreactor at ambient conditions. *Scientific Reports* 3, 2601-2609.

Shang, L.; Wang, Y.; Jiang, J.; Dong, S. (2007). pH-dependent protein conformational changes in albumin: gold nanoparticles bioconjugates: a spectroscopy study. *Langmuir* 23, 2714-2721.

Shankar, S.; Rai, A.; Ahmad, A.; Sastry, M. (2005). Controlling the optical properties of lemongrass extract synthesized gold nanotriangles and potential application in infrared-absorbing optical coatings. *Chemistry of Materials* 17, 566–572.

Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145, 83–96.

Shaw, D. J. Introduction to colloid and surface chemistry. 4^a Ed. Oxford, UK: Butterworth Heinemann, 1992, 306p.

Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Debabrata, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18, 225103-225112.

Si, S.; Mandal, T. K. (2007). Tryptophan-based peptides to synthesize gold and silver nanoparticles: a mechanistic and kinetic study. *Chemistry A European Journal* 13, 3160-3168.

Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kielme, D. J. (2005). *Spectrometry Identification of Organic Compounds*. 7th Ed. New York: Wiley & Sons, 2005. 512p.

Singh N. P.; McCoy M. T.; Tice R. R.; Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191.

Sintubin, L.; de Windt, W.; Dick, J.; Mast, J.; van der Ha, D.; Verstraete, W.; Boon, N. (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied Microbiology Biotechnology* 84, 741–749.

Smetana, A. B.; Klabunde, K. J.; Marchin, G. R.; Sorensen, C. M. (2008). Biocidal Activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir* 24, 7457-7464.

Sondi, I.; Salopek-Sondi, S. B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agents: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275, 117-182.

Song, H. Y.; Ko, K. K.; Oh, I. H.; Lee, B. T. (2006). Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. *European Cells and Materials* 11, 58.

Sonnichsen, C.; Franzl, T.; Wilk, T.; von Plessen, G.; Feldmann, J. (2002). *Plasmon* resonances in large noble metal clusters. *New Journal of Physics* 4, 93.1-93.8.

Srivastava, S.; Verma, A.; Frankamp, B. L.; Rotello, V. M. (2005). Controlled assembly of protein-nanoparticle composites through protein surface recognition. *Advanced Materials* 17, 617-621.

Steen, H.; Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 699-711.

Su, H. L.; Shou, C. C.; Hung, D. J.; Lin, S. H.; Pao, I. C.; Lin, J. H.; Huang, F. L.; Dong, R. X.; Lin, J. J. (2009). The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. *Biomaterials* 30, 5979-5987.

Sun, L.; Zhang, Z.; Dang, H. (2003). A novel method for preparation of silver nanoparticles. *Materials Letters* 57, 3874-3879.

Sun, R. W. Y.; Chen, R.; Chung, N. P. Y.; Ho, C. M.; Lin, C. L. S.; Che, C. M. (2005). Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *The Royal Society of Chemistry* 40, 5059-5061, 2005.

Sutherland, J. B.; Pometto III, A. L.; Crawford, D. L. (1983). Lignocellulose degradation by *Fusarium* species. *Canadian Journal of Botany* 61, 1194-1198.

Tabb, D. L.; Veja-Montoto, L.; Rudnick, P. A.; Variyath, A. M. (2010). Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 9, 761-776.

Thomas, G. J. (1999). Raman Spectroscopy of protein and nucleic acid assemblies. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 28, 1-27.

Tice, R. R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips, D. H; Venitt, S. (Ed(s)). *Environmental mutagenesis*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995. p. 315-339.

Tjalsma, H.; Antelmann, H.; Jongdbloed, J. D. H.; Braun, P. G.; Darmon, E.; Dorenbos, R.; Dubois, J. F.; Westers, H.; Zanen, G.; Quax, W. J.; Kuipers, O. P.; Bron, S.; Hecker, M.; van Dijk, J. M. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 207-233.

Tripathi, R. M.; Gupta, R. K.; Shrivastav, A.; Singh, M. P.; Shrivastav, B. R.; Singh, P. (2013a). *Trichoderma koningii* assisted biogenic synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial activity. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and nanotechnology* 4, 035005-0350010.

Tripathi, R. M.; Rana, D.; Shrivastav, A.; Singh, R. P.; Shrivastav, B. J. (2013b). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Saraca indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity. *Nano Biomedicine and Engineering* 5, 50-56.

Tripathy, A.; Raichur, A. M.; Chandrasekaran, N.; Prathna, T. C.; Mukherjee, A. (2010). Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 237-246.

Ullah, M.; Il, K.; Ha, C. (2006). Preparation and optical properties of colloidal silver nanoparticles at a high Ag⁺ concentration. *Material Letters* 60, 1496-1501.

Uskokovic, V. (2007). Theoretical and practical aspects of colloid science and self-assembly phenomena revisited. *Reviews in Chemical Engineering* 23, 301-372.

Uskoković, V.; Odsinada, R.; Djordjevic, S.; Habelitz, S. (2011). Dynamic light scattering and zeta potential of colloidal. *Archives of Oral biology* 56, 521-532.

Vaezzadeh, A. L.; Deshusses, J. M. P.; Waridel, P.; Francois, P.; Zimmermann-Ivol, C. G.; Lascuyer, P.; Schrenzel, J.; Hochstrasser, D. F. (2010). Accelerated digestion for high-throughput proteomics analysis of whole bacterial proteomes. *Journal Microbiology Methods* 80, 56-62.

Valeur, B. *Molecular Fluorescence: principles and applications*. 2^a ed. Wiley-VCH, 2001. 529p.

Vigneshwaran, N.; Ashtaputre, N. M.; Varadarajan, P. V.; Nachane, R. P.; Paralikar, K. M.; Balasubramanya, R. H. (2007a). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters* 61, 1413-418.

Vigneshwaran, N.; Kathe, A. A.; Varadarajan, P. V.; Nachane, R. P.; Balasubramanya, R. H. (2007b). Silver-Protein (Core-Shell) nanoparticle production using spent mushroom substrate. *Langmuir* 23, 7113-7117.

Vigneshwaran, N.; Kathe, A. A.; Varadarajan, P. V.; Nachane, R. P.; Balasubramanya, R. H. (2007c). Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7, 1893-1897.

Vijayakumar, M.; Priya, K.; Nancy, F. T.; Noorlidah, A.; Ahmed, A. B. A. (2013). Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Industrial Crops and Products* 41, 235-240.

Wen, Y.; Geitner, N. K.; Chen, R.; Ding, F.; Chen, P.; Andorfer, R. E.; Govindan, P. N.; Ke, P. C. (2013). Binding of cytoskeletal proteins with silver nanoparticles. *Royal Society of Chemistry Advances* 3, 22002-22007.

Whitmore, L.; Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and Reference Databases. *Biopolymers* 89, 392-400.

Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3, 163-175.

Willems, V. D. W. Roadmap report on nanoparticles. Disponível em: <http://nanoparticles.org/pdf/PerezBaxEscolano.pdf>. Acesso em Janeiro de 2014.

Wise, J. P.; Goodale, B. C.; Wise S. S.; Craig, G. A.; Pongan, A. F.; Walter, R. B.; Thompson, W. D.; Ng, A. K.; Aboueissa, A. M.; Mitani, H.; Spalding, M. J.; Mason, M. D. (2010). Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquatic Toxicology* 97, 34-41.

Xia, Y.; Halas, N. J. (2005). Shape-controlled synthesis and surface *plasmonic* properties of metallic nanostructures. *Material Research Society Bulletin* 30, 338-408.

Xie, J.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. C.; Ting, Y. P. (2007). Silver Nanoparticles: From biological to biomimetic synthesis. *ACSNano* 1, 429-439.

- Yacaman, J. M.; Rendon, L.; Arenas, J.; Puche, M. C. S. (1996). Maya blue paint: an ancient nanostructured material. *Science*, 273, 223-225.
- Yang, L.; Li, G. H.; Zhang, J. G.; Zhang, L. D.; Liu, Y. L.; Wang, Q. M. (2001). Fine structure of the *plasmon* resonance absorption peak of Ag nanoparticles embedded in partially oxidized Si matrix. *Applied Physics Letters* 78, 102-104.
- Yang, X.; Li, Q.; Wang, H.; Huang, J.; Lin, L.; Wang, W.; Sun, D.; Su, Y.; Opiyo, J. B.; Hong, L.; Wang, Y.; He, N.; Jia, L. (2010). Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of *Cinnamomum camphora* leaf. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 1589–1598.
- Yoon, K. Y.; Hoon Byeon, J.; Park, J. H.; Hwang, J. (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment* 373, 572-575.
- Yuan, W.; Ji, J.; Fu, J.; Shen, J. (2007). A facile method to construct hybrid multilayered films as a strong and multifunctional antibacterial coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 85B, 556-563, 2007.
- Zhang, C.; Ding, Y.; Ping, Q.; Yu, L. L. (2006). Novel chitosan-derived nanomaterials and their micelle-forming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8409-8416.
- Zhang, J. Z.; Noguez, C. (2008). Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. *Plasmonics* 3, 127-150.

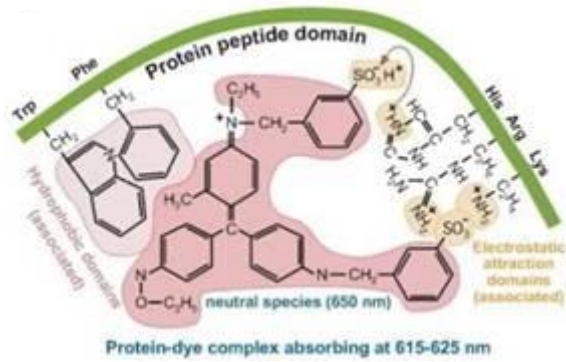
Apêndices

Apêndice I - Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

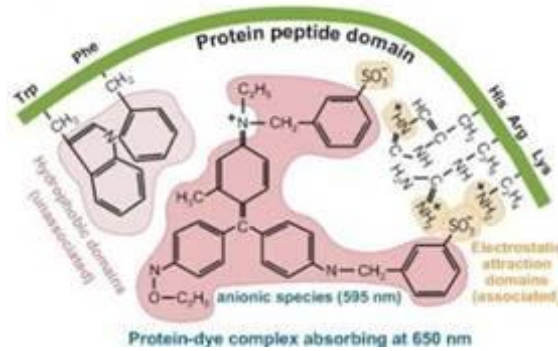
O método clássico de Bradford se baseia nas propriedades de absorção do corante Coomassie Blue G-250 na região do UV-Visível para estimar a quantidade de proteínas em solução. Este corante, de fórmula molecular $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$, é um trifenilmetano dissulfonato de sódio que, em solução ácida apresenta coloração marrom, mas quando se liga a proteínas tem sua absorvância alterada de 465 para 595 nm, sendo que a solução muda para a coloração azul. A coloração marrom em meio ácido refere-se à forma catiônica da molécula (nitrogênios carregados positivamente; Figura 51c) e grupos sulfônicos carregados negativamente. A ligação da proteína estabiliza a forma aniônica do corante (Figura 51b), negativamente carregada, mesmo em soluções ácidas, resultando na coloração azul. Desta maneira, a formação do complexo corante-proteína é utilizada para quantificar a concentração da proteína em solução (Bradford, 1976). As espécies neutras do Reagente de Bradford (Figura 51a) ligam-se as proteínas tanto por interações hidrofóbicas (via Fenilalanina, Triptofano, etc) como por interações eletrostáticas (entre grupo sulfônico dissociado e distante do nitrogênio quaternário e o grupo guanidino positivamente carregado da Arginina, Lisina ou Histidina). Após a ligação com as proteínas, a absorção das espécies neutras desloca para 615-625 nm, possivelmente devido a um enfraquecimento da ligação heteropolar do grupo sulfônico (neutralizado) próximo ao N quaternário (seta tracejada na Figura 51a), comportando-se como uma espécie pseudo - aniônica). Espécies aniônicas do Reagente de Bradford ligam-se às proteínas (Figura 51b) principalmente por interação eletrostática entre grupo sulfônico dissociado e

distante do nitrogênio quaternário e a Arginina (Lisina, Histidina) formando o complexo corante-proteína que absorve em 650 nm, apresentando comportamento espectral semelhante às espécies neutras. Já as espécies catiônicas do Reagente de Bradford (Figura 51c) não formam complexos com proteínas, pois sua absorção a 470 nm não muda. Isto é esperado porque ambos os grupos sulfônicos destas espécies estão indisponíveis (neutralizados) para reagirem com Arginina, Lisina, Histidina (Georgiou, 2008).

(a)



(b)



(c)

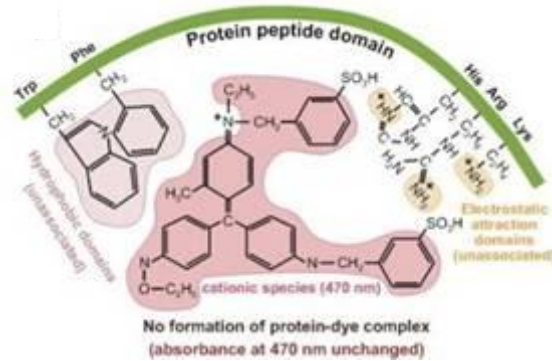


Figura 51. Mecanismo da ligação do Reagente de Bradford com proteínas (Georgiou, 2008).

Apêndice II - Determinação estimada da massa molecular por Eletroforese em Gel (SDS-PAGE)

Tabela 12 - Soluções utilizadas para: preparo do gel SDS-PAGE 18%, aplicação das amostras no gel, coloração e descoloração do gel

Gel de empacotamento		Gel de separação	
Mix 30%	3% (v/v)	Mix 30%	18% (v/v)
Tris-HCl pH 6,8*	1,5 mol L ⁻¹	Tris-HCl pH 8,8*	1,5 mol L ⁻¹
SDS	10% (m/v)	SDS	10% (m/v)
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (APS)	0,1% (m/v)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (APS)	0,1% (m/v)
C ₆ H ₁₆ N ₂ (TEMED)	0,04% (v/v)	C ₆ H ₁₆ N ₂ (TEMED)	0,04% (v/v)
Mix 30%			
Acrilamida – CH ₂ CHCONH ₂		29% (m/v)	
Bis-acrilamida – (CH ₂ CHCONH ₂)CH ₂		1% (m/v)	
Tampão de amostra – solução A		Tampão de padrão – solução B	
Tris -HCl	50 mmol L ⁻¹	Tris	62,5 mmol L ⁻¹
DTT	100 mmol L ⁻¹	DTT	100 mmol L ⁻¹
SDS	2% (m/v)	SDS	2% (m/v)
Azul de bromofenol	0,1% (m/v)	Azul de bromofenol	0,01% (m/v)
Glicerol	10% (m/v)	Glicerol	10% (m/v)
pH 6,8		pH 6,8	
Tampão de corrida – solução C			
Tris	25 mmol L ⁻¹	Glicina 192 mmol L ⁻¹	
SDS	1,0% (m/v)	pH 8,0	
Corante		Descorante	
Comassie brillant blue R-250	0,25% (m/v)	CH ₃ CH ₂ OH	30% (v/v)
CH ₃ CH ₂ OH	30% (v/v)	CH ₃ COOH	10% (v/v)
CH ₃ COOH	10% (v/v)		

A Tabela 13 apresenta as proteínas padrão utilizadas (Low Molecular Weight – GE Healthcare), bem como suas massas molares conhecidas.

Tabela 13 - Padrões de baixa massa e respectivas massas moleculares para eletroforese em gel de SDS-PAGE.

Padrão	Massa Molar / kDa
Fosforilase b	97,0
Albumina de soro bovina	66,0
Ovalbumina	45,0
Anidrase carbônica	30,0
Inibidor de tripsina	21,5
Lisozima	14,1

Apêndice III - Procedimento Experimental das análises de LC-MS/MS para identificação das proteínas

Os experimentos de MS foram realizados com auxílio do grupo do Prof^o Dr. Fábio C. Gozzo (IQ-UNICAMP), utilizando um cromatógrafo nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro Synapt HDMS (Waters), com geometria QTOF, equipado com fonte de nanoESI operando no modo de aquisição dependente de dados (DDA).

As proteínas foram analisadas por LC-MS após realização de metodologia baseada em desnaturação seguida de digestão trípica utilizando a enzima tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega), dessalinização e concentração (www.promega.com). Um volume de 50 μL de extrato de proteínas foi misturado com 150 μL de solução aquosa contendo uréia 8 mol L^{-1} , Tris.HCl 100 m mol L^{-1} pH 7,6 e ditioneína (DTT) 10 m mol L^{-1} , e então aquecido a 95°C por 20 min sob agitação branda para desnaturação das proteínas. A seguir, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e diluída 10x (concentração final de uréia < 1 mol L^{-1}) em tampão bicarbonato de amônio 100 mM pH 7,8. Foi então adicionada uma solução de tripsina em ácido acético 50 m mol L^{-1} , em proporção 50:1 m/m (substrato/enzima), seguido de agitação leve por 18 h a 37°C. A seguir, as soluções foram dessalinizadas em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) Oasis HLB (Waters), com capacidade de 1 cc/30 mg, mediante condicionamento do cartucho (1 mL acetonitrila com 0,1% ácido fórmico v/v, seguido de 1 mL de água com 0,1% ácido fórmico v/v), carregamento da amostra, dessalinização com 1 mL água (0,1% ácido fórmico v/v) e eluição dos peptídeos com 1 mL acetonitrila (0,1% ácido fórmico v/v). A cada solução

resultante foram adicionados 50 μL de água e as mesmas foram então concentradas até cerca de 50 μL em um concentrador SpeedVac Savant SPD131DDA (Thermo Scientific). As soluções resultantes foram centrifugadas (10 min a 17000 x g) e o sobrenadante transferido para *vials* apropriados para análise por LC-MS. As amostras aquosas foram então injetadas no sistema UPLC e direcionadas a uma pré-coluna (Waters Symmetry C₁₈, 20 mm \times 180 μm d.i., partículas de 5 μm), onde foram dessalinizadas por 3 min com fluxo de 5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ de 97:3 água/acetonitrila com 0,1% ácido fórmico v/v, sendo então transferidas para a coluna analítica (Waters BEH130 C₁₈, 100 mm \times 100 μm i.d., partículas de 1,7 μm) e eluídas com com fluxo de 1,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ através da variação dos gradientes de fases móveis A e B conforme Tabela 14 a seguir.

Tabela 14 - Variação dos gradientes das fases móveis A e B utilizados na corrida cromatográfica

Tempo / min	% A	% B
	(Água com 0,1% ácido fórmico v/v)	(Acetonitrila com 0,1% ácido fórmico v/v)
0	97	3
40	70	30
50	20	80
55	20	80
56	97	3
60	97	3

A detecção dos peptídeos foi feita de forma *online* pelo espectrômetro de massas, configurado para operar em modo de aquisição dependente de dados (DDA), contendo uma função de MS *fullscan* (m/z 200 a 2000), três funções de espectro de íons fragmentos (MS/MS, m/z 50 até 50 unidades acima da m/z do precursor) e uma função de padrão externo de calibração (*lockmass*, m/z 200 a 2000). Todos os espectros foram adquiridos a uma taxa de 1 Hz. Os critérios para escolha de íons precursores para experimentos de

espectro de íons fragmentos foram: a) o estado de carga do precursor, sendo eleitos apenas precursores em estados de carga +2, +3, +4, +5; b) a intensidade, sendo descartados íons com intensidade inferior a 20 contagens. As energias de colisão aplicadas nos experimentos de espectro de íons fragmentos foram definidas como perfis individuais (curvas de energia de colisão *versus* m/z do precursor) para cada estado de carga de +2 a +5.

Resumindo brevemente as configurações acima para uma corrida de LC-MS (DDA) típica, o instrumento inicia a corrida adquirindo espectros de MS *fullscan* (m/z 150 a 2000) a uma taxa de 1 Hz. Uma vez identificados, em um determinado espectro de MS *fullscan*, íons que cumprem os critérios supracitados para experimentos de espectro de íons fragmentos, o instrumento seleciona até três desses íons (por ordem decrescente de intensidade), e adquire um espectro de íons fragmentos para cada (1 s cada), retornando então ao modo MS *fullscan* e adquirindo mais um espectro. Como demais parâmetros do espectrômetro de massas estão voltagem do capilar 3,0 kV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100°C, fluxo do gás de nanoESI 0,5 L h⁻¹, energias de colisão das celas *Trap* e *Transfer* respectivamente em 6 e 4 eV e detector em 1700 V.

As corridas de LC-MS foram processadas (deconvolução, deisotopização e correção de medida de m/z) pelo software ProteinLynx Global Server v.2.2. (Waters) e analisadas por busca em banco de dados empregando-se o sistema MASCOT v.2.2. (Matrix Science Ltd) (www.matrixscience.com). Como parâmetros da busca foram selecionados digestão com tripsina com até 1 sítio de clivagem ignorado, oxidação em resíduos de metionina como modificação variável e tolerância de massa de peptídeos e fragmentos ambos em $\pm 0,1$ Da. As buscas foram feitas no banco de dados NCBI nr.

Apêndice IV - Meios de Cultura para o crescimento dos micro-organismos utilizados

IV.1 Fusarium oxysporum – meio EMA

Extrato de levedura (Neogen) 0,5 %

Extrato de malte (Neogen) 2 %

Ágar (Neogen) 2%

Água destilada.

IV.2 Candida albicans e Candida parapsilosis

IV.2.1 Meio YPD líquido

Extrato de levedura (Neogen) - 10 g L⁻¹

Peptona (Neogen) - 15 g L⁻¹

Dextrose (Neogen) - 20 g L⁻¹

Cloranfenicol (Fluka) - concentração final igual a 0,6 µL mL⁻¹

Água destilada.

IV.2.2 Meio YPD sólido

Extrato de levedura (Neogen) - 10 g L⁻¹

Peptona (Neogen) - 15 g L⁻¹

Dextrose (Neogen) - 20 g L⁻¹

Ágar (Neogen) - 15 g L⁻¹

Cloranfenicol (Fluka) - concentração final igual a $0,6 \mu\text{L mL}^{-1}$

Água destilada.

IV.3 Xanthomonas axonopodis pv. citri – meio Luria Bertani (LB)

IV.3.1 Meio LB sólido

Peptona (Neogen) - 10 g L^{-1}

Extrato de levedura (Neogen) - 5 g L^{-1}

Ágar (Neogen) - 15 g L^{-1}

Ampicilina - concentração final igual a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Água destilada.

IV.3.2 Meio LB líquido

Peptona (Neogen) - 10 g L^{-1}

Extrato de levedura (Neogen) - 5 g L^{-1}

Ampicilina - concentração final igual a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Água destilada.

Apêndice V - Técnicas utilizadas

V.1 Técnicas de Caracterização das AgNPs

A caracterização de nanopartículas metálicas tem sido obtida através da utilização de técnicas espectroscópicas, microscópicas e espalhamento dinâmico de luz. Com isto, torna-se possível a determinação do tamanho, da morfologia, da composição, bem como da cristalinidade destas partículas. A seguir, estão descritas, de maneira sucinta, as principais técnicas utilizadas.

V.1.1 Técnicas Espectroscópicas

V.1.1.1 Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis utiliza a luz com comprimento de onda na faixa de energias do visível (400-800 nm) e ultravioleta (300-400 nm), onde as moléculas sofrem transições eletrônicas. As nanopartículas metálicas (NPM), quando irradiadas por luz, apresentam oscilações de seus elétrons livres localizados em suas superfícies. Consequentemente, parte da luz visível é absorvida, dando origem ao denominado efeito de ressonância de *plasmon*, o qual é dependente do tipo de material, do tamanho da partícula, de sua forma, bem como do solvente utilizado (constante dielétrica) (Kelly *et al.*, 2003; Sonnichsen *et al.*, 2002; Prasad, 2004; Hunter e Fndler, 2004; Yang *et al.*, 2001; Creighton e Eadon, 1991; Gómez *et al.*, 2008; Xia e Halas, 2005). Tais efeitos podem ser explicados pela modelo de Mie e Drude (Mie, 1908), a qual relaciona, matematicamente, as bandas de absorção do *plasmon* com

propriedades intrínsecas das NPM, tornando possível a obtenção de características importantes através da interpretação do espectro. Desta maneira, os espectros de absorção deste tipo de nanopartículas têm sido investigados (Creighton e Eadon, 1991; Abdolvand, 2006). Dos metais que apresentam ressonância de *plasmon* no espectro UV-Vis (Ag, Au, Cu, etc.), a prata é o metal que exhibe uma maior eficiência na excitação do *plasmon*, sendo as nanopartículas de prata, portanto, as que interagem mais eficientemente com a luz, quando comparadas com uma partícula do mesmo tamanho, mas constituída por qualquer outro elemento.

De maneira geral, NPM que possuem maior tamanho têm suas bandas de absorção deslocadas para maiores comprimentos de onda, enquanto as de menor tamanho apresentam deslocamentos na direção de menores comprimentos de onda. Morfologicamente, AgNPs esféricas apresentam banda de absorção de *plasmon* próxima a 400 nm, enquanto que as pentagonais possuem absorção em 540 nm e as prismas triangulares em 670 nm (Kamat, 2002; Mock *et al.*, 2002). A partir dos espectros de absorção, também se torna possível a explicação das colorações características das NPM: a ressonância de *plasmon* provoca uma acentuada absorção da luz em determinada região visível do espectro fazendo com que o restante do espectro transmitido seja o responsável pela cor da suspensão.

V.1.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-x (EDS)

A espectroscopia de Energia Dispersiva é uma técnica de identificação elementar que utiliza os raios-x emitidos pela amostra, quando esta é bombardeada pelo feixe de elétrons do microscópio e, por isso, é utilizada associada com a microscopia eletrônica, principalmente a de varredura e a de

transmissão. Quando a amostra é bombardeada, os elétrons das camadas mais internas do átomo são ejetados, proporcionando um decaimento dos elétrons das outras camadas mais externas. À medida que ocorre este tipo de decaimento, são emitidos raios-x característicos, que estão relacionados com o número atômico do elemento investigado.

A técnica tem a capacidade de fornecer dados quantitativos e qualitativos, permitindo determinar quais os elementos presentes em uma amostra e em que proporções. Para nanopartículas metálicas, a análise por EDS é utilizada para comprovar efetivamente a presença do metal e também de outros elementos que compõem a amostra. Em trabalho realizado por Bakura *et al.* (2012), o espectro EDS das AgNPs preparadas pela redução de AgNO₃ utilizando uma solução de dextran como agente redutor e estabilizante, revelou um sinal intenso na região da prata, confirmando assim a formação de nanopartículas de prata. A literatura mostra que, em geral, nanocristais de prata metálica possuem absorção típica em aproximadamente 3 keV bem característica devido à presença de *plasmons* de superfície (Magudpatty *et al.*, 2001).

V.1.1.3 Espectroscopia de Difração de Raios-X (XRD)

A espectroscopia de difração de raios-x corresponde a uma das principais técnicas de caracterização estrutural de materiais cristalinos. Os raios-x, ao atingirem um material, podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo. O fóton de raios-x, após a sua colisão com o elétron muda sua trajetória, mantendo, porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Se os átomos que geram esse espalhamento estiverem organizados de maneira sistemática, como em uma estrutura

cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente (raios-x), pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que efeitos de difração dos raios-x podem ser observados em vários ângulos.

A conhecida lei de Bragg, $n\lambda = 2d\sin\Theta$, permite relacionar a distância entre dois planos adjacentes de uma família de planos, d_{hkl} (onde hkl são os índices de Miller para os planos considerados), com o ângulo entre o plano (hkl) e a direção do feixe incidente, Θ_{hkl} , sendo n um número inteiro que define a ordem da reflexão. Os valores de Θ para os quais ocorre a difração dependem das distâncias interplanares características da rede do material, enquanto a intensidade dos feixes difratados depende das espécies atômicas presentes e da sua localização dentro da célula unitária.

Em nanopartículas metálicas, a técnica de XRD é geralmente utilizada para o estudo da cristalinidade das nanopartículas formadas (Bankura *et al.*, 2012; Fayaz *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012). Um típico perfil de difração para AgNPs compreende reflexões de Bragg em $2\theta \approx 38; 44; 64$ e 77° , as quais podem ser indexadas como orientações dos planos (111), (200), (220) e (311), correspondentes a planos cristalinos pertencentes a uma estrutura cristalina cúbica de face centrada (*fcc - face centered cubic*) (Mukherjee *et al.*, 2008; Rani e Rajasekharreddy, 2011; Vigneshwaran *et al.*, 2007a).

V.1.1.4 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raio-X (XPS)

A técnica de espectroscopia de fotoelétrons de raios-x fornece informações a respeito da composição e organização atômica superficial de uma amostra. A energia transportada por um fóton de raios-x ($h\nu$) é absorvida

pelo átomo alvo, levando à origem do estado excitado, que é relaxado pela emissão de um fotoelétron proveniente das camadas eletrônicas mais internas do átomo. Nesta técnica é medida a intensidade de fotoelétrons gerados em função de sua energia cinética (E_C) (Ribeiro *et al.*, 2012). A energia de ligação (E_B) é específica de cada ligação química e do elemento e pode ser determinada pela equação: $E_C = h\nu - E_1$, onde $h\nu$ é a energia dos fótons incidentes (raios-x de baixa energia produzidos a partir de um ânodo de alumínio ou magnésio), E_C é a energia dos fotoelétrons ejetados e E_1 é a energia de ligamento. A energia cinética dos fotoelétrons produzidos quando da interação com os raios-x está na faixa de 100-1400 eV, tornando a técnica adequada ao estudo de superfícies, uma vez que a energia dos raios-x incidentes é baixa.

Os elementos presentes na superfície da amostra são caracterizados diretamente pela determinação das energias de ligação dos picos fotoeletrônicos. Além disso, a quantificação elementar e a composição superficial podem ser obtidas pela integração da área do pico, a qual é proporcional ao número de átomos no volume detectado. Através da equação: $J = L + S$, onde J é o momento angular orbital total, L é o momento angular orbital (s, p, d, f,...) e S é o momento angular de spin ($\pm 1/2$), os picos dos fotoelétrons em um espectro XPS podem ser caracterizados (segundo os números quânticos do nível ao qual o elétron se origina).

Medidas feitas para AgNPs sintetizadas pelo grupo de Usha Rani *et al.* (Rani e Rajasekharreddy, 2011), além do espectro XPS da Ag 3d, foi obtido também o espectro total. Neste, aparecem picos de C 1s, N 1s e O 1s, que, com as deconvoluções apropriadas para cada elemento, revelam a presença de picos fotoeletrônicos atribuídos à grupos carbonila (cetonas e aldeídos), grupos aromáticos (presentes nos aminoácidos das proteínas ligadas

à superfície das AgNPs), bem como aminas e ligações C-O. No caso das AgNPs citadas, o espectro de Ag 3d obtido é característico de Ag com estado de oxidação zero (prata metálica). Desta maneira, os resultados de XPS podem fornecer informações a respeito de que as proteínas não são somente importantes na formação das nanopartículas de prata, mas também participam da capa de estabilização ao redor das partículas.

V.1.2 Técnicas Microscópicas

V.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A técnica se baseia no bombardeamento de uma amostra por um feixe de elétrons altamente energéticos (60 a 150 keV). O feixe de elétrons é gerado por um canhão de elétrons através da emissão termo-iônica (aquecimento de um filamento, que pode ser de tungstênio, hexaboreto de lantânio) ou emissão por campo (pontas de tungstênio) (Reimer, 2009). Os elétrons interagem fortemente com os átomos através de espalhamentos inelástico e elástico, sendo este último o mais importante dentre as interações, criando o contraste na imagem TEM. Neste tipo de espalhamento, ocorrem mudanças na direção dos elétrons primários, porém, sem perda detectável de energia. Alguns possíveis processos provenientes da interação do feixe eletrônico com a matéria são: excitação do *plasmon* (oscilação coletiva dos elétrons livres); excitação de fônons; ejeção de elétrons de camadas internas juntamente com a emissão de raios-x (ou elétrons Auger) ou externas (elétrons secundários). A Microscopia Eletrônica de Transmissão tem se mostrado a mais adequada na obtenção de imagens diretas de nanopartículas metálicas, possibilitando a

determinação de sua distribuição de tamanho, além de sua estrutura cristalina, no caso do uso de microscópios de alta resolução (Barwal *et al.*, 2011; Chen e Chen, 2002; <http://www.jeol.com>). Com resolução de até 0,1 nm, obtida pelos instrumentos modernos de alta voltagem, torna-se possível, em alguns casos, fazer imagens de átomos pesados e determinar o tamanho e forma de nanopartículas (<http://www.jeol.com>), como no presente trabalho. Por exemplo, Kouvaris *et al.* (2003) e Amaladhas *et al.* (2012) caracterizaram AgNPs biossintetizadas e as micrografias, além da morfologia das nanopartículas, revelaram a presença de uma “capa” orgânica (proteínas) responsável pela estabilidade destas partículas.

V.1.2.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica é uma técnica de microscopia de varredura de sonda que permite estudar com elevada resolução (em nível de nanômetros) estruturas macromoleculares em condições fisiológicas, distribuição de átomos e moléculas na superfície, além de analisar a topografia da superfície em imagens tridimensionais. Em AFM ocorre a interação da ponta com a superfície da amostra sendo sensível a pequenas variações de força. A interação em função da distância entre a ponta e a amostra determina o modo de funcionamento deste tipo de microscopia, podendo ser considerados três modos distintos: modo de contato, não contato e modo intermitente.

Para a análise de materiais maleáveis e facilmente deformáveis pela ponta, como materiais biológicos, polímeros e amostras demasiadamente rugosas, o modo intermitente é o frequentemente usado. Nele, a ponta oscila a uma elevada frequência (aproximadamente 300 kHz), com grande amplitude e

entra em contato com a superfície após um ciclo de oscilação (Gadegaard, 2006; Friedbacher e Fuchs, 1999; Braga e Ricci, 2004).

Nesta tese a AFM foi utilizada para a caracterização topográfica das AgNPs, inclusive se estas são homogêneas em tamanho e esféricas em morfologia (Gopinath e Velusamy, 2013; Sadhasivam *et al.*, 2010), em contrastando com as análises por TEM.

V.1.3 Técnicas de Espalhamento de Luz

As medidas de espalhamento de luz utilizadas neste trabalho englobam as medidas de DLS (*Dinamic light scattering* – espalhamento de luz dinâmico) e as medidas de Potencial zeta (ξ -potencial).

V.1.3.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Também conhecida como PCS (*Photon Correlation Spectroscopy*), é uma técnica de dispersão de luz adequada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico de partículas com dimensões nanométricas ou de até alguns micrometros, podendo até mesmo determinar tamanhos inferiores a 1 nm, dependendo do equipamento. Pode ser aplicada na determinação de tamanho ou distribuição de tamanho de nanopartículas, de proteínas, polímeros, emulsões, entre outros.

Partículas em um fluido (líquido ou gás) possuem um movimento aleatório, denominado movimento Browniano e, ao serem iluminadas com um laser, a correlação de intensidade de luz dispersa é dependente do tamanho das partículas, sendo que as de menor tamanho movem-se mais rapidamente e as

de maior tamanho movem-se mais lentamente. A técnica mede a flutuação da intensidade de luz espalhada pelas partículas relacionando-o com o tamanho das mesmas, através da equação de Stokes-Einstein (equação 1), sendo possível então, a determinação de seu diâmetro hidrodinâmico, D_H (<http://www.malvern.co.uk>).

$$D_H = kT/3\pi\eta D, \text{ onde}$$

D_H : diâmetro hidrodinâmico

k : constante de Boltzmann

T : temperatura absoluta

η : viscosidade

D : coeficiente de difusão translacional

Esta técnica consiste em analisar a luz espalhada pela suspensão como função do tempo a um dado ângulo (Figura 52) (Maxit, 2010).

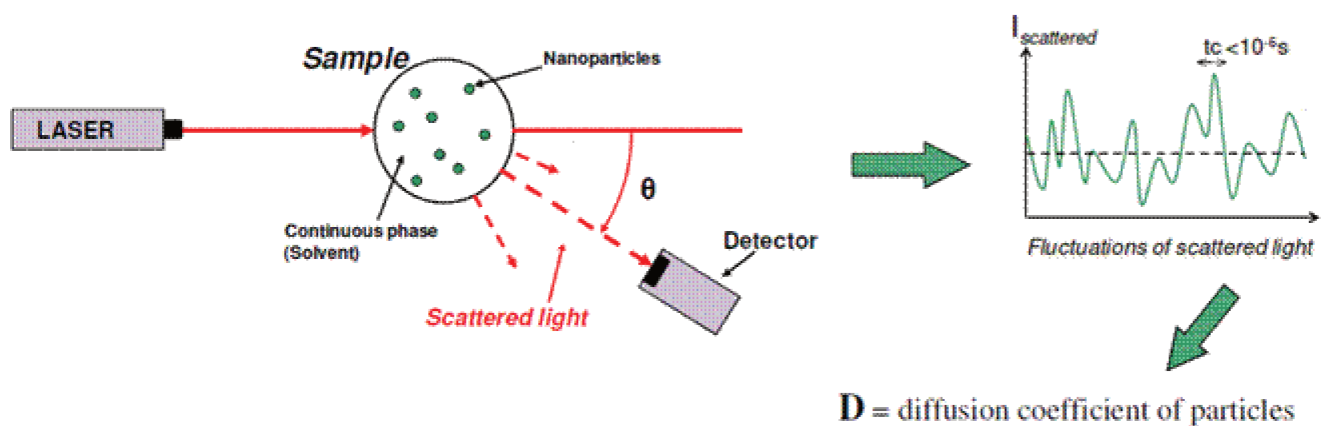


Figura 52. Ilustração do princípio de funcionamento de um *Dinamic light scattering* (DLS).

Neste estudo o DLS foi usado para a determinação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersividade de suspensões de

nanopartículas, como encontrado em muitos trabalhos científicos (Otari *et al.*, 2014; Tripathi *et al.*, 2013a; Tripathi *et al.*, 2013b).

V.1.3.2 Potencial Zeta (ζ -potencial)

Do ponto de vista teórico, o potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada de solvente existente ao redor da partícula dispersa. No caso de moléculas e partículas que apresentam apenas estabilidade coloidal elétrica, um alto valor absoluto de potencial zeta (± 30 mV) confere estabilidade e, assim, a dispersão resistirá à agregação. Já em potenciais zeta próximos de zero, as forças atrativas excedem as repulsivas, causando aglomeração. Assim, partículas com alto potencial zeta (negativo ou positivo), são eletricamente estabilizadas enquanto partículas com potencial zeta próximos de zero tendem a coagular ou flocular. O potencial- ζ é o potencial eletrostático gerado pela acumulação de íons na superfície da partícula e é aplicado na determinação da carga de superfície de partículas, proteínas, lipossomas, entre outros. A superfície da partícula, quando dispersa em um solvente, está organizada em uma dupla camada elétrica, a qual é composta por duas regiões: a região interna, denominada camada de Stern, onde contra-íons da solução que possuem carga oposta a da partícula estão fortemente ligados à superfície, e a região externa, chamada de camada difusa, onde os contra-íons, possuindo a mesma carga da partícula, encontram-se ligados à superfície de um modo mais fraco. Dentro da camada difusa existe uma fronteira (chamada de camada de cisalhamento) em que íons e partículas formam uma entidade estável, e o potencial existente nesta fronteira é designado de potencial zeta, como ilustra a Figura 53.

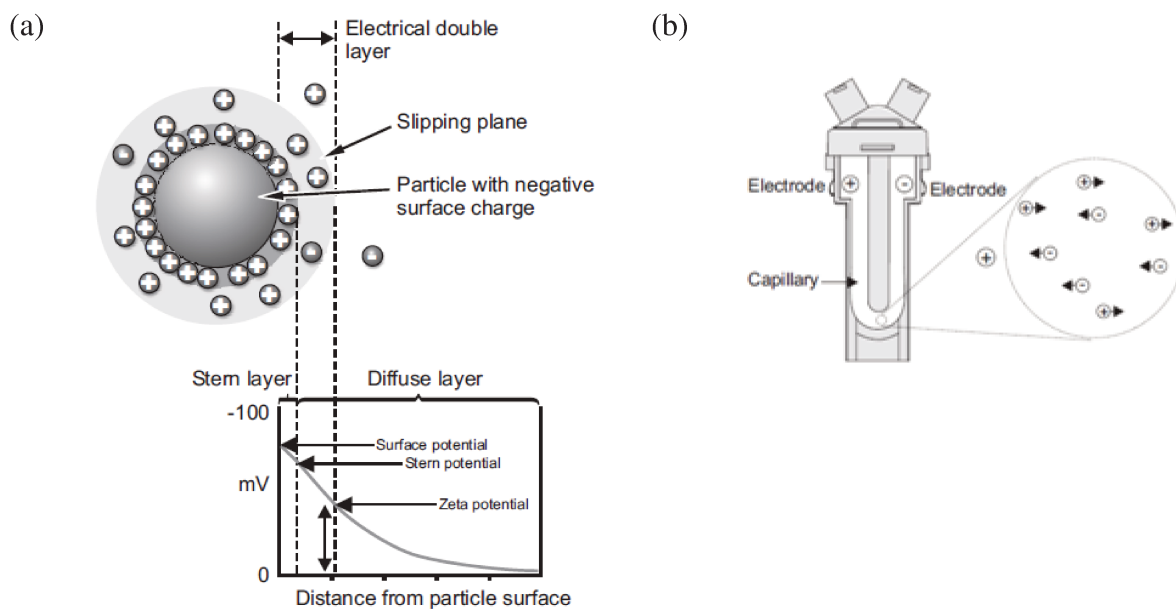


Figura 53. Representação esquemática do potencial zeta (<http://www.malvern.co.uk>).
 (a) Dupla camada elétrica; (b) Célula capilar equipada com eletrodos, onde as partículas se movimentam influenciadas pelo campo elétrico.

Quando o campo elétrico interage com as partículas carregadas, estas são atraídas para o eletrodo de carga oposta (Figura 53b). A velocidade da partícula mediante o campo elétrico refere-se à mobilidade eletroforética. O potencial zeta está relacionado com a mobilidade eletroforética pela equação de Henry (equação 2).

$$U_E = (2\varepsilon z f(ka))/3\eta, \text{ onde}$$

U_E : mobilidade eletroforética

ε : constante dielétrica do meio

η : viscosidade do solvente

z : potencial zeta

$f(ka)$: função de Henry.

Dois valores são normalmente usados como aproximações para $f(ka)$. Se o cálculo do potencial zeta for efetuado para sistemas aquosos e concentração moderada de eletrólito, $f(ka)$ é igual a 1,5 referindo-se à aproximação de

Smoluchowski, ou seja, para sistemas que seguem o modelo de Smoluchowski. Por exemplo, partículas maiores que 0,2 microns dispersas em eletrólitos contendo mais que 10^{-3} mol L⁻¹ de sal. Se, no entanto, a medida for efetuada para sistemas não aquosos, $f(ka)$ é igual a 1,0 e refere-se à aproximação de Huckel (partículas menores em meios com baixa constante dielétrica) (Dougherty *et al.*, 2008; <http://www.malvern.co.uk>).

Neste trabalho, o potencial zeta permitiu a determinação da carga superficial das AgNPs, além de ser utilizado como um indicativo da estabilidade das suspensões coloidais (Kosmulski, 2009; Shaw, 1992; Uskoković, 2007; Uskoković *et al.*, 2011), que podem ser de natureza eletrostática, estérica ou ainda eletroestérica. Nas AgNPs, o potencial zeta está diretamente relacionado à capa de estabilização composta por material orgânico, proteínas, por exemplo. AgNPs sintetizadas por diferentes fungos (*Aspergillus tubigenis* e *Fusarium oxysporum*), apresentaram valores de potencial zeta distintos, +8,48 mV e -37,1 mV, respectivamente, apesar de terem sido produzidos pela mesma espécie de micro-organismo. A identificação das proteínas por espectrometria de massas revelou que, no caso de *Aspergillus tubigenis*, por exemplo, estas macromoléculas apresentaram influência significativa na carga superficial das nanopartículas (Ballottin *et al.*, 2014; Käkien *et al.*, 2013).

V.2 Técnicas de Caracterização de Proteínas

V.2.1 Técnicas Espectroscópicas

V.2.1.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho fornece evidências da presença de grupos funcionais devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A intensidade da absorção depende de quão eficiente é a transferência da energia do fóton para a molécula. As moléculas que são sensíveis à esta técnica devem ter dipolos, moléculas que não possuem mudança de dipolo devido ao campo eletromagnético aplicado são ditas inativas, por exemplo, N₂ e H₂, que apresentam ligações simétricas. A porção de maior utilidade para a análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas está situada entre 4000 e 400 cm⁻¹ (cm⁻¹ = número de onda = 1/λ), conhecida como região fundamental ou infravermelho médio, sendo a região entre 4000 cm⁻¹ e 1000 cm⁻¹ a responsável pelas assinaturas dos grupos funcionais presentes na molécula (vibrações mais energéticas) e as vibrações entre 1000 cm⁻¹ até 600 cm⁻¹ referentes àquelas com mudança nos ângulos entre os átomos. Nas nanopartículas de prata, a espectroscopia de infravermelho pode ser usada para avaliar a interação das partículas com agentes estabilizantes, sejam eles químicos (PVA, quitosana etc.) ou biológicos (proteínas), como demonstrado por muitos autores (Govindaraju *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2008; Tripathy *et al.*, 2010).

V.2.1.2 Espectroscopia Raman

Em um meio, absorção e espalhamento são os processos básicos de interação entre a luz e os átomos e moléculas ali presentes. No processo de absorção, as moléculas realizam transições entre estados quânticos, eletrônicos, rotacionais ou vibracionais estacionários ao interagirem com fótons de energia correspondente a estas transições. Já no processo de espalhamento, moléculas interagem com fótons de qualquer energia (frequência) e estes são ditos espalhados porque uma fração do feixe de luz pode ser detectada em todas as direções. Ao interagir com um fóton de qualquer energia, a molécula pode reemitir um fóton com a mesma energia (espalhamento elástico), dando origem ao chamado espalhamento Rayleigh. Já no processo denominado espalhamento Raman, a molécula realiza uma transição entre estados de energia diferentes. Quando o fóton emitido neste processo possui menor energia que o fóton original, o processo é denominado espalhamento inelástico Stokes. Se o fóton encontra a molécula já em um estado excitado e a transição ocorre para o seu estado fundamental, o fóton emitido possui maior energia que o fóton incidente, dando origem ao espalhamento inelástico anti-Stokes. A diferença entre as energias corresponde à energia da transição (vibracional ou roto-vibracional) realizada pela molécula. Em espectroscopia Raman, um fenômeno comumente observado recebe o nome de *Surface Enhanced Raman Scattering* (Espalhamento Raman Amplificado por superfície). No efeito SERS, o sinal Raman de determinadas espécies é significativamente aumentado quando estas estão próximas ou ligadas (adsorvidas) à superfície das NPM, como é o caso de proteínas ao redor das AgNPs biogênicas (Huang *et al.*, 2009; Mukherjee *et*

al., 2008). Este efeito está baseado na amplificação de um campo elétrico local em torno das nanopartículas causado pela excitação dos *plasmons*. Apesar de várias espécies metálicas darem origem ao efeito SERS, como lítio, cádmio, níquel, platina e paládio, as que o apresentam mais pronunciadamente são prata, ouro e cobre.

V.2.1.3 Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de Dicroísmo Circular permite analisar a estrutura secundária e terciária de proteínas, além das alterações estruturais nela ocorrentes, a estabilidade dos fragmentos da proteína, bem como a integridade e enovelamento da mesma (Kelly e Price, 2000).

Esta técnica se baseia na determinação da diferença na absorbância da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, em função do comprimento de onda (Harding e Chowdhry, 2001). A região do ultravioleta (UV) longínquo, de 190 a 260 nm, corresponde à absorção das ligações amida da cadeia peptídica da proteína, sendo o espectro de dicroísmo analisado em termos de estrutura secundária. Cada conformação das proteínas/peptídeos (hélice α , folha β , β *turn* e randômica) apresenta um espectro típico de CD, como observado na Figura 54.

O espectro de CD na região de UV próximo (260 a 320 nm) reflete as cadeias de aminoácidos aromáticos e proporciona informações sobre a estrutura terciária da proteína (Drake, 2001).

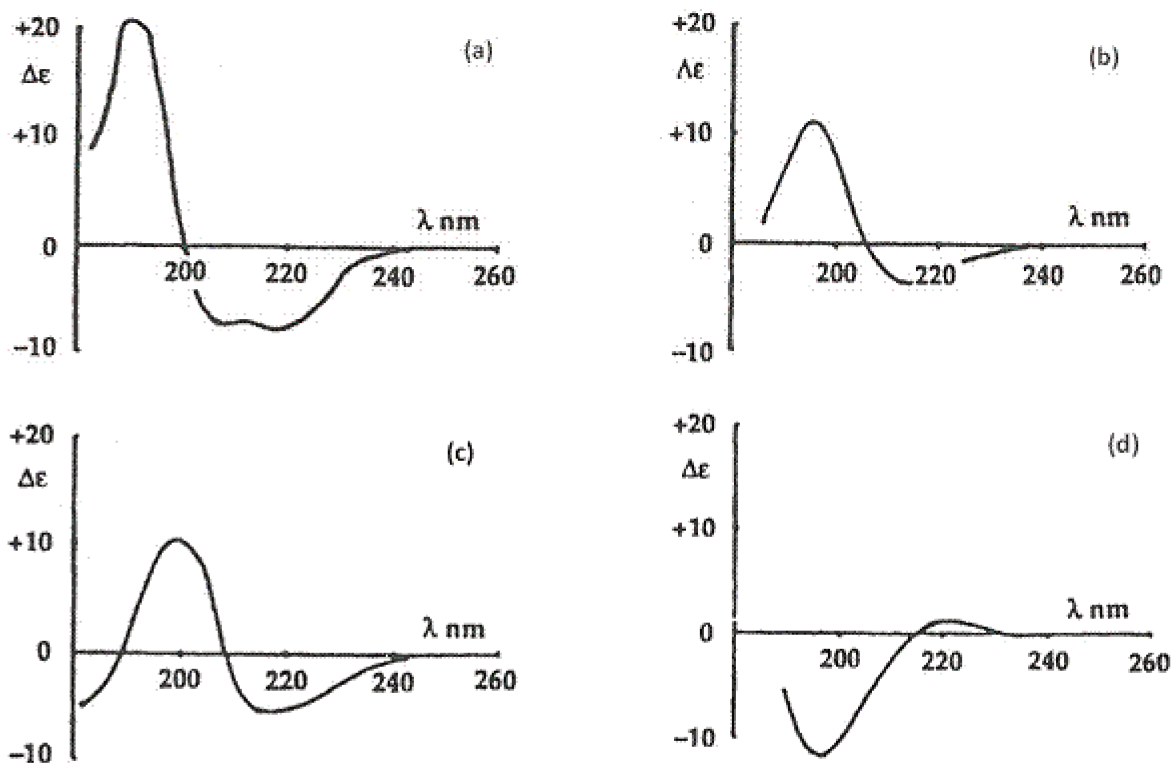


Figura 54. Espectros de DC característicos para diferentes conformações da cadeia polipeptídica (a) hélice α ; (b) folha β ; (c) β turn e (d) randômica (Drake, 2001).

Os dados espectroscópicos de dicroísmo circular podem ser analisados a partir de servidores (Whitmore e Wallace, 2008) que, com o auxílio de algoritmos de determinação estrutural, o conteúdo de estrutura secundária pode ser calculado. Por esta técnica foi analisada neste trabalho a estrutura secundária das proteínas; suas conformações em hélice α , folha β (paralelas e antiparalelas) e estruturas randômicas. O CD também permitiu avaliar alterações conformacionais que ocorreram na proteína adsorvida à superfície das AgNPs, comparativamente com a conformação das proteínas em solução.

V.2.2 Fluorescência

A fluorescência pertence a um fenômeno denominado luminescência, que se caracteriza como a emissão de luz a partir de qualquer substância (Lakowicz, 2006). Na fluorescência, ocorre a excitação de um elétron proveniente de um estado eletrônico fundamental para um estado excitado singlete, de forma que o retorno deste elétron ao estado fundamental é permitido por spin e ocorre rapidamente através da emissão de um fóton. Uma maneira de ilustrar tal fenômeno envolve a utilização do Diagrama de Jablonski (Figura 55).

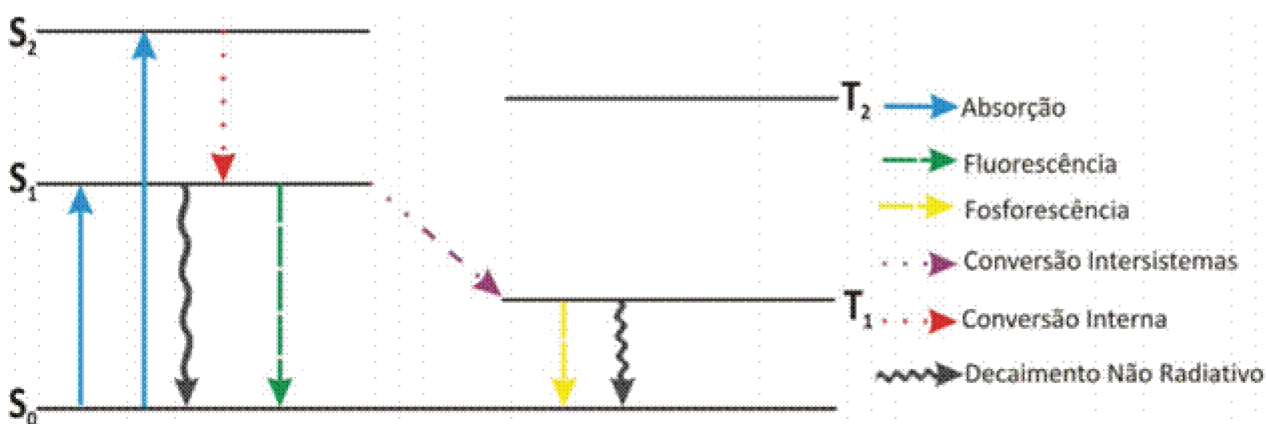


Figura 55. Diagrama de Jablonski simplificado, representando o fenômeno de luminescência (fluorescência e fosforescência). S₀: estado singlete fundamental; S₁: primeiro estado singlete excitado; S₂: segundo estado singlete excitado; T₁: primeiro estado tripleto excitado; T₂: segundo estado tripleto excitado (Valeur, 2001).

No diagrama é observado que os máximos de emissão de espectros de fluorescência encontram-se localizados em comprimentos de onda superiores (portanto, em regiões de inferior energia), quando comparados aos máximos de excitação. Este fenômeno ocorre, pois, uma vez que o elétron proveniente do nível S₀ pode ser excitado para o nível S₂, decair de forma não radiativa

para o nível S_1 , retornando de forma rasiativa (fluorescência) ao estado fundamental, S_0 .

Durante a fluorescência, os máximos de emissão podem ser deslocados para comprimentos de onda menores (*blueshifts*), maiores (*redshifts*) ou ficarem inalterados. Este comportamento pode ser um indicativo, no caso de sistemas biológicos como proteínas, de mudanças conformacionais decorrentes de algum processo, tal como, variações no pH, ou mesmo através da adição de ligantes, os quais podem perturbar a estrutura proteica. Todos estes fatores, associados à alta sensibilidade fazem da fluorescência de emissão uma técnica potente, tornando possível a obtenção de informações importantes a respeito do sistema estudado.

V.2.3 Espectrometria de Massas (MS)

A identificação de proteínas tem sido a base da bioquímica atual (Mann e Kelleher, 2008), e a proteômica, área que estuda o complemento proteico do código genético e que permite a comparação entre diferentes tecidos, fluidos e estados celulares (Geromanos *et al.*, 2009; Vaezzadeh *et al.*, 2010). Combinada às ferramentas de bioinformática, a proteômica permite identificar, caracterizar e até mesmo quantificar uma grande quantidade de proteínas presentes em amostras biológicas complexas (Aebersold e Mann, 2003), ao acoplar métodos de separação e análises de identificação das cadeias proteicas. As identificações são realizadas através da Espectrometria de Massas (MS) (Mann e Kelleher, 2008), uma das mais importantes técnicas de análise dentro das ciências da vida (McCormack *et al.*, 1997; Scherl *et al.*,

2008), devido a sua alta velocidade, sensibilidade, precisão e exatidão (Mann e Kelleher, 2008).

Experimentos do tipo *Shotgun* (Tabb *et al.*, 2010) tem sido a forma de análise de proteomas em larga escala atualmente utilizada, em que dezenas de milhares de peptídeos, presentes em várias concentrações, são analisados após separações cromatográficas (McCormack *et al.*, 1997). Comumente, se utiliza ionização do tipo Eletrospray e aquisição dependente de dados (*Dependent Data Acquisition – DDA*) (Scherl *et al.*, 2008), onde os peptídeos mais intensos são eluídos e selecionados para fragmentação, na tentativa de obter maior informação sobre as sequências de aminoácidos.

A análise proteômica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) inicia-se com a digestão de uma mistura complexa de proteínas, através da utilização de uma enzima (geralmente tripsina), e separação dos peptídeos por cromatografia líquida de fase reversa (Steen e Mann, 2004). Os peptídeos eluídos geram espectros de massa e, dependendo de sua intensidade, são selecionados e fragmentados, gerando então espectros do tipo massas/massas.

As informações obtidas são analisadas e associadas a sequências depositadas em banco de dados, e a identificação das proteínas é realizada a partir dos peptídeos detectados (Prakash *et al.*, 2006). A maior vantagem deste tipo de experimento é a obtenção de informações a respeito da sequência primária dos peptídeos selecionados para fragmentação, o que aumenta a especificidade da técnica e conseqüentemente, a qualidade e confiabilidade das identificações (Scherl *et al.*, 2008).

V.3 Avaliação da Atividade antimicrobiana das AgNPs

V.3.1 Mínima Concentração inibitória (MIC) e Mínima Concentração Bactericida (MBC)/Mínima Concentração Fungicida (MFC)

Neste trabalho, a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata foi quantificada com base na determinação da concentração mínima necessária para inibir o crescimento dos micro-organismos, e foi expressa através do valor de MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Este valor pode ser determinado pelo método das diluições sucessivas em placas tipo ELISA, com 96 poços, conforme encontrado na literatura para fungos (Palomino *et al.*, 2002; Panáček *et al.*, 2009) e bactérias (CLSI, 2003). Controles positivos (micro-organismo de interesse e o meio de cultura utilizado) e negativos (meio de cultura e antibiótico em diferentes concentrações) também devem ser preparados. Neste ensaio, após o preparo, as placas tipo ELISA devem ser incubadas à temperaturas e tempos adequados ao micro-organismo testado. A turbidez do meio é observada ao final do tempo preconizado para cada micro-organismo. A menor concentração de antibiótico ou material testado capaz de inibir o crescimento do micro-organismo considerado chama-se Concentração Mínima Inibitória (MIC).

Concomitante à determinação do valor de MIC, os efeitos bactericidas ou fungicidas, no caso do micro-organismo ser um fungo, podem ser estimados cultivando-se as soluções não turvas em um meio de cultura sem antibiótico. Uma redução de 99,9% no número de colônias indica a Concentração Mínima Bactericida (MBC ou MFC).

V.3.2 Toxicidade – Cito- e Genotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade têm sido os métodos *in vitro* mais utilizados para o estudo da toxicidade de materiais. Sabe-se que linhagens celulares dividem-se e multiplicam-se continuamente quando mantidas em cultura. A base dos ensaios de citotoxicidade está na avaliação da interferência induzida por agentes químicos (no caso desta tese, pelas AgNPs) nos processos metabólicos celulares e na investigação a respeito da maneira em que esses processos podem interferir no crescimento/multiplicação destas células, ou até mesmo culminar na morte celular (Freshney, 1994). Cultura de células de fibroblastos da linhagem 3T3 geralmente são utilizadas por apresentarem facilidade de obtenção, manutenção e manipulação, além de possuírem capacidade em se manterem estáveis mesmo após muitas passagens (Geurtsen *et al.*, 1998; Clothier *et al.*, 2006).

Um ensaio muito utilizado para a determinação da citotoxicidade de materiais/moléculas é o ensaio MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio). É um teste quantitativo colorimétrico para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica, onde o MTT, que é solúvel em água, é convertido em cristais de formazan (insolúvel) (Mosmann, 1983). A redução de MTT (Figura 56) ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase, fornecendo assim uma medida da função mitocondrial. Em seguida, o formazan, de cor púrpura, é solubilizado com etanol e tem sua concentração determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm.

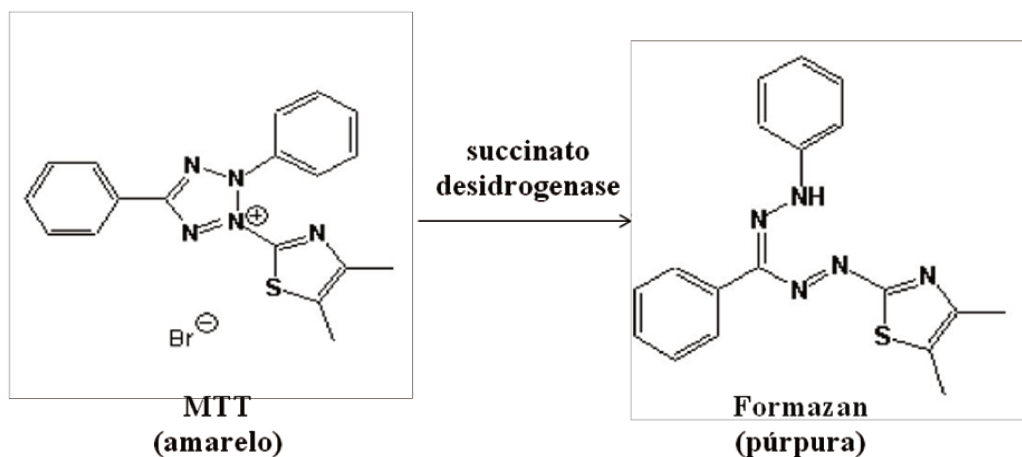


Figura 56. Redução do MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio) de coloração amarela à formazan (cor púrpura) pela succinato desidrogenase.

Linfócitos humanos também são geralmente utilizados para se investigar a citotoxicidade de substâncias. São estudados pelo ensaio *TaliTM image-based cytometer*, o qual efetua a contagem de células de maneira rápida e eficiente.

Já os testes de genotoxicidade podem ser realizados em células humanas, como por exemplo, linfócitos humanos e também em células vegetais como o *Allium cepa*. A genotoxicidade é comumente estudada pelo ensaio *COMET (Single cell gel electrophoresis assay)*, a qual é uma técnica simples e sensível que detecta danos (quebra na fita, por exemplo) no DNA a níveis de células individuais. Neste teste, as células são aplicadas em um gel de agarose sobre uma lâmina de microscópio e, a seguir, são lisadas e submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino. A presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos e crosslinks resultantes da ação de compostos genotóxicos, altera a estrutura do DNA das células, que normalmente está superenrolado e fortemente compactado, causando relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao anodo (eletrodo negativo). Desta forma, após a aplicação de corantes específicos, pode-se visualizar em microscópio

de fluorescência a migração do DNA, movimento este que se assemelha a um cometa (Singh *et al.*, 1988; Fairbain *et al.*, 1995; Tice, 1995).

A análise de alterações cromossômicas é outro ensaio para testar a genotoxicidade. É utilizado como teste de mutagenicidade e é um dos poucos métodos diretos para mensurar danos em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais. Para isto, faz-se necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, objetivando identificar os efeitos tóxicos e as alterações ocorridas ao longo de um ciclo celular. O teste com o *Allium cepa* tem sido amplamente empregado neste tipo de estudo (da Silva, 2003).

Lima *et al.* (2012) discutiram algumas publicações (Kim *et al.*, 2012; Ordzhonikidze *et al.*, 2009; Panda *et al.*, 2011) relacionadas aos/ estudos sobre cito- e genotoxicidade de AgNPs objetivando um entendimento das possíveis aplicações destes nanomateriais de uma maneira segura. No trabalho, os autores concluíram que, baseando-se nos estudos reportados, não é possível se estabelecer uma tendência para a toxicidade (citotoxicidade e genotoxicidade) de nanopartículas de prata, uma vez que estas são sintetizadas de maneiras diferentes e, portanto, possuem variados tamanhos, e podem ou não possuir agentes de estabilização. Ainda, estas partículas geralmente são testadas em diferentes organismos e/ou culturas de células através de diversos testes de toxicidade, não sendo possível, portanto, se chegar a uma conclusão frente à toxicidade de AgNPs.

V.4 Impregnação das AgNPs em tecidos de algodão

V.4.1 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

O princípio da microscopia eletrônica de varredura consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio, que concentrado, controlado e reduzido por um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas, incide sobre a amostra, provocando uma série de emissões de sinais relacionados com a interação do feixe de elétrons incidente e a amostra. Os sinais emitidos encontram-se sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados, etc.) e de fótons (fotoluminescentes e raios-X), os quais são captados por detectores apropriados, sendo amplificados e processados num sistema analisador específico para cada tipo de sinal. A técnica de microscopia eletrônica de varredura permite a obtenção de uma imagem ampliada da amostra a partir da interação de um feixe de elétrons com o material, desde que este seja condutor. Caso a amostra seja não-condutora, sobre a amostra é necessário depositar uma fina camada (10 nm de espessura) de um material condutor (carbono, ouro, por exemplo) para que a mesma possa ser observada por MEV. As análises são realizadas sob alto vácuo para garantir o livre caminho médio dos elétrons durante as medidas.

Neste trabalho, a MEV foi utilizada na caracterização do tecido de algodão impregnado com as nanopartículas de prata, conforme encontrado frequentemente na literatura (Durán *et al.*, 2005 e 2007; Ilic' *et al.*, 2009; Perelshtein *et al.*, 2008; Rai *et al.*, 2009; Ravindra *et al.*, 2010; Vigneshwaran *et al.*, 2007c).

V.4.2 Fluorescência de Raios-x (XRF)

A análise por XRF é um método quali e quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios-x detectados por unidade de tempo) dos raios-x característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra (Boumans e Kloekenkamper, 1989; IAEA, 1970). Os raios-x emitidos por tubos de raios-x, ou raios gama emitidos por uma fonte radioativa excitam os elementos que constituem a amostra, os quais, por sua vez, emitem linhas espectrais com energias características e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra.

Quando um elemento de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, e como consequência disto, elétrons dos níveis superiores realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios-x, de energia característica e bem definida para cada elemento. Assim, resumidamente, a análise por fluorescência de raios-x consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios-x característicos emitidos pela amostra e detecção destes raios-x.

Nesta tese, a técnica de XRF foi utilizada na determinação da quantidade de AgNPs impregnadas no tecido de algodão, como publicado na literatura científica (Durán *et al.*, 2007; Geranio *at al.*, 2009; Lorenz *et al.*, 2012).

V.4.3 Atividade antimicrobiana dos tecidos impregnados – método da difusão em ágar

O teste de halo de difusão em ágar é um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia, desde 1966. O seu princípio básico é a difusão do agente antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano (Figura 57) na presença do micro-organismo a ser testado. Após o período de incubação (à temperatura adequada de cada micro-organismo), o halo formado ao redor do tecido (chamado de halo de inibição), é medido em milímetros e os resultados são graficados. No caso deste trabalho, ao invés do disco impregnado, o teste foi realizado com tecidos de 1,0 x 1,0 cm de algodão impregnados ou não com AgNPs e submetidos à lavagem.

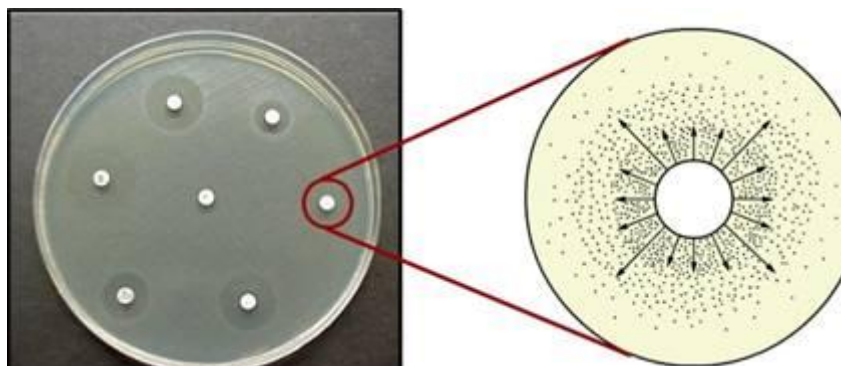


Figura 57. Princípio do teste de suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão em ágar.